

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 979**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/02 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2016** **PCT/EP2016/065074**
87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017** **WO17001440**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2016** **E 16732665 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 3313424**

54 Título: **Bacteria Lactobacillus rhamnosus para el tratamiento de, por ejemplo, la vaginosis bacteriana**

30 Prioridad:

29.06.2015 WO PCT/EP2015/174222

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2020

73 Titular/es:

FERRING BV (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:

CHