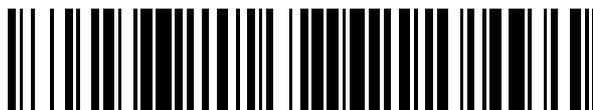


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 536**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 1/20</b>	(2006.01)
<b>C12R 1/225</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/99</b>	(2007.01)
<b>A61P 15/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/747</b>	(2015.01)
<b>A61P 31/04</b>	(2006.01)
<b>A61P 31/10</b>	(2006.01)
<b>A61Q 19/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2014 PCT/CN2014/089882**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15067141**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2014 E 14860260 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3040413**

54 Título: **Lactobacillus crispatus y su aplicación**

30 Prioridad:

**08.11.2013 CN 201310551661**  
**08.11.2013 CN 201310551630**  
**26.12.2013 CN 201310731833**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.05.2018**

73 Titular/es:

**SUZHOU OSEL BIO-PHARM CO., LTD. (100.0%)**  
**Suite 203 A3 Building 218 Xinghu St. Suzhou**  
**Industrial Park**  
**Suzhou, Jiangsu 215123, CN**

72 Inventor/es:

**LIU, YANG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 670 536 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

Lactobacillus crispatus y su aplicación

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana de Lactobacillus y a su aplicación, específicamente se refiere a un Lactobacillus crispatus, que tiene un efecto de inhibición evidente de Candida albicans y patógenos a la vez que regula el micro-entorno vaginal e inhibe Gardnerella vaginalis (bacterias patógenas de la BV), y tiene una ventaja y un potencial enormes en la aplicación a la preparación de productos farmacéuticos para el tratamiento de la vaginosis bacteriana combinada con la infección fúngica, que es la más común en la clínica y para la preparación de productos de salud femeninos diarios.

**10 Técnica de Antecedentes**

15 Existen múltiples microorganismos en la vagina de una mujer sana, y forman un micro-ecosistema vaginal de restricción mutua, coordinación mutua y equilibrio dinámico con el huésped y el entorno. La flora vaginal en la mujer sana está constituida principalmente por Lactobacillus, que comprende Lactobacillus crispatus, Lactobacillus Jensenii y Lactobacillus gasseri, etc. El Lactobacillus puede proteger la vagina en circunstancias normales, mientras que un trastorno del micro-ecosistema vaginal en el que predomina Lactobacillus puede provocar vaginitis.

20 La aparición de vaginosis bacteriana (BV) es provocada por la propagación masiva de otros microorganismos patógenos condicionales tales como Gardnerella vaginalis, diversas bacterias anaerobias, Campylobacter y similares, debido a la disbacteriosis vaginal y a la reducción de Lactobacillus del huésped *per se*. La BV es en realidad un tipo de infección mixta basada en Gardnerella vaginalis. Aunque la aplicación del tratamiento con antibióticos puede aliviar los síntomas de la BV, reduce aún más el lactobacilo que ha sido reducido, lo que agrava la disbiosis vaginal de micro-ecología y, por lo tanto, provoca la recurrencia repetida de la BV. Cómo controlar la recurrencia y curar completamente la vaginosis bacteriana son aspectos problemáticos que deben ser resueltos por los ginecólogos.

25 Del mismo modo, dado que la vagina femenina es fácilmente susceptible a las infecciones, en la vida cotidiana muchas mujeres utilizan productos de desinfección ginecológicos, productos de cuidado y productos de belleza para prevenir enfermedades, mantener la higiene o mantenerse en forma; sin embargo, a menudo se siguen produciendo varios problemas. En circunstancias normales, en la vagina existe una gran cantidad de bacilos beneficiosos para el ser humano, descomponen el glucógeno en la célula epidérmica vaginal en ácido láctico para mantener la acidez en la vagina, formando así una defensa natural que evita la propagación de bacterias patógenas en la vagina. El uso de desinfectante para enjuagar o remojar en un baño de cadera puede dañar la función de defensa de la vagina, por lo que diversas bacterias patógenas se propagan en la vagina a una escala masiva, provocando diversas enfermedades ginecológicas. Los problemas antes mencionados existen asimismo para los cosméticos para la vulva. Si no se cuida adecuadamente, las bacterias podrían fácilmente reproducirse, provocando prurito, inflamación o incluso inflamación ginecológica.

35 Por otro lado, los instrumentos médicos, como los productos de la tecnología científica moderna, han sido ampliamente utilizados en los procesos de prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, y cuidado y rehabilitación de la salud, y se convierten en importantes medios de diagnóstico y tratamiento en el campo médico moderno. Sin embargo, los instrumentos médicos, tales como los productos farmacéuticos, también tienen determinados riesgos debido a los impactos de factores tales como el diseño, el material y la aplicación clínica. En el proceso de inspección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades ginecológicas, la infección puede ser provocada si los materiales utilizados en el instrumento de inspección son irracionales, si el instrumento es sucio o si el sujeto es demasiado sensible. Por lo tanto, es particularmente importante mejorar el material, los componentes y los componentes de contacto con un cuerpo humano del instrumento médico ginecológico, con el fin de potenciar la biocompatibilidad del instrumento, reducir la probabilidad de infección y asegurar una seguridad de inspección.

45 Diversos lactobacilos existentes en la vagina de una mujer sana tienen diferencias individuales, y cada una de las cepas del lactobacilo tiene una diferencia significativa en la resistencia a las bacterias patógenas. En la selección de probióticos de Lactobacillus, se necesita considerar exhaustivamente los tipos, la capacidad de producción de ácidos, la capacidad de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la capacidad adhesiva a las células epiteliales vaginales del Lactobacillus, en donde la colonización con éxito del Lactobacillus en la vagina es la base de las acciones continuas del Lactobacillus e inoculantes que toman el Lactobacillus como ingredientes activos, y es también el factor clave para el efecto curativo del Lactobacillus. Estudios han demostrado que: el Lactobacillus productor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la bacteria dominante en la vagina de una mujer sana, y son los factores clave para proteger la vagina de la infección patógena y, además, los ácidos y algunos agentes antimicrobianos producidos por el metabolismo de Lactobacillus también pueden inhibir eficazmente el crecimiento de otras bacterias. Productos actuales en el mercado no contienen flora dominante para las vaginas de las mujeres en China, tienen una capacidad de colonización

deficiente, son incapaces de mantener un contenido estable de bacterias viables y, por lo tanto, no pueden cumplir con los requisitos de la clínica ginecológica.

El documento US 2010/0151026 A1 describe una cepa de *Lactobacillus crispatus* que se produce de forma natural con características ventajosas. La cepa coloniza las superficies de las mucosas, particularmente las superficies vaginales.

El documento CN 103074270 A describe *Lactobacillus crispatus* LCR15 para ajustar la flora vaginal, prevenir y tratar la colpitis.

El documento WO9846261 A describe nuevas cepas aisladas de bacterias del género *Lactobacillus* que son útiles en un medicamento vaginal, así como medicamentos que contienen tales lactobacilos, una nueva matriz de conservación para microorganismos, un método para conservar células microbianas dentro de un medicamento y métodos para prevenir y tratar infecciones gastrointestinales.

Burton et al., *Applied and Environmental Microbiology* (2003) 69: 97-101 describe estudios sobre el efecto de cápsulas insertadas vaginalmente que contienen lactobacilos viables.

Stapleton et al., *Clinical Infectious Diseases* (2011) 52(19): 1212-1217, describen un ensayo aleatorizado, controlado con placebo, de Fase 2 de un probiótico de *Lactobacillus crispatus* administrado intravaginalmente para la prevención de la infección recurrente del tracto urinario.

Diversas cepas de *Lactobacillus crispatus* se caracterizan por sus secuencias de ARNr 16S (DATABASE GENBANK (02-11-2010) Yamazaki et al., "*Lactobacillus crispatus* Gene for 16S rRNA, Secuencia parcial, cepa: CE3" y DATABASE GENBANK (31-01-2016) Kankainen et al., "*Lactobacillus crispatus* ST1 cepa ST1 ARN ribosomal 16S, Secuencia Completa").

He et al., *Chinese Journal of General Practice* (2013), 11(4): 617-618 describe la identificación de ADN 16r y el análisis filogenético de seis cepas de *Lactobacillus* del tracto genital femenino.

A la vista de lo anterior, traerá buenas noticias a las mujeres chinas para separar y rastrear la flora que es aplicable a la salud vaginal de las mujeres chinas, y para el estudio y desarrollo de productos farmacéuticos, productos para el cuidado de la salud, cosméticos e instrumentos médicos correspondientes.

### Sumario de la Invención

El problema técnico a resolver mediante la presente invención es proporcionar un *Lactobacillus crispatus* que es rastreado de un cuerpo humano sano y tiene características biológicas activas y estables y una fuerte capacidad bacteriostática y la aplicación de las mismas.

Para resolver el problema técnico mencionado anteriormente, la solución técnica propuesta en la presente invención es la siguiente:

un *Lactobacillus crispatus* separado, denominado *Lactobacillus crispatus* 262-1, conservado en el Centro General de Recolección de Cultivos Microbiológicos de China con un número de conservación de CGMCC N° 6469.

El mencionado *Lactobacillus crispatus* 262-1 se seleccionó de las secreciones vaginales de una mujer china sana en edad fértil, y se conserva en el Centro General de Recolección de Cultivos Microbiológicos de China (abreviado CGMCC en inglés) el 22 de agosto de 2012; la dirección de la autoridad de conservación es el Instituto de Microbiología de la Academia de Ciencias China, N° 3 de Patio N° 1, West Beichen Road, distrito de Chaoyang, ciudad de Beijing, el número de registro de conservación es CGMCC N° 6469 y la cepa está clasificada y se denomina *Lactobacillus crispatus*.

Una molécula de ADN separada, en donde la molécula de ADN se extrae de *Lactobacillus crispatus* 262-1 anteriormente mencionado con un número de conservación de CGMCC N° 6469, la secuencia de bases de la molécula de ADN se somete a un análisis comparativo de similitud de secuencia mediante un programa BLAST, y el valor de la homología más alta para la secuencia de bases de *Lactobacillus crispatus* en la base de datos GenBank es mayor que 98%.

Aplicación de dicho *Lactobacillus crispatus* 262-1 en la preparación de productos farmacéuticos para inhibir bacterias patógenas vaginales.

Aplicación de dicho *Lactobacillus crispatus* 262-1 en la preparación de productos farmacéuticos para prevenir y/o tratar enfermedades vaginales.

Aplicación de dicho *Lactobacillus crispatus* 262-1 en la preparación de productos farmacéuticos para regular el equilibrio de la flora vaginal.

Aplicación de dicho *Lactobacillus crispatus* 262-1 en la preparación de productos farmacéuticos con la función de adhesión a las células epiteliales vaginales.

Aplicación de dicha *Lactobacillus crispatus* 262-1 a instrumentos médicos ginecológicos.

Aplicación de dicho *Lactobacillus crispatus* 262-1 a productos de desinfección ginecológica.

Aplicación de dicho *Lactobacillus crispatus* 262-1 en cosméticos para la vagina femenina.

5 La cepa de *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención se rastrea a partir de las secreciones vaginales de una mujer china sana en edad fértil. Un gran número de experimentos demuestran que el *Lactobacillus crispatus* 262-1 tiene sobresalientes capacidades de producción de ácidos y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como la adhesión a las células epiteliales vaginales, y tiene funciones impartidas por sus características en los productos farmacéuticos antes mencionados para inhibir bacterias patógenas vaginales, productos farmacéuticos para prevenir y/o tratar enfermedades vaginales, productos farmacéuticos para regular el equilibrio de la flora vaginal, productos farmacéuticos con la función de adhesión a células epiteliales vaginales, así como productos ginecológicos para el cuidado de la salud, tales como instrumentos médicos ginecológicos, productos de desinfección ginecológica y cosméticos para la vagina femenina.

Un inoculante preparado por el *Lactobacillus crispatus* 262-1 antes mencionado, en el que el ingrediente activo del inoculante es el *Lactobacillus crispatus* 262-1.

15 El inoculante se prepara utilizando el *Lactobacillus crispatus* 262-1 como ingrediente activo, y está en forma de líquido, sólido o gel, en donde el inoculante sólido está en forma de cápsula o comprimido o polvo. Por consiguiente, el inoculante también tiene diversas aplicaciones idénticas o similares a las de *Lactobacillus crispatus* 262-1.

20 Los efectos beneficiosos producidos por la adopción del esquema técnico mencionado anteriormente son los siguientes: (1) la cepa del *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención puede conservarse durante un largo tiempo y puede resistir la vaginosis bacteriana y diversas infecciones vaginales que comprenden vaginitis por *Candida albicans*, gonorrea, vaginitis viral e infección del tracto urinario, etc.; (2) la cepa de la presente invención se recoge directamente del cuerpo humano sano, tiene propiedades biológicas activas y estables sin proceso de domesticación y rejuvenecimiento, pero entrando directamente en el proceso de preparación, la tasa de supervivencia de bacterias vivas de la preparación en polvo liofilizado es alta después de haber sido conservado durante 6 meses a 4°C; y (3) los ingredientes activos de la cepa y el inoculante de la presente invención tiene efectos de inhibir *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella*, en comparación con las bacterias control comercialmente disponibles, dichos ingredientes activos son más ventajosos en la adhesión a las células epiteliales vaginales y la capacidad de colonización vaginal de primates y tienen un enorme potencial de aplicación en instrumentos médicos ginecológicos, productos de desinfección ginecológicos y los cosméticos utilizados para la vulva femenina.

### 30 **Breve Descripción de los Dibujos**

Las Figuras 1A y 1B son la vista frontal y la vista posterior de la morfología colonial del *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención, respectivamente;

la Figura 2 es una foto de examen microscópico de tinción Gram del *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención;

35 las Figuras 3A, 3B, 3C y 3D son las fotos microscópicas electrónicas del *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención ampliadas durante diferentes momentos;

la Figura 4 es un electroforetograma de productos amplificados por PCR del gen de ADNr 16S del *Lactobacillus crispatus* 262-1 T0, T30 y T50 de la presente invención;

40 la Figura 5 es una imagen que muestra los resultados obtenidos de la reacción del *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención con peróxido de hidrógeno durante 0 min, 5 min y 10 min;

la Figura 6 es la vista frontal y la vista posterior de la morfología colonial del *Lactobacillus crispatus* 262-1 T0, T30 y T50 de la presente invención, respectivamente;

la Figura 7 es una foto de examen microscópico de tinción Gram del *Lactobacillus crispatus* 262-1 T0, T30 y T50 de la presente invención;

45 la Figura 8 es una imagen que muestra los resultados obtenidos de la reacción del *Lactobacillus crispatus* 262-1 T0, T30 y T50 de la presente invención con peróxido de hidrógeno durante 0 min, 5 min y 10 min;

la Figura 9 es una foto que muestra los efectos antibacterianos del *Lactobacillus crispatus* 262-1 (izquierda) y *Lactobacillus delbrueckii* (derecha) de la presente invención en *Gardnerella vaginalis*;

la Figura 10 es una foto que muestra los efectos antibacterianos del *Lactobacillus crispatus* 262-1 y del *Lactobacillus delbrueckii* de la presente invención en *Atopobium vaginae* bajo diferentes concentraciones ( $DO_{600}$  es 0,05, 0,1, 0,2 y 0,3, respectivamente), en donde los dos en la columna de la derecha entre las placas de cultivos experimentales de diferentes concentraciones son fotos que muestran los efectos antibacterianos del *Lactobacillus crispatus* 262-1, y el de la columna de la izquierda es una foto que muestra el efecto antibacteriano del *Lactobacillus delbrueckii*;

la Figura 11 es una foto que muestra los efectos antibacterianos del *Lactobacillus crispatus* 262-1 (izquierda) y del *Lactobacillus delbrueckii* (derecha) de la presente invención en *Candida albicans*;

la Figura 12 es un electroforetograma de los productos amplificados por PCR de fragmentos de ADNr 16S de algunas cepas en la microbiota vaginal de macacos Rhesus, cuyas vaginas han sido colonizadas con el *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención; y

la Figura 13 muestra las cantidades detectadas de *Lactobacillus crispatus* 262-1 en el animal sometido a ensayo después de la colonización del *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención, en donde el eje longitudinal muestra el valor de CFU del *Lactobacillus crispatus* 262-1 y el eje horizontal representa 5 puntos de tiempo de muestreo de diversos animales; y día 1 representa el primer día después de la colonización, y así sucesivamente.

#### 15 Información de Conservación

El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención se conserva en el Centro General de Recolección de Cultivos Microbiológicos de China (abreviado CGMCC) el 22 de agosto de 2012; la dirección de la autoridad de conservación es el Instituto de Microbiología de la Academia de Ciencias China, N° 3 de Patio N° 1, West Beichen Road, distrito de Chaoyang, ciudad de Beijing, el número de registro de conservación es CGMCC N° 6469 y la cepa está clasificada y se denomina *Lactobacillus crispatus*.

#### Descripción Detallada de la Invención

A menos que se especifique lo contrario en esta memoria, los métodos experimentales utilizados en las siguientes realizaciones son todos métodos convencionales, y los materiales y reactivos utilizados están todos disponibles comercialmente; y T0, T30 y T50 representan *Lactobacillus crispatus* de la 0ª generación, la 30ª generación y la 50ª generación, respectivamente.

Preparación del medio de cultivo de bacterias:

##### 1. Preparación del medio de cultivo selectivo (Rogosa SL) del *Lactobacillus crispatus* 262-1:

(1) preparar polvos de agar en una solución en 1,5 g/100 ml de agua desionizada y sellar;

(2) poner la solución en una olla a presión y cocer al vapor bajo 1,0 MPa durante 20 minutos; abrir un banco súper limpio para la radiación ultravioleta durante más de 20 minutos;

(3) extraer la solución de agar cuando la olla a presión no tiene presión, y añadir el medio de cultivo selectivo de *Lactobacillus* (Caldo Rogosa SL) en 5,97 g/100 ml de solución de agar;

(4) añadir ácido acético glacial en 0,132 ml/100 ml de solución de agar, y hervir durante 2,3 minutos en un horno de microondas después de ser sellado;

(5) verter el medio de cultivo en una placa de cultivo después de que la temperatura del medio de cultivo baje a la temperatura ambiente en una cantidad de 10 ml o 20 ml por placa de cultivo en función del tamaño de la placa de cultivo; y

(6) realizar los pasos (3) - (5) en el banco súper-limpio, enfriando el medio de cultivo en gel de agar, anotando el nombre y la fecha de preparación del medio de cultivo, y poniéndolo en un refrigerador a 4°C para el uso futuro.

##### 2. Preparación de medio sólido del caldo (MRS):

(1) preparar polvos de agar en una solución en 1,59/100 ml de agua desionizada;

(2) añadir Caldo MRS en 17,91 g/100 ml de solución de agar, y mezclar uniformemente;

(3) poner la solución en la olla a presión y cocer al vapor a 1,0 MPa durante 20 minutos; y

(4) repetir los pasos (5) y (6) mencionados anteriormente.

3. Preparación de medio líquido del caldo (MRS):

(1) añadir el Caldo MRS en el agua desionizada con una proporción de 17.91 g/100 ml;

(2) poner la solución en una olla a presión, y cocer al vapor a 1,0 MPa durante 20 minutos; y

5 (3) extraer la solución cuando la olla a presión no tiene presión, distribuyendo a los tubos EP con 1,0 ml por tubo, anotando el nombre y la fecha de preparación del medio de cultivo, y poniéndolo en un refrigerador a 4°C para el uso futuro.

4. Preparación de medio de identificación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):

(1) repetir los pasos de preparación (1) a (4) del medio sólido del caldo (MRS);

10 (2) extraer la solución después de que la olla a presión no tenga presión, enfriar ligeramente y añadir TMB (la concentración final es 0,25 mg/ml) y HRP (la concentración final es 0,01 mg/ml) en el banco súper limpio cuando el medio todavía está en estado líquido, mezclando uniformemente; y

(3) verter el medio de cultivo en una placa de cultivo después de que la temperatura del medio de cultivo baje a la temperatura ambiente, enfriar el medio de cultivo en gel de agar, anotar el nombre y la fecha de preparación del medio de cultivo y ponerlo en un refrigerador en 4°C para el uso futuro.

15 **Realización 1:** la separación, inoculación, purificación y el cultivo de enriquecimiento de la flora *Lactobacillus crispatus* 262-1

I. Separación e inoculación de la flora de *Lactobacillus crispatus* 262-1: la toma de muestras utiliza el sistema Port.A-Cd de la compañía American BD. 1/3 de las secreciones de la pared lateral vaginal del sujeto se recolectan utilizando dos bastoncillos de algodón estériles, y se inoculan en la placa de cultivo provista del medio de cultivo Rogosa SL preparado en diferentes concentraciones en el espacio de 24 horas. Se anota la información. La placa de cultivo se coloca en una bolsa de aerogénesis de CO<sub>2</sub> de un recipiente anaerobio, y luego se coloca en una incubadora a 37°C durante más de 48 h.

25 II. Purificación y cultivo de enriquecimiento de la cepa *Lactobacillus crispatus* 262-1: los recuentos se realizan de acuerdo con diferentes morfologías (superficie, borde y similares) y tamaños de colonias, respectivamente; las colonias de la misma morfología y el mismo tamaño se marcan como un tipo, unas pocas bacterias en la colonia individual se recogen mediante un asa de inoculación y se inoculan en el medio sólido MRS mediante un "método de línea diagonal" para obtener una colonia individual separada y purificada colonia individual; y unas pocas bacterias de la colonia individual en el medio sólido MRS son recogidas por un palillo de bacterias, se inoculan en el medio líquido MRS y luego se colocan en una incubadora a 37°C para cultivo anaerobio durante 24h-72h. Se selecciona una nueva cepa y se denomina *Lactobacillus crispatus* 262-1.

30 **Realización 2:** identificación y conservación de la cepa del *Lactobacillus crispatus* 262-1

I. Carácter del cultivo, examen microscópico de tinción y característica morfológica: tal como se muestra en la Figura 1, la colonia obtenida después del cultivo es circular y turbia-blancuzca en el centro, se dispersa y es irregular; el frotis de cultivo puro de la colonia se toma para la tinción de Gram, y tal como se muestra en la Figura 2, el resultado se presenta Gram-positivo, tiene forma de varilla corta y se puede enlazar para formar una cadena larga; tal como se muestra en la Figura 3, los resultados del análisis por microscopio electrónico son que: bajo un microscopio electrónico, la cepa es asporosa, atricosa y acapsular, y el tamaño de la cepa es 26,824 × 6,667 µm. Los resultados demuestran que: la cepa separada se juzga preliminarmente como el *Lactobacillus*.

40 II. Identificación de la secuencia del gen ADNr 16S: la extracción de ADN se realiza con un kit de extracción de ADN del genoma bacteriano y se adoptan pares de cebadores 8F (5'-AGA GTT TGATCC TGG CTC AG-3') y 926R (5'-CCG TCAATT CCTTTR AGTTT-3') para llevar a cabo la amplificación por PCR, en donde R representa G o A, el producto de la PCR se toma para realizar la electroforesis en gel para determinar el fragmento del gen ADNr 16S. El resultado satisfactorio es obtener una sola banda de producto de PCR claramente a 950 pb, que se muestra en la columna T0 en la Figura 4. La purificación y la secuenciación del ADN se realizan en el producto de PCR satisfactorio, se adopta un método de secuenciación de Sanger, el par de cebadores de secuenciación es 8F/926R, el instrumento de secuenciación es ABI3730, el análisis comparativo de similitud de la secuencia se lleva a cabo por el programa BLAST en la base de datos GenBank, y la especie de *Lactobacillus* se obtiene de acuerdo con el valor de homología más alto, que es mayor que 98%. La secuencia parcial de ADNr 16S se muestra en la tabla de secuencias SEQ ID NO:1, la secuencia 8F se muestra en la tabla de secuencias SEQ ID NO:4 y la secuencia 926R se muestra en la tabla de secuencias SEQ ID NO:5.

50

III. Propiedades fisiológicas y bioquímicas: las respuestas fisiológicas y bioquímicas de la cepa se testan a través del prueba de hidrólisis de esculina, prueba de metilo rojo (prueba MR), test de Voges-Proskauer (test VP), prueba de indol, prueba de azúcar triple hierro, prueba de disacárido Kligler hierro, prueba de ureasa, prueba de fenilalanina desaminasa (PD), prueba de la aminoácido descarboxilasa, prueba de licuefacción de gelatina, prueba de malonato de sodio, experimento de citrato (prueba de citrato), prueba de reducción de nitratos, prueba de leche de tornasol y prueba de motilidad bacteriana, obteniendo los siguientes resultados: la cepa de *Lactobacillus crispatus* 262-1 puede generar glucosa y se escinde hidrolizando esculina; la prueba de MR positiva indica que la glucosa metabolizable produce ácido orgánico; la prueba VP negativa indica que la glucosa metabolizable no produce ácido pirúvico; el resultado de la prueba de indol muestra que el triptófano en peptona no es descompuesto por la cepa para producir indol; la prueba de azúcar triple hierro indica que la glucosa lactosa metabolizable no produce H<sub>2</sub>S; la prueba de hierro disacárido Kligler indica que la lactosa metabolizable no produce H<sub>2</sub>S; la prueba de ureasa, la prueba de PD, la prueba de aminoácido descarboxilasa y la prueba de licuefacción de gelatina son todas negativas, lo que indica que la cepa no produce ureasa, fenilalanina desaminasa, aminoácido descarboxilasa ni gelatinasas; la prueba de malonato de sodio, el experimento de citrato (prueba de citrato) y la prueba de reducción de nitrato son todos negativos, lo que indica que la cepa no absorbe malonato de sodio como una fuente de carbono, no utiliza citrato como una fuente nitrogenada y una fuente de carbono y no reduce nitrato en nitrito; la prueba de leche de tornasol observa que la cepa puede provocar la fermentación de la leche sin solidificación, lo que indica que la cepa crece vigorosamente sin producir quimosina; y la prueba de motilidad bacteriana es negativa. La identificación bioquímica se realiza en la cepa mediante el sistema de identificación de *Lactobacillus* API 50 CHL producido por la compañía Merieux de Francia, el resultado demuestra que galactolipina, glucosa, fructosa, manosa, N-acetil-glucosamina, amígdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa y almidón se fermentan a las 24 h y 48 h, y son positivas en la reacción; glicerina, eritrina, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonita, β-metil-D-xilósido, sorbosa, ramnosa, evonosida, inositol, manitol, sorbierita, α-metil-D-manósido, α-metil-D-glucósido, melibiosa, sinantrina, melecitosa, xilitol, geraniol, D-turanosa, D-lixosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabinitol, gluconato, 2-ceto-gluconato, 5-ceto-gluconato no se fermentan, y son negativos en la reacción; trehalosa, rafinosa y glucógeno son débiles positivos, la reacción es negativa durante el blanco del sustrato y, por lo tanto, se puede determinar, en base al mapa bioquímico, que las características bioquímicas de la cepa corresponden a la característica bioquímica del *Lactobacillus crispatus*.

#### 4. Conservación del *Lactobacillus crispatus* 262-1

El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención se conservó en el Centro General de Recolección de Cultivos Microbiológicos de China (abreviado CGMCC) el 22 de agosto de 2012; la dirección de la autoridad de conservación es el Instituto de Microbiología de la Academia de Ciencias China, N° 3 de Patio N° 1, West Beichen Road, distrito de Chaoyang, ciudad de Beijing, el número de registro de conservación es CGMCC N° 6469 y la cepa está clasificada y se denomina *Lactobacillus crispatus*.

#### 35 **Realización 3:** determinación de metabolitos del *Lactobacillus crispatus* 262-1

I. Determinación del contenido de ácido láctico en los metabolitos del *Lactobacillus crispatus* 262-1: se determina que el rendimiento de ácido D-láctico de esta cepa es 6,213 g/L utilizando un kit de detección de ácido D-láctico; y se determina que el contenido de ácido L-láctico es 3,789 g/L mediante un analizador de detección. Los resultados se presentan en el grupo de datos T0 en la siguiente Tabla 1.

40 Tabla 1: resultados determinados del ácido láctico

Muestras	Ácido D-láctico (g/L)	Ácido L-láctico (g/L)
T0	6,213	3,789
T30	6,334	3,330
T50	6,291	3,225

II. Determinación del contenido de peróxido de hidrógeno en los metabolitos de *Lactobacillus crispatus* 262-1: la determinación semi-cuantitativa de peróxido de hidrógeno se realiza mediante el método de la peroxidasa de McGroarty *et al.* El *Lactobacillus crispatus* separado e identificado se inocula en una placa de MRS-TMB. La placa se retira después de la incubación anaerobia a 37°C durante 24 horas, y las bacterias se exponen al aire. El color de las colonias de *Lactobacillus* productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se convertirá en azul, mientras que el color de las colonias no productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no va a cambiar. La semi-cuantificación se lleva a cabo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de acuerdo con el tiempo de cambio de color, y los resultados se muestran en la Figura 5, en donde aparece un color azul claro en las colonias en el momento de 5 min, mientras que una gran cantidad de color azul aparece significativamente en el momento de 10 min. De acuerdo con los criterios enumerados en la Tabla 2, el metabolismo de esta cepa produce peróxido de hidrógeno, con un nivel semi-cuantitativo de +++.

Los resultados anteriores demuestran que el *Lactobacillus crispatus* 262-1 de la presente invención puede producir ácido láctico y peróxido de hidrógeno, lo que contribuye a mantener el equilibrio microecológico vaginal.

Tabla 2: criterios para determinar la semi-cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Tiempo de cambio de color para la colonia	Nivel semi-cuantitativo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<10 minutos	+++
10- <20 minutos	++
20-30 minutos	+
> 30 minutos o sin cambio de color	-

5 **Realización 4:** prueba de sensibilidad a antibióticos

De acuerdo con los requisitos de la prueba de susceptibilidad a antibióticos en la tercera teoría general del producto bacteriano micro-ecológico viable de la farmacopea en 2010, se adopta el método del disco de papel de difusión en agar para medir la sensibilidad de las cepas a los antibióticos y el nivel de sensibilidad de las cepas a los antibióticos se juzga de acuerdo con los tamaños de las zonas de inhibición, los resultados de medición son como se muestra en la Tabla 3, resistencia a fármacos de *Lactobacillus crispatus* a flagilo (metronidazol), gentamicina, bacitracina y kanamicina, sensibilidad de *Lactobacillus crispatus* a ampicilina, ceftriaxona, cloromicetina, clindamicina, imipenem, eritromicina, piperacilina, tetraciclina, azitromicina, amoxicilina y vancomicina, la mediación de *Lactobacillus crispatus* a penicilina y oxacilina se determina mediante los criterios de interpretación del alcance de los hongos restrictivos del método de disco de prueba sensible a fármacos.

15 Tabla 3: resultados de la prueba de sensibilidad a los antibióticos

Antibióticos	Contenido en papel/hoja	T0			T30	T50
		Inhibición en el diámetro de la zona/mm	Determinación de sensibilidad	Bacteria de referencia	Inhibición en el diámetro de la zona/mm	Inhibición en el diámetro de la zona/mm
Ampicilina	10 µg	24	Sensibilidad	Hemophilus	24	25
Ceftriaxona	30 µg	29	Sensibilidad	Hemophilus	31	30
Cloranfenicol	30 µg	35	Sensibilidad	Hemophilus	36	35
Clindamicina	2 µg	35	Sensibilidad	Hemophilus	37	36
Imipenem	10 µg	40	Sensibilidad	Hemophilus	40	40
Gentamicina	10 µg	0	Resistencia a fármacos	\	0	0
Eritromicina	15 µg	36	Sensibilidad	Streptococcus	41	39
Bacitracina	0,04 U	0	Resistencia a fármacos	\	0	0
Penicilina	10 UI	24	Mediación	Otros estreptococos	25	24
oxacilina	1 µg	9	Mediación	Streptococcus pneumonia	10	9
Piperacilina	100 µg	35	Sensibilidad	Otras bacterias gram-negativas	37	35
Amoxicilina	10 µg	20	Sensibilidad	Hemophilus	24	23
Vancomicina	30 µg	26	Sensibilidad	Otros cocos gram-positivos	27	26
Kanamycin	30 µg	0	Resistencia a fármacos	\	0	0
Metronidazol	5 µg	0	Resistencia a fármacos	\	0	0
Tetraciclina	30 µg	38	Sensibilidad	Hemophilus	40	39
Azitromicina	15 µg	31	Sensibilidad	\	31	30

Nota: debido al hecho de que el método de difusión del disco sensible a fármacos sólo tiene los criterios determinantes para las bacterias patógenas y el lactobacilo no figura en la lista, los criterios enumerados se refieren a los métodos para determinar las bacterias tales como hemophilus y se establecen como tres niveles: sensibilidad, mediación y resistencia a fármacos.

20 **Realización 5:** prueba de toxicidad

Se someten a ensayo cinco ratones Kunming (nivel SPF): se inyectan 0,3 ml de suspensión reciente de *Lactobacillus crispatus* 262-1 (mayor que  $1 \times 10^9$  UFC/ratón) en el abdomen de cada uno de los ratones. De acuerdo con los requisitos de la Farmacopea China 2010, el peso de cada uno de los ratones se mide todos los días, y se observan y registran los cambios en los comportamientos y la fisiología de cada uno de los ratones antes y después de la inyección. Los resultados demuestran que los pesos de todos los ratones aumentan en el espacio de 7 días y no se producen síntomas tóxicos obvios, comportamiento anormal o muerte. Por lo tanto, esta cepa se considera una cepa no tóxica.

**Realización 6:** prueba de estabilidad de paso del *Lactobacillus crispatus* 262-1

En la realización, se examina la estabilidad de la cepa 262-1 de *Lactobacillus crispatus* después de ser sometida a pases durante 30 generaciones (T30) y 50 generaciones (T50) desde diversos aspectos, tales como características de crecimiento, morfología, características bioquímicas, composición de metabolin, característica sensible a antibióticos, capacidad hereditaria y la prueba de toxicidad.

I. La separación y purificación, la observación de la morfología de la colonia, el examen microscópico de tinción y el método de detección de características bioquímicas del *Lactobacillus crispatus* 262-1 son los mismos que en la primera parte de las realizaciones 1 y 2. Los resultados muestran la morfología de la colonia después del pasaje en la Figura 6, de la que se puede ver que no se produce cambio significativo alguno, lo cual indica que el pasaje es estable; la tinción de Gram se representa como bacilo Gram-positivo, y la foto del examen microscópico de tinción es como se muestra en la Figura 7; los resultados de la identificación bioquímica a las 24 h y 48 h indican que las características de la reacción bioquímica de diversas generaciones son consistentes y corresponden a las características bioquímicas del *Lactobacillus crispatus*. Los resultados anteriores demuestran que las características bioquímicas de la cepa corresponden a la característica bioquímica del *Lactobacillus crispatus*, y las características de reacción bioquímica de varias generaciones son consistentes.

II. Análisis de características genéticas: el método es el mismo que en la segunda parte de la realización 2. Se realiza una amplificación por PCR de fragmentos de ARNr 16S en la cepa de la 0ª generación (T0), la 30ª generación (T30) y la 50ª generación (T50) del *Lactobacillus crispatus* 262-1, respectivamente. Los productos de la amplificación por PCR se analizan por electroforesis tal como se muestra en la Figura 4, de lo que se puede ver que la banda diana es clara y única, su tamaño es de aproximadamente 950 pb, la amplificación es correcta y los resultados de las tres amplificaciones por PCR en T0, T30 y T50 son consistentes. Los productos de amplificación por PCR de T0, T30 y T50 están secuenciados, y las secuencias se muestran en las tablas de secuencia SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, respectivamente. Se realiza un análisis de comparación entre las secuencias determinadas y las secuencias conocidas en la base de datos GenBank utilizando la herramienta BLAST en NCBI que se determinará como el *Lactobacillus crispatus*.

III. Medición de metabolitos: el método es el mismo que en la realización 3, el resultado medido del ácido láctico es como se muestra en la Tabla 1, y el resultado medido del peróxido de hidrógeno es como se muestra en la Figura 8. En la Figura 8, cada una de las generaciones de colonias aparece en azul claro después de 5 min, y aparece una gran cantidad de azul después de 10 min, lo que demuestra que el peróxido de hidrógeno se produce durante el metabolismo de la cepa, y el nivel semi-cuantitativo es +++.

IV. Prueba de sensibilidad a antibióticos: el método es el mismo que en la realización 4, en la que se adopta el método del disco de papel de difusión en agar para medir la sensibilidad de la cepa a los antibióticos; y la resistencia a fármacos del *Lactobacillus crispatus* a metronidazol, gentamicina, bacitracina y kanamicina, la sensibilidad del *Lactobacillus crispatus* a cloranfenicol, clindamicina, imipenem, eritromicina, piperacilina, tetraciclina y azitromicina y la mediación del *Lactobacillus crispatus* a ampicilina, ceftriaxona, penicilina, oxacilina, amoxicilina y vancomicina está determinada por los criterios de interpretación del alcance de los hongos restrictivos del método del disco de prueba sensible a fármacos, por favor, véase la Tabla 3.

V. Prueba de toxicidad: el método es el mismo que en la realización 5, en el que la prueba de toxicidad se realiza en las generaciones T0, T30 y T50 de cepas del *Lactobacillus crispatus* 262-1 con el método de inyección intraperitoneal de ratones, en el que la concentración de ensayo es mayor que  $10^9$  UFC/ratón. Los resultados son los siguientes: todos los ratones sometidos a ensayo están exentos de síntomas de intoxicación en el espacio de 7 días y todos los pesos aumentan sin la muerte de los animales. En base a los resultados anteriores, esta cepa pertenece a una cepa de tipo no tóxico de acuerdo con "Supplementary Instructions of Technique Requirements for New Drug Pharmacology and Toxicology Research".

En resumen, la realización cultiva el *Lactobacillus crispatus* 262-1 para múltiples pases a través del medio de cultivo MRS, y analiza el impacto de la reproducción del pase sobre el *Lactobacillus crispatus* 262-1 en los aspectos de morfología, bioquímica, características del metabolito y características hereditarias, características sensibles a los fármacos y prueba de toxicidad. Los resultados demuestran que: el pase dentro de 50 generaciones cultivadas por

MRS es idéntico con la cepa separada inicialmente en morfología, bioquímica, características hereditarias, metabolitos y características sensibles a los fármacos, y es estable.

**Realización 7:** experimentos farmacodinámicos de la cepa *Lactobacillus crispatus* 262-1

I. Experimentos antibacterianos in vitro de la cepa *Lactobacillus crispatus* 262-1

5 (1) El experimento de inhibición in-vitro de *Lactobacillus crispatus* 262-1 y *Lactobacillus delbrueckii* en *Gardnerella vaginalis* es el siguiente: 5 µL de *Lactobacillus crispatus* 262-1 y 5 µL de *Lactobacillus delbrueckii* que se cultivan durante una noche en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C se inoculan en placas de agar MRS, respectivamente, y luego se cultivan en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 h; se inoculan 100 µL de *Gardnerella vaginalis* en 10 ml de medio líquido BHI, y luego se cultivan en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 h; se succionan 50 ml de agar BHI  
10 blando y se añaden 2,5 ml de suero de caballo y 1 ml de suspensión de *Gardnerella vaginalis* a mezclar uniformemente, se succionan 5 ml de la mezcla y se revisten sobre la placa de agar MRS de *Lactobacillus* que se ha cultivado durante 48 h. y luego las placas de agar MRS de *Lactobacillus* se numeran respectivamente y se cultivan en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 h hasta que aparece una zona de inhibición alrededor del *Lactobacillus*. Los resultados se muestran en la Figura 9, en donde la figura de la izquierda muestra el efecto de la zona de inhibición del *Lactobacillus crispatus* 262-1, y el diámetro de la zona de inhibición es de 21.68 mm con un calibre vernier, la figura de la derecha muestra el efecto de la zona de inhibición del *Lactobacillus delbrueckii*, y se mide que el diámetro de la zona de inhibición es 19,32 mm, y la conclusión es que el efecto de inhibición del *Lactobacillus crispatus* 262-1 a *Gardnerella vaginalis* es mejor que el de *Lactobacillus delbrueckii*.

20 (2) El experimento de inhibición in-vitro del *Lactobacillus crispatus* 262-1 y *Lactobacillus delbrueckii* en *Atopobium vaginae* es como sigue: 5 µL de *Lactobacillus crispatus* 262-1 y 5 µL de *Lactobacillus delbrueckii* que se cultivan durante la noche bajo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C se inoculan en placas de agar MRS, respectivamente, y luego se cultivan en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 h; el *Atopobium vaginae* que ha sido cultivado en condiciones anaerobias a 37°C se prepara en suspensiones de bacterias iniciales de diferentes concentraciones, y los valores de DO<sub>600</sub> de las suspensiones iniciales de bacterias son 0,05, 0,1, 0,2 y 0,3, respectivamente. Las suspensiones de *Atopobium vaginae* de diferentes concentraciones se sumergen y luego se recubren uniformemente en toda la superficie de un medio de cultivo de agar de sangre Columbia; los *Lactobacillus crispatus* 262-1 y *Lactobacillus delbrueckii* cultivados se prensan y perforan, las tortas de bacterias se recogen con pinzas y luego se colocan boca abajo en el medio de cultivo de agar de sangre Columbia recubierto con *Atopobium vaginae*, y luego se cultiva el medio de cultivo de agar de sangre Columbia en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 h, y se observan y registran las zonas de inhibición. Los resultados se muestran en la Tabla 4 y la Figura 10, y se obtiene una conclusión de acuerdo con la figura y el tamaño medido de la zona de inhibición de que el efecto de inhibición de *Lactobacillus crispatus* 262-1 sobre *Atopobium vaginae* es obviamente superior al de *Lactobacillus delbrueckii*; como el aumento de la concentración de *Atopobium vaginae*, los efectos de inhibición de *Lactobacillus crispatus* 262-1 en *Atopobium vaginae* son sustancialmente constantes, y los diámetros de las zonas de inhibición son todos aproximadamente 20 mm; mientras que la capacidad antibacteriana de *Lactobacillus delbrueckii* se reduce a medida que aumenta la concentración de *Atopobium vaginae*.

Tabla 4: diámetro de la zona de inhibición (mm)

Concentración	<i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1		valor medio de <i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
DO = 0,05	20,20	21,52	20,86	16,24
DO = 0,1	20,40	20,90	20,65	14,26
DO = 0,2	22,26	21,86	22,06	14,34
DO = 0,3	20,94	18,52	19,73	12,78

40 (3) El experimento de inhibición in-vitro del *Lactobacillus crispatus* 262-1 y *Lactobacillus delbrueckii* en *Candida albicans*: 5 µL del *Lactobacillus crispatus* 262-1 y 5 µL de solución reciente de *Lactobacillus delbrueckii* se incorporan en un medio de agar MRS, y luego se cultivan en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 h; 100 µL de suspensiones recientes de *Candida albicans* se mezclan uniformemente en 5 mL de agar YM suave (0.4% de agar, baño de agua a 50°C), y la mezcla se vierte en agar MRS de *Lactobacillus* que ha sido cultivado durante 48 h, y luego ha sido cultivado en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C después de solidificarse hasta que aparezca una zona de inhibición  
45 alrededor de *Lactobacillus*. Los resultados se muestran en la Figura 11, y la conclusión es que la zona de inhibición del *Lactobacillus crispatus* 262-1 en *Candida albicans* es obvia y clara, y el efecto inhibitorio de la misma es aparentemente mayor que la de los *Lactobacillus delbrueckii*.

(4) El efecto de inhibición in-vitro de *Lactobacillus crispatus* 262-1 y *Lactobacillus delbrueckii* sobre el patógeno *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella*

Método de investigación: 5 µL del *Lactobacillus crispatus* 262-1 y 5 µL de solución reciente de *Lactobacillus delbrueckii* se incorporan en un medio de agar MRS, y luego se cultivan en condiciones anaerobias en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 h; 100 µL de *Staphylococcus aureus*, 100 µL de *Pseudomonas aeruginosa*, 100 µL de *Salmonella* y 100 µL de suspensión reciente de *Escherichia coli* se mezclan uniformemente en 5 mL de agar nutriente (0,4% de agar, baño de agua a 50°C); la mezcla se vierte en el medio de agar MRS de *Lactobacillus* que ha sido cultivado durante 48 h, y se incuba en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C después de solidificarse, hasta que la zona de inhibición aparece alrededor de *Lactobacillus*. Los resultados se muestran en la Tabla 5, y la conclusión es que los efectos de inhibición de *Lactobacillus crispatus* 262-1 sobre el patógeno *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* son todos superiores a los de *Lactobacillus delbrueckii*; los efectos de inhibición de *Lactobacillus crispatus* 262-1 y *Lactobacillus delbrueckii* en *Pseudomonas aeruginosa* son los más obvios, y los diámetros de la zona de inhibición son todos mayores que 90 mm.

Tabla 5: diámetro de la zona de inhibición (mm)

Bacteria patógena	<i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Escherichia coli</i>	50,0	43,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	42,4	38,31
<i>Salmonella</i>	51,33	48,10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 90	> 90

II. El experimento para la fuerza adhesiva celular: los rendimientos de adhesión de diferentes *Lactobacillus* se determinan de acuerdo con el número de *Lactobacillus* unidos a una monocapa de células epiteliales vaginales. El método comprende los siguientes pasos: tomar células epiteliales vaginales humanas Vk2/E6E7 y células epiteliales de carcinoma de cuello uterino humano Hela; inocular las células en una placa de 12 poros con una densidad de 450.000 por poro, y formar monocapa mediante VK2/E6E7 después de 48 horas; añadir *Lactobacillus* DJS y *Lactobacillus crispatus* 262-1 comercialmente disponibles en cada uno de los poros con diferentes números de UFC, respectivamente, y adherir durante 4 horas, haciendo vibrar suavemente las mismas sobre un agitador durante el proceso de adhesión, y proporcionar a cada uno de los grupos dos experimentos paralelos, respectivamente; una vez terminada la adhesión, dividir las células con 1 ml de tritonX-100 al 0,05% para prepararse para la suspensión de bacterias, diluir, tomar 100 µL de suspensión de bacterias a inocular uniformemente en la placa de medio de agar MRS, respectivamente; y después del cultivo anaerobio durante 48 horas, calcular el número de clones de cada placa.

Los resultados demuestran que: la tasa adhesiva del *Lactobacillus crispatus* 262-1 a las 4 h es 43,1% y 69,4%, respectivamente; y la tasa adhesiva de la cepa de *Lactobacillus* DJS comercialmente disponible del mismo tipo a las 4 h es 29,2% y 26%, respectivamente; y la fuerza adhesiva de *Lactobacillus crispatus* 262-1 es más alta que la de la cepa de *Lactobacillus* DJS comercialmente disponible del mismo tipo.

III. Experimento de colonización vaginal en macacos Rhesus

Se seleccionan cinco animales sanos para llevar a cabo un agrupamiento aleatorio estratificado basado en el peso y se agrupan en 2 grupos con dos animales en el grupo control (los números de los animales son 1203, 1204) y tres animales en el grupo experimental (los números de los animales son 3211, 3212, 3222), en donde los animales para el experimento son macacos Rhesus de origen chino hembras (*Macaca mulatta*) proporcionados por Suzhou Xishan ZhongKe Laboratory Animal Co., Ltd. El método experimental comprende los siguientes pasos.

Preparación de *Lactobacillus crispatus* 262-1 para la colonización: pesar polvos liofilizados y secos de *Lactobacillus crispatus* 262-1, de modo que la cantidad de colonización es 10<sup>8</sup>; utilizar el adyuvante liofilizado blanco que está exento de *Lactobacillus crispatus* 262-1 para su uso; añadir 0,7 mL del medio líquido MRS, respectivamente, en condiciones asépticas, mezclar uniformemente y absorber el mismo mediante el dispositivo de administración vaginal e implantar desde la vagina.

Modelado y muestreo de colonización: después de observar la menstruación de los macacos Rhesus con ciclo menstrual normal, se administran supositorios de azitromicina (200 mg/macaco Rhesus) a la vagina durante cinco días consecutivos, luego se implantan las bacterias de modelado durante otros 5 días consecutivos; se observa la vagina de los animales semanalmente verificando los colores, los caracteres y las cantidades de secreciones vaginales y midiendo el valor de pH de las secreciones vaginales; y toma de muestras con dos bastoncillos de algodón de poliéster estériles, utilizando un bastoncillo de algodón para el examen microscópico de la limpieza de la secreción vaginal, y utilizando el otro para el análisis de la flora.

Separación y cultivo de purificación de bacterias vaginales: agitar las secreciones vaginales recogidas en 2 mL de solución tampón D-Hanks y realizar la dilución del gradiente con tampón fosfato y recubrir luego el producto en agar de sangre Columbia, agar sangre de alcohol feniletílico, agar MRS y placa de agar seleccionado de *Candida albicans*, respectivamente; y cultivar a 37°C durante 24-48 h en condiciones anaerobias; registrar información tal

como la morfología colonial única y la cantidad de hemolíticos, y volver a revestir la placa de sangre de agar Columbia para obtener la colonia purificada y realizar la identificación bioquímica y molecular.

Identificación del método biológico molecular (análisis de secuencia del gen ADNr 16S): la amplificación de la secuencia de ADNr 16S, la secuenciación y el análisis se realizan en la cepa separada y purificada. En primer lugar, se utiliza un asa de inoculación para recoger la cepa en un tubo de centrifuga que contiene 50 µL de reactivo de preparación de muestras PrepMan Ultra y dividir en calentador de bloque seco a 100°C durante 15 min antes de la conservación como molde de ADN a -20°C; luego, la amplificación en fragmentos de ADNr 16S con secuencias que son SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, respectivamente, se realiza utilizando el par de cebadores universal 8F/926R, en donde R representa G o A; cada uno de los reactivos se añade a 50 µL del sistema de reacción de PCR. El nombre y el volumen de cada uno de los reactivos son Tampón 10xPCR 5 µL, dNTP (10 mM) 1 µL, MgCl<sub>2</sub> (50 mM) 0,5 µL, Platinum Taq ADN polimerasa (5 U) 0,2 µL, Cebador 8F (10 µM) 1 µL, Cebador 926R (10 µM) 1 µL, molde (50 ng/µL) 1 µL, agua desionizada exenta de DNasa/RNasa 39,3 µL. Las condiciones de reacción de PCR se establecen en el siguiente orden: reacción de PCR que consiste en 30 ciclos de desnaturalización previa a 94°C durante 2 min, desnaturalización a 94°C durante 1 min, reasociación a 55°C durante 1 min, extensión a 72°C durante 2 min y se realiza una extensión a 72°C durante 10 min. El producto de PCR obtenido se somete a ensayo con un analizador UV (la solución de carga preparada mediante el producto de PCR ya incluye la tinción) después de la electroforesis a través de gel de agarosa al 1% y se conservan los datos obtenidos.

El producto de amplificación de PCR identificado como fragmento de ADNr 16S se secuencia después de purificar el fragmento diana mediante el método de recuperación de corte de gel. El análisis comparativo se realiza en la secuencia del gen ADNr 16S medida mediante la herramienta BLAST de NCBI y las secuencias conocidas en la base de datos GenBank. Si la homología comparativa es mayor que o igual a 98%, se identifican como la misma especie.

### Resultado experimental y análisis

Observación general de la mucosa y secreciones vaginales: observación sobre una base semanal después de la implantación, en donde el resultado demuestra que no se ha detectado una anomalía clara en todas las secreciones experimentales de la mucosa vaginal en animales.

Determinación del valor de pH de las secreciones vaginales: después del implante del Lactobacillus crispatus 262-1, los valores de pH de la mayoría de las secreciones vaginales de animales en el grupo experimental son significativamente más bajos que los del grupo control, y se reducen significativamente en comparación con los valores anteriores a la implantación. Los resultados de la determinación de los valores de pH se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: resultados de la determinación de los valores de pH de las secreciones

Número de animal	Grupo	Antes de procesamiento	Después del procesamiento y antes de la implantación	El primer día después de suspender la implantación de Lactobacillus crispatus 262-1	El octavo día después de suspender la implantación de Lactobacillus crispatus 262-1	El decimoquinto día después de suspender la implantación de Lactobacillus crispatus 262-1	El vigésimo segundo día después de suspender la implantación de Lactobacillus crispatus 262-1	Veintinueve días después de suspender la implantación de Lactobacillus crispatus 262-1
1203	Control	7,0*	6,5	5,5	6,5	6,5*	6,1*	6,5
1204	Control	4,4	7,0	7,0*	7,0	4,7	5,8*	7,0
3211	Grupo experimental	6,1	7,0*	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
3212	Grupo experimental	7,0	7,0	4,7	4,7	4,7	4,7	4,4
3222	Grupo experimental	5,0	5,0	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4

Nota: \* la parte marcada indica que la menstruación se produce con el animal

5 Limpieza de las secreciones vaginales: las cantidades de bacterias vaginales misceláneas en el grupo control comparadas antes y después de la implantación aumentan significativamente, mientras que la limpieza se reduce; y el grupo experimental muestra que después de la implantación del *Lactobacillus crispatus* 262-1, la limpieza de la descarga vaginal es significativamente superior a la del grupo control. Se puede observar un número diferente de bacillus vaginalis Gram-positivos, y su limpieza es significativamente mayor que la del grupo control. Los resultados de la determinación de la limpieza de las secreciones vaginales se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 Resultados de la determinación de la limpieza de las secreciones vaginales

Número de animal	Grupo	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	El primer día después de suspender la implantación de <i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1	El octavo día después de suspender la implantación de <i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1	El decimoquinto día después de suspender la implantación de <i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1	El vigésimo segundo día después de suspender la implantación de <i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1	El vigésimo noveno día después de suspender la implantación de <i>Lactobacillus crispatus</i> 262-1
			Antes de la implantación					
1203	Control	II *	II	II	II	II*	III*	III
1204	Control	I	I	I*	II	III	II *	II
3211	Grupo experimental	II	I*	I	I	I	I	II
3212	Grupo experimental	I	I	I	I	II	I	I
3222	Grupo experimental	III	III	II	II	II	II	III

Nota: \* la parte marcada indica que la menstruación se produce con el animal

10 Microflora vaginal de macaco Rhesus: se realiza una detección de electroforesis en gel de agarosa al 1% en el producto de fragmentos de ADNr 16S después de la amplificación por PCR; el resultado muestra que una banda se amplifica con éxito por la mayoría de las cepas bacterianas, y la banda de amplificación de ADNr 16S generada de la mayoría de las muestras es clara y cumple con los requisitos de secuenciación. La electroforesis de productos de amplificación por PCR para algunas de las cepas se muestra en la Figura 12 con DL2000 como Marcador. Los tamaños de los fragmentos de los mismos son 2000 pb, 1000 pb, 750 pb, 500 pb, 250 pb, 100 pb en orden decreciente. El análisis muestra que el tamaño del fragmento de ADNr 16S es de aproximadamente 950 pb. El análisis comparativo se realiza en el gen ADNr 16S medido mediante la herramienta BLAST de NCBI y las secuencias conocidas en la base de datos GenBank. Si la homología comparativa es mayor que o igual a 98%, se identifican como la misma especie.

20 El *Lactobacillus crispatus* 262-1 para el ensayo se encuentra en las secreciones vaginales de los 3 animales completos del grupo experimental a través del análisis de flora vaginal, y la información sobre el *Lactobacillus crispatus* 262-1 separado para el ensayo se muestra en la Figura 13. Como se puede ver en la Figura 13, el *Lactobacillus crispatus* 262-1 para el ensayo se encuentra en las secreciones vaginales de todos los animales sometidos a ensayo. La mayoría de los *Lactobacillus crispatus* 262-1 aparecerán en y después del 8º día después de la colonización, lo cual cumple con la regla. Además, el efecto de colonización es altamente significativo, ya que la cantidad es mayor que  $10^7$ /bastoncillo de algodón. Por lo tanto, se puede ver que el *Lactobacillus crispatus* 262-1 puede colonizarse con éxito en las vaginas de macacos Rhesus de China cuando la cantidad de colonización inicial es  $10^9$ .

IV. Impacto en el modelo de *Candida albicans* en vaginas de ratones

30 El experimento de simbiosis se realiza en las vaginas de los ratones ICR hembra de grado de limpieza por *Lactobacillus* y *Candida albicans* para observar el efecto de resistencia del *Lactobacillus crispatus* 262-1 a *Candida albicans*. Después del moldeado de animales, la suspensión de bacterias y el supositorio Daktarin vaginal se vierten en vaginas una vez al día durante un total de 3 días. Los resultados de observación son los siguientes.

(1) Después del moldeado, la solución de irrigación vaginal se retira el 5º y el 10º día, respectivamente; y el recuento de colonias se realiza con *Candida albicans* y *Lactobacillus crispatus*, por favor, véase la Tabla 8.

Tabla 8: resultados de recuento de colonias de todos los grupos de soluciones de irrigación (x10<sup>6</sup> ufc)

Grupos	5 Días Después del Modelado		10 Días Después del Modelado	
	Lactobacillus crispatus 262-1 (x 10 <sup>6</sup> ufc)	Candida albicans (x 10 <sup>6</sup> ufc)	Lactobacillus crispatus 262-1 (x 10 <sup>6</sup> ufc)	Candida albicans (x 10 <sup>6</sup> ufc)
Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1 (x 10 <sup>6</sup> ufc)	11,2	1,86	10,08	0,26
Contraste de Candida albicans	0	6,24	0	6,48
Candida albicans + supositorio de Daktarin	0	0,42	0	0,36

5 Conclusión: la cantidad de bacteria transportada por Candida albicans entre los tres grupos experimentales (Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1, grupo de contraste de Candida albicans, Candida albicans + grupo de supositorio de Daktarin) se somete a un análisis de varianza, el resultado demuestra que durante el primer período de tiempo (5d), en el grupo de Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1 y el grupo de contraste de Candida albicans, P > 0.05 y no existe diferencia estadística; en el grupo de Candida albicans + supositorio de Daktarin y en el grupo de Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1, así como en el grupo de contraste de Candida albicans, P < 0.05 y existe diferencia estadística; y en el grupo de Candida albicans + supositorio de Daktarin y el grupo de Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1, P = 0.033, y también existe diferencia estadística. Durante el segundo período (10d), no existe diferencia estadística entre en el grupo de Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1 y el grupo de Candida albicans + supositorio de Daktarin, sugiriendo que el Lactobacillus crispatus 262-1 tiene efectos curativos de resistir significativamente Candida albicans.

(2) La tinción de schiff con ácido peryódico (PAS) se realiza en la sección patológica de la muestra experimental para observar los resultados especialmente teñidos de la Candida albicans, por favor, véase la Tabla 9.

Tabla 9: estado de infección vaginal con Candida albicans de animales de experimentación en cada uno de los grupos experimentales (sobre una base de animal individual)

Grupo de experimentos	Número de muestras	Tinción específica de PAS* (estado del hongo)			
		+++*	++	+	-
A. grupo de Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1	10	0	5	3	2
B. grupo control de Candida albicans	10	7	3	0	0
D. grupo de Candida albicans + supositorio de Daktarin	10	0	2	4	4

20 El resultado histopatológico especialmente teñido indica que el resultado del grupo de Candida albicans + Lactobacillus crispatus 262-1 es similar al del grupo de Candida albicans + supositorio de Daktarin. Este resultado experimental indica que el Lactobacillus crispatus 262-1 puede utilizarse como un medio suplementario para el tratamiento de enfermedades vaginales provocadas por Candida albicans.

25 **Realización 8:** liofilización del Lactobacillus crispatus 262-1 y estabilidad del polvo liofilizado

30 Con el fin de testar la tasa de supervivencia del Lactobacillus crispatus 262-1 en condiciones de fermentación y liofilización, el Lactobacillus crispatus 262-1 se cultiva en el medio MRS modificado con un valor de pH de 6,0, y un tanque de fermentación BioFlo 110 con un volumen de 1 litro (New Brunswick Scientific) se utiliza para la fermentación. Las bacterias se recogen en el período inicial de la fase estacionaria, en donde el recuento viable es 1,0-1,5 x 10<sup>9</sup> UFC/ml, y las bacterias viables representan más del 90% del recuento total de bacterias. Las bacterias se recogen mediante separación centrífuga y se mezclan con un protector de liofilización (que comprende xilitol, ascorbato, α-tocoferol y tampón fosfato, etcétera) después del lavado con tampón fosfato. Luego, la mezcla se coloca en un liofilizador Virtis Advantage para su liofilización. La muestra se congela a -40°C durante 1-20 horas, y se seca a -40°C bajo vacío durante 2-60 horas y luego se seca a 25°C durante 10-40 horas. Los polvos liofilizados se distribuyen en la bolsa de papel de aluminio con agente de secado y se almacenan a 4°C y a temperatura ambiente (25°C). El recuento total de bacterias y el recuento viable se miden respectivamente mediante recuento de placas y medición de UFC en el día 0, 30 y 180. Cada gramo de polvo liofilizado en el Lactobacillus crispatus 262-1

inicial contiene tanto como 34 billones de bacterias viables ( $3,4 \times 10^{10}$  ufc/g), que tienen la estabilidad de almacenamiento óptima a 4°C. Después de almacenarse a 4°C durante 6 meses, se retiene el 70,6% del recuento viable inicial tal como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10: resultado de la prueba de estabilidad de 6 meses de polvo liofilizado de *Lactobacillus crispatus* 262-1

Condición	Recuento total de bacterias por gramo de polvo liofilizado	Recuento total de bacterias por gramo de polvo liofilizado	Tasa de bacterias viables /%
0 meses	$8,5 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$	40,0
1 mes, 4°C	$8,4 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^{10}$	36,9
1 mes, temperatura ambiente	$8,1 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$	22,2
6 meses, 4°C	$7,8 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^{10}$	30,8
6 meses, temperatura ambiente	$4,0 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^{10}$	14,5

5

**Realización 9:** preparación del inóculo tipo cápsula de *Lactobacillus crispatus* 262-1, los pasos son los siguientes:

(1) se toman las semillas de *Lactobacillus crispatus* 262-1 líquido congelado o semillas originales de -70°C y se inoculan en 30 mL de medio MRS líquido, que se cultiva en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 h;

10

(2) se toma la cantidad apropiada de bacterias líquidas en (1) y se añade en 500 ml de solución de cultivo de fermentación, que se cultiva en 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 24 h;

(3) una cantidad apropiada de solución de cultivo de fermentación se añade en un tanque de fermentación de 50 L, y se esteriliza a alta presión durante 20 min;

15

(4) el líquido de bacterias se inocula en la solución de cultivo de fermentación en el tanque de fermentación, la concentración del líquido de bacterias de partida se controla como un valor DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0,4, pH 6,0, se añade una cantidad apropiada de nitrógeno a 37°C y el tiempo de fermentación es aproximadamente 8-10 h;

(5) el producto de fermentación se recoge de forma centrífuga, el líquido protector liofilizado del microorganismo se añade para preparar la suspensión de bacterias, y la concentración de bacterias se determina y ajusta a  $1,0-1,5 \times 10^9$  UFC/ml; y

20

(6) la suspensión de bacterias mencionada anteriormente se transfiere a la placa de liofilización del secador de liofilización que se comienza a secar en vacío durante 48 horas, después de que finaliza el secado, la suspensión de bacterias se pulveriza y se introduce en cápsulas.

En la implementación concreta, la escala de cultivo puede ampliarse o reducirse de acuerdo con el volumen del producto a obtener.

**Realización 10:** preparación del inóculo de tipo líquido de *Lactobacillus crispatus* 262-1

25

Los pasos de preparación son los mismos que los pasos (1) - (5) en la realización 9; y la diferencia con la realización 9 es que la solución de cultivo obtenida por fermentación en la etapa (5) se descarga del tanque, y se distribuye directamente en forma de dosificación líquida utilizando barriles de embalaje de plástico o botellas de envasado.

30

A la vista de los datos anteriores, se puede ver que el *Lactobacillus crispatus* 262-1 es estable en el pasaje, es consistente en morfología, propiedades bioquímicas, características hereditarias, metabolismo y característica de sensibilidad del fármaco para cada una de las generaciones, y puede generar ácido láctico y peróxido de hidrógeno, que contribuyen a mantener el equilibrio micro-ecológico en las vaginas; es no tóxico y seguro, y tiene buena biocompatibilidad; tiene un buen efecto de inhibición sobre *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Candida albicans* y bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* en la vagina; tiene una fuerte capacidad de colonización vaginal y un buen resultado de mejora en los micro-entornos vaginales tales como el pH y la limpieza; y puede obviamente inhibir *Candida albicans* y tiene un efecto terapéutico similar al del supositorio de Daktarin, lo que sugiere que el *Lactobacillus crispatus* puede utilizarse como el medio complementario para el tratamiento de enfermedades vaginales debidas a *Candida albicans*; el inoculante, hecho tomando las cepas como ingredientes activos, tiene una alta tasa de bacterias, buena estabilidad y un almacenamiento conveniente.

40

Estos datos demuestran que la adición de *Lactobacillus crispatus* 262-1 o inóculo hecho de este modo al producto cosmético o desinfectante para el uso en la vulva, y al producto relacionado en contacto con la vagina, tal como material o revestimiento de instrumentos médicos, permite que *Lactobacillus crispatus* 262-1 mejore y regule el

micro-entorno vaginal e inhiba las bacterias patógenas vaginales, y mientras tanto, el *Lactobacillus crispatus* 262-1 tiene buena biocompatibilidad y es seguro y no tóxico, desempeña un papel importante en el saneamiento y cuidado de la vulva femenina y, además, tiene un gran potencial de aplicación en el desarrollo de un producto que es a la vez de saneamiento garantizado y bueno para la salud de las mujeres.

5 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Suzhou Oswkbio Biopharmaceutical Technology Co., Ltd.

<120> Un *Lactobacillus crispatus* y su aplicación

<130> 1

10 <150> CN201310551661.9  
<151> 08-11-2013

<150> CN201310551630.3  
<151> 08-11-2013

15 <150> CN201310731833.0  
<151> 26-12-2013

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 919

20 <212> ADN

<213> *Lactobacillus crispatus* (*Lactobacillus Crispatus*)

<400> 1

cttgagtttc aacctgctgg tcgtactccc caggcggagt gcttaatgcg ttagctgcag 60

cactgagagg cggaaacctc ccaacactta gcactcatcg ttacggcat ggactaccag 120

ggtatctaat cctgtctgct acctatgctt tcgagcctca gcgtcagttg cagaccagag 180

agccgccttc gccactggtg ttctccata tatctacgca ttccaccgct acacatggag 240

ttcactctc ctctctgca ctcaagaaaa acagtttccg atgcagtcc tcggtaagc 300

cgagggttt cacatcagac ttattctcc gcctgcgctc gctttacgcc caataaatcc 360

ggacaacgct tgccacctac gtattaccgc ggctgctggc acgtagttag ccgtgacttt 420

# ES 2 670 536 T3

ctggttgatt accgcaaat aaaggccagt tactacctct atccttctc accaacaaca 480  
gagctttacg atccgaaaac ctcttctact cacgcgcgct tgcctcatca gacttgcgct 540  
cattgtggaa gattccctac tgctgcctcc cgtaggagtt tgggcccgtgt ctcagtccca 600  
atgtggcoga tcagtctctc aactcggcta tgcacatcg ccttgtaag cctttacctt 660  
accaactagc taatgcaccg cggggccatc ccatagcgac agcttacgcc gccttttaaa 720  
agctgatcat gcgatctgt ttctatccg gtattagcac ctgtttcaa gtggtatccc 780  
agactatggg gcaggttccc cacgtgttac tcacccatcc gccgctcgct ttctaaact 840  
cattaccgaa gtaaatctgt tagttccgct cgctcgactt gcatgtatta ggcacgccgc 900  
cagcgttcgt cctgagcag 919

<210> 2  
<211> 898  
<212> ADN

5 <213> Lactobacillus crispatus (Lactobacillus Crispatus)

<400> 2

cgggcgggtg ctatctgca gtcgagcgag cggaaactaac agatttactt cggtaatgac 60  
gttaggaaag cgagcggcgg atgggtgagt aacacgtggg gaacctgccc catagtctgg 120  
gataccactt ggaacaggt gctaataccg gataagaaag cagatcgcat gatcagcttt 180  
taaaaggcgg cgtaagctgt cgctatggga tggccccgcg gtgcattagc tagttggtaa 240  
ggtaaaggct taccaaggcg atgatcata gccgagtga gagactgatc ggccacattg 300  
ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga 360  
cgcaagtctg atggagcaac gcccgctgag tgaagaaggt ttccggatcg taaagctctg 420

## ES 2 670 536 T3

ttgttggtga agaaggatag aggtagtaac tggcctttat ttgacggtaa tcaaccagaa 480  
agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgtgtccgg 540  
atttattggg cgtaaagcga ggcagggcgg aagaataagt ctgatgtgaa agccctcggc 600  
ttaaccgagg aactgcatcg gaaactgttt ttctgagtg cagaagagga gagtggaact 660  
ccatgtgtag cggtggaatg cgtagatata tggaagaaca ccagtggcga aggcggctct 720  
ctggctgca actgacgtg aggctcgaaa gcatgggtag cgaacaggat tagataccct 780  
ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcta agtgttggga ggtttccgcc tctcagtct 840  
gcagctaacg cattaagcac tccgctggg gagtacgacc gcaaggtga actcaggg 898

<210> 3

<211> 897

<212> ADN

5 <213> *Lactobacillus crispatus* (*Lactobacillus Crispatus*)

<400> 3

ccattcgtg ctataatgca gtcgagcgag cggaactaac agatttact cggtaatgac 60  
glttaggaaag cgagcggcgg atgggtgagt aacacgtggg gaacctgcc catagtctgg 120  
gataccactt ggaacaggt gctaataccg gataagaag cagatcgcat gatcagcttt 180  
taaaagggcg cgtaagctgt cgctatggga tggccccgcg gtgcattagc tagttggtaa 240  
ggtaaaggct taccaaggcg atgatgcata gccgagtga gagactgatc ggccacattg 300  
ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga 360  
cgcaagtctg atggagcaac gccgcgtgag tgaagaagg ttcggatcg taaagctctg 420  
ttgttggtga agaaggatag aggtagtaac tggcctttat ttgacggtaa tcaaccagaa 480  
agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgtgtccgg 540  
atttattggg cgtaaagcga ggcagggcgg aagaataagt ctgatgtgaa agccctcggc 600  
ttaaccgagg aactgcatcg gaaactgttt ttctgagtg cagaagagga gagtggaact 660  
ccatgtgtag cggtggaatg cgtagatata tggaagaaca ccagtggcga aggcggctct 720  
ctggctgca actgacgtg aggctcgaaa gcatgggtag cgaacaggat tagataccct 780  
ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcta agtgttggga ggtttccgcc tctcagtct 840  
gcagctaacg cattaagcac tccgctggg gagtacgacc gcaaggtga actcaga 897

## ES 2 670 536 T3

<210> 4  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial 5'-3'

5 <400> 4  
agagttgat cctggctcag 20

<210> 5  
<211> 20  
<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial 5'-3'

<400> 5  
ccgtcaatt cctttragtt 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un *Lactobacillus crispatus* separado, en donde el *Lactobacillus crispatus* se denomina *Lactobacillus crispatus* 262-1, conservado en el Centro General de Recolección de Cultivos Microbiológicos de China con un número de conservación de CGMCC N° 6469.
- 5 2. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como productos farmacéuticos para inhibir bacterias patógenas vaginales.
3. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde las bacterias patógenas comprenden *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Atopobium vaginae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Salmonella*.
- 10 4. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como productos farmacéuticos para prevenir y/o tratar una enfermedad vaginal.
5. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la enfermedad vaginal es candidiasis vulvovaginal, vaginitis por tricomonas, vaginitis senil, infección vaginal no específica o infección vaginal mixta.
- 15 6. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como productos farmacéuticos para regular el equilibrio de la flora vaginal.
7. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como productos farmacéuticos con la función de adhesión a células epiteliales vaginales.
8. Uso del *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en instrumentos médicos ginecológicos.
- 20 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los instrumentos médicos comprenden colposcopios, colposcopios de auto-chequeo ginecológicos, dilatadores vaginales, espéculos vaginales, aparatos terapéuticos para enfermedades inflamatorias de la pelvis ginecológicas, irrigadores ginecológicos o dispositivos antibacterianos para uso ginecológico externo.
10. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en la desinfección ginecológica.
- 25 11. El *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la desinfección ginecológica se realiza con los productos de desinfección que comprenden desinfectantes de la mucosa, pastas desinfectantes de la mucosa, almohadillas de desinfección ginecológicas, tejidos de desinfección ginecológicos, geles antibacterianos para uso externo ginecológico, ungüentos antibacterianos para uso externo ginecológico o desinfectadores ginecológicos.
- 30 12. Un cosmético para la vagina femenina, que comprende el *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1.
13. El cosmético de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el cosmético comprende soluciones para el cuidado de la vagina femenina, cremas para el cuidado de la vagina femenina, pastas para el cuidado de la vagina femenina, máscaras para el cuidado de la vagina femenina o gel de baño.
- 35 14. Un inoculante, preparado al utilizar el *Lactobacillus crispatus* 262-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ingrediente activo del inoculante es el *Lactobacillus crispatus* 262-1.
15. El inoculante de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el inoculante está en un estado líquido, un estado sólido o un estado de gel.

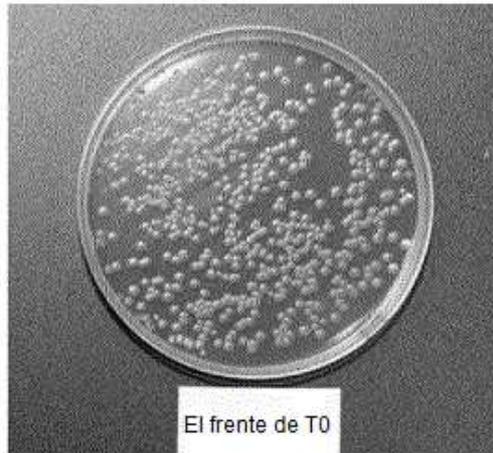


Figura 1A

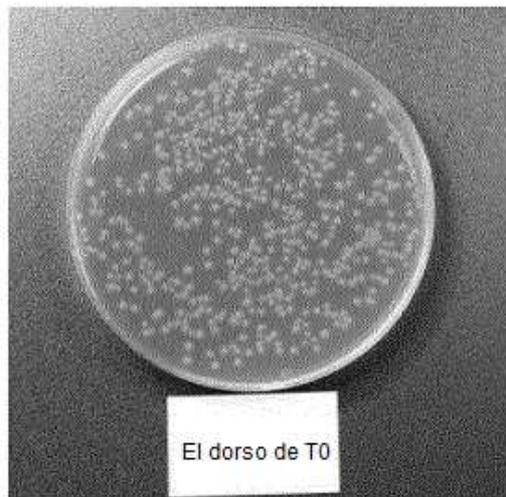


Figura 1B

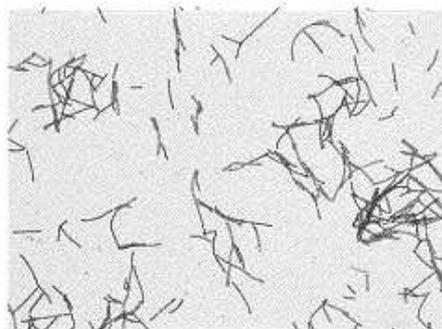


Figura 2

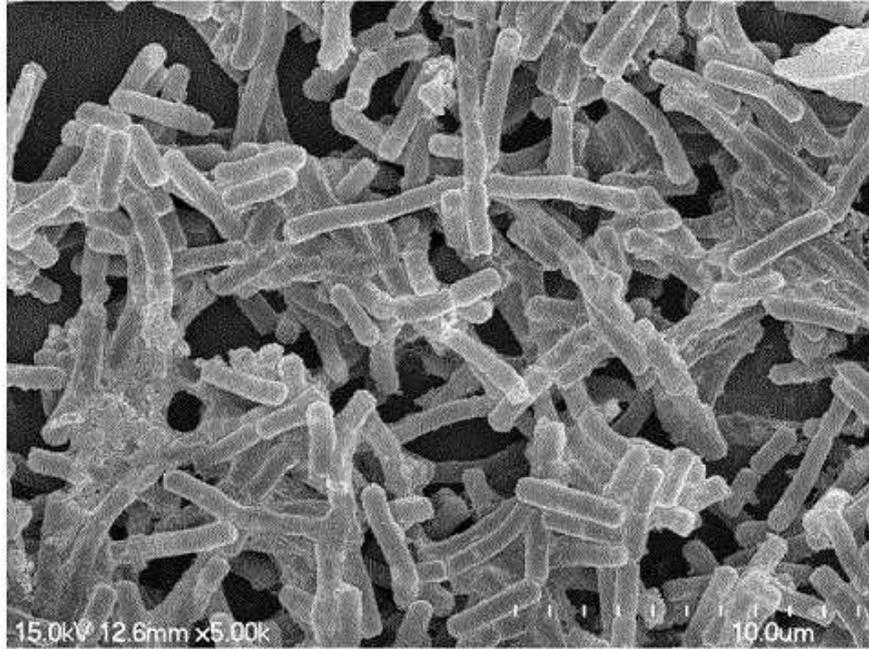


Figura 3A

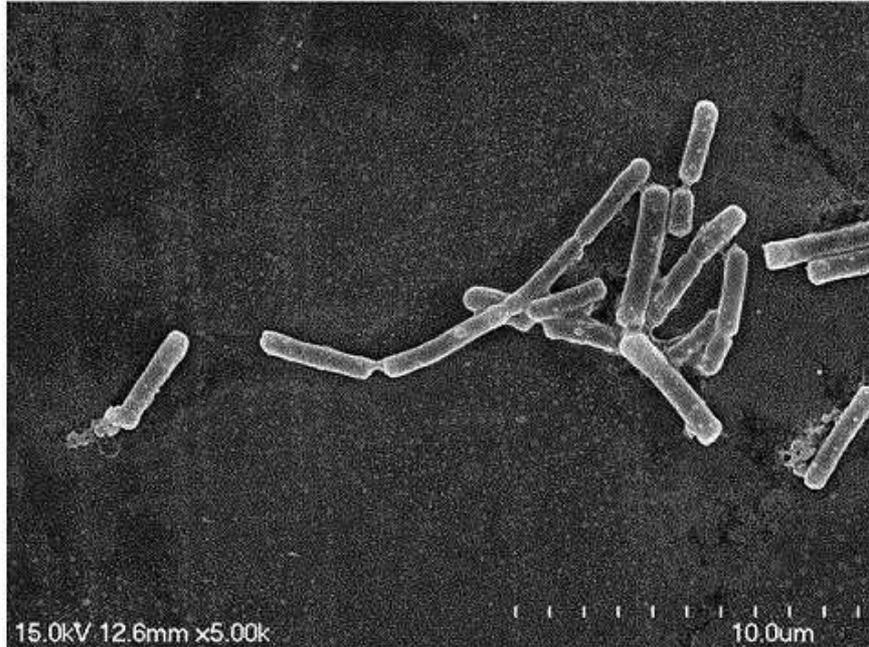


Figura 3B

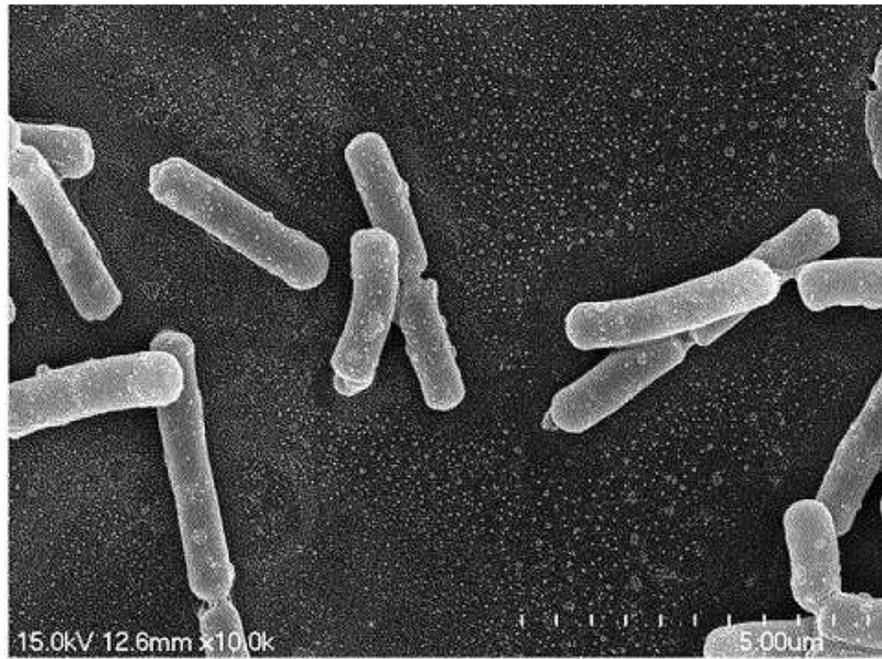


Figura 3C

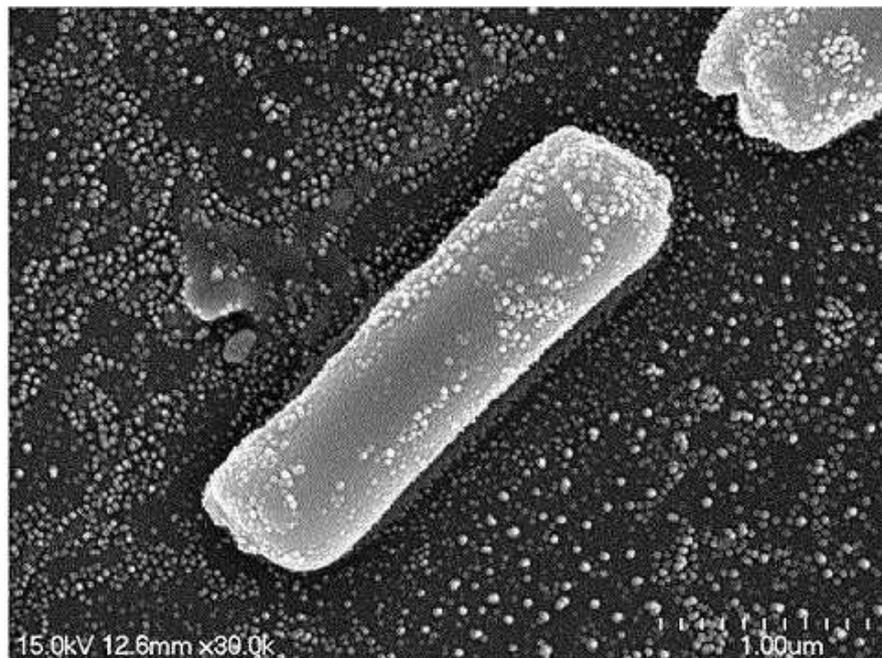


Figura 3D

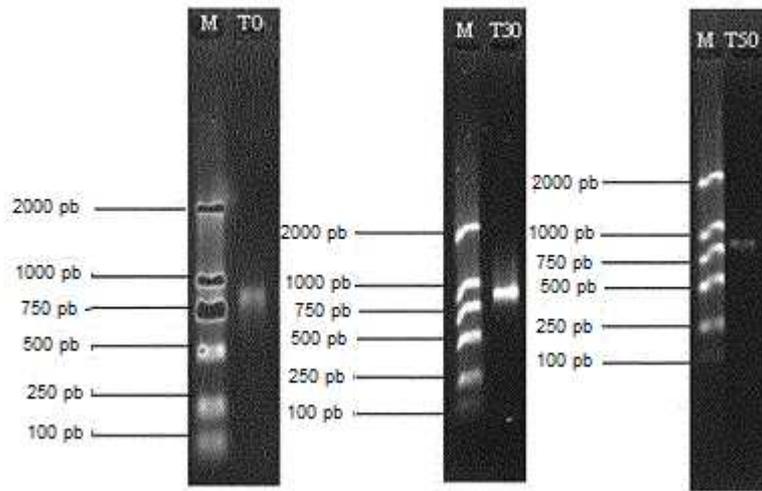


Figura 4

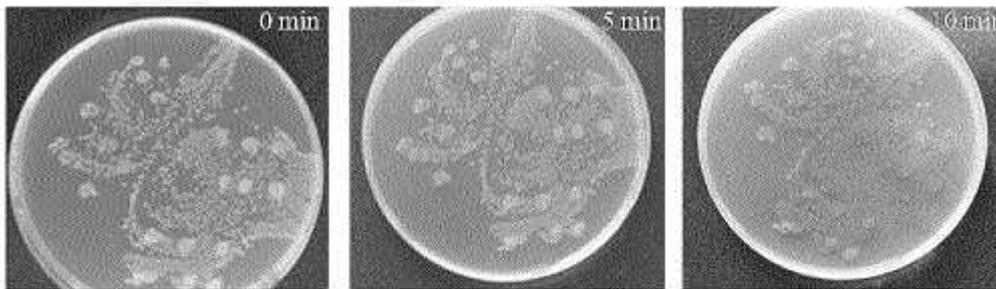


Figura 5

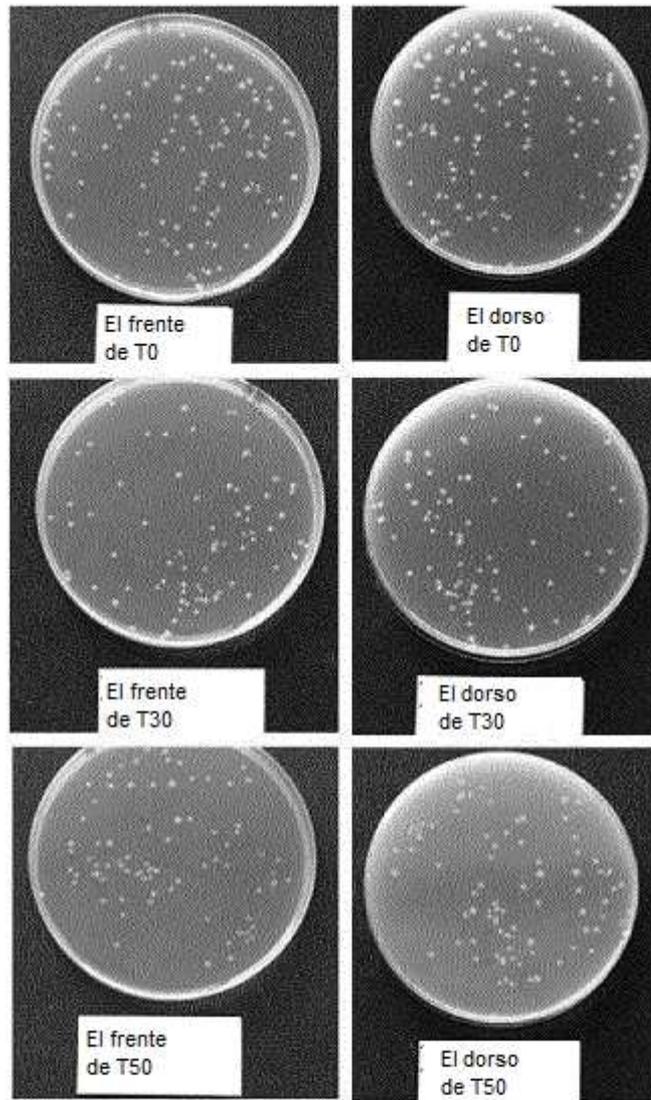


Figura 6

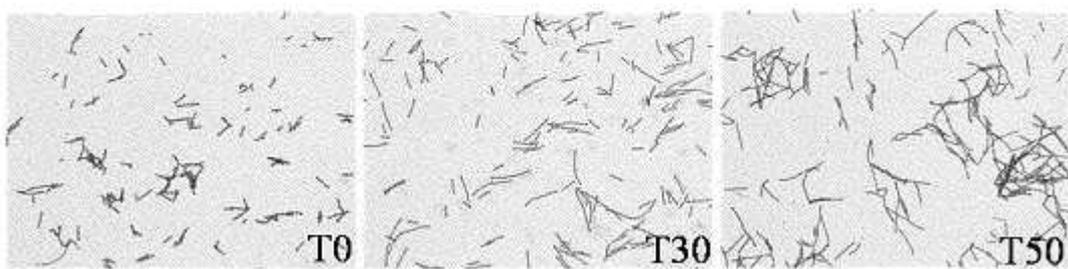


Figura 7

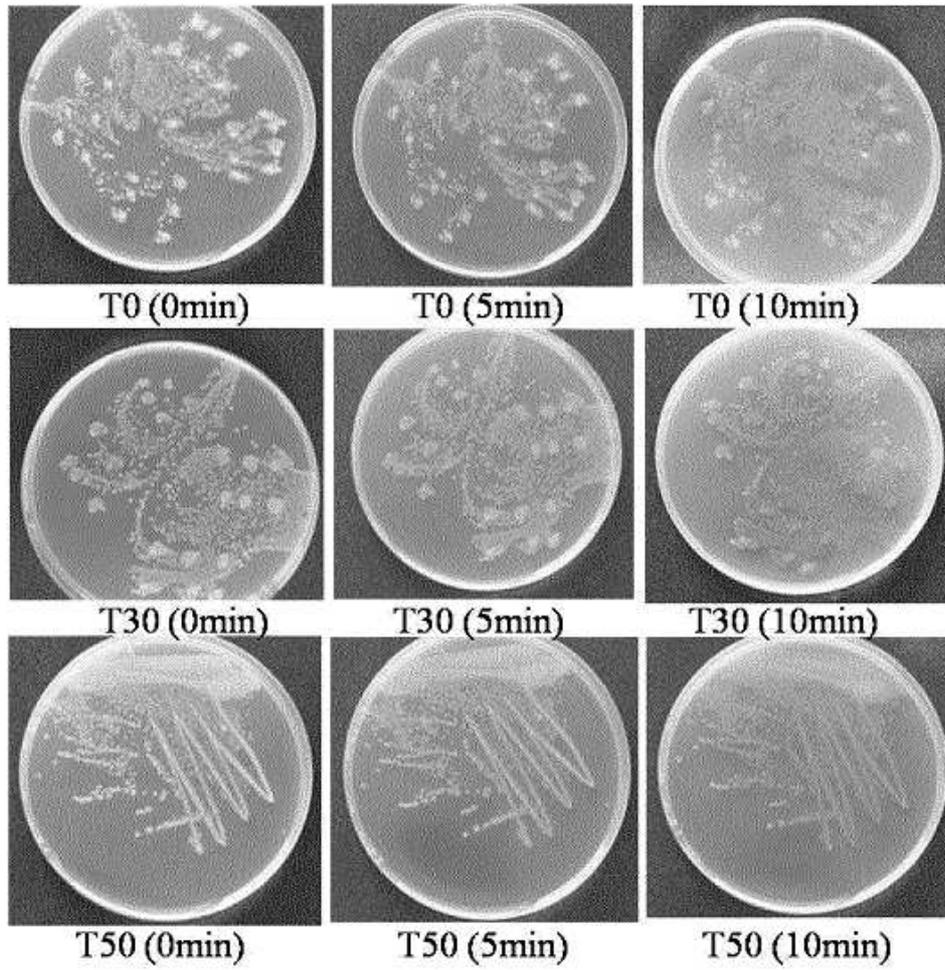


Figura 8

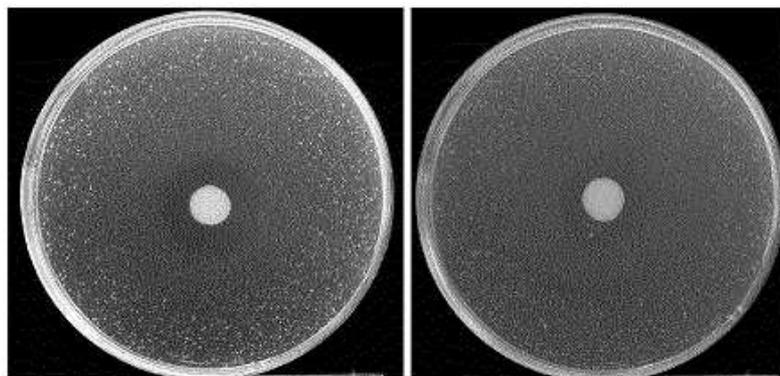


Figura 9

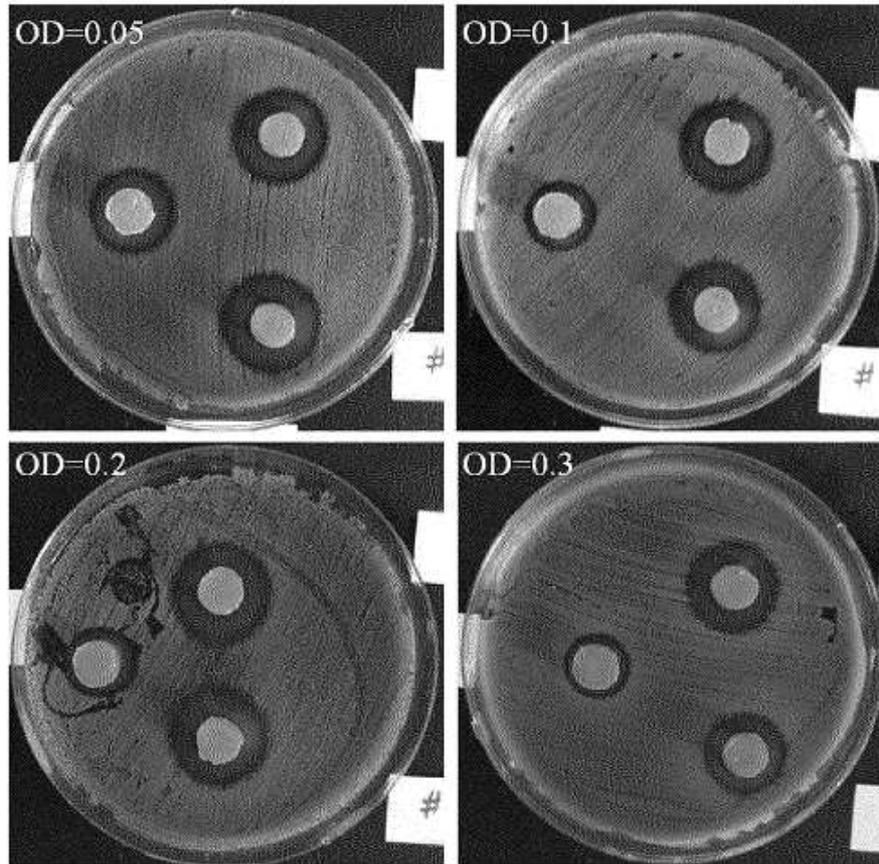


Figura 10

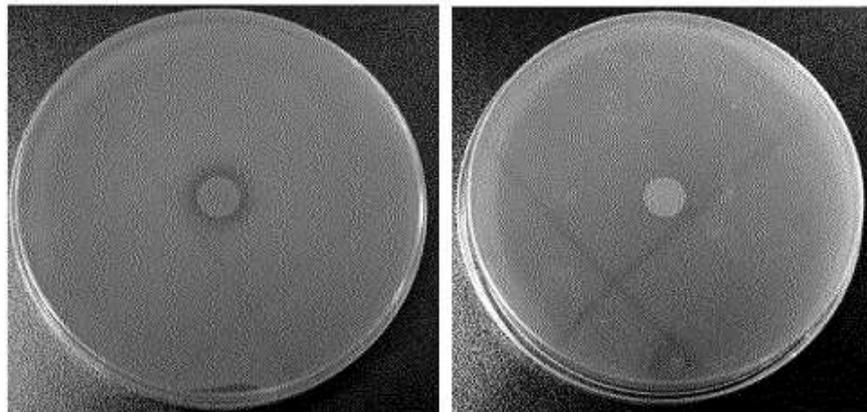


Figura 11

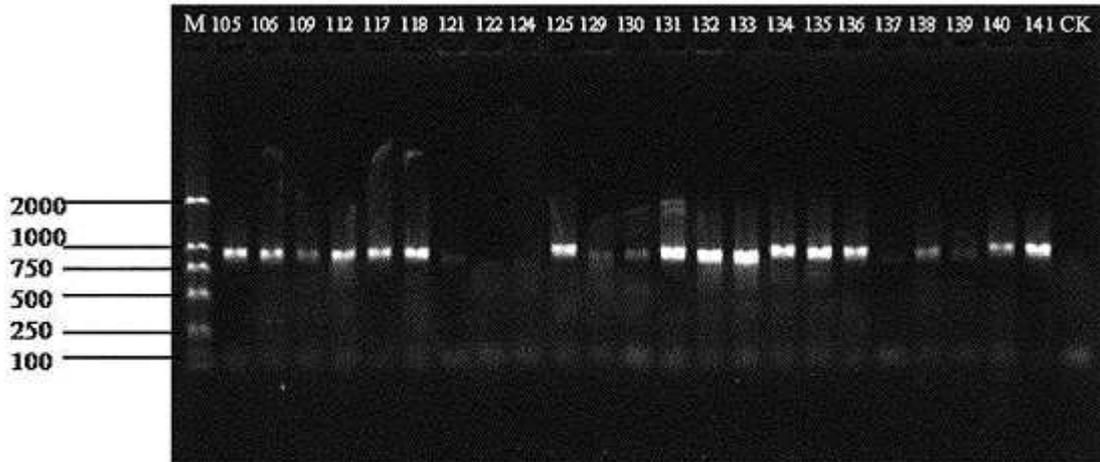


Figura 12

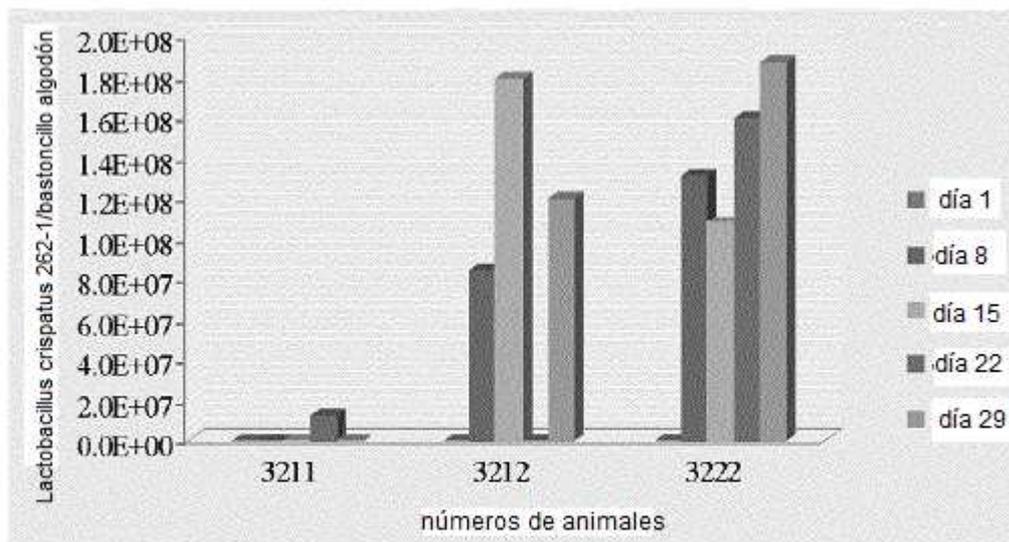


Figura 13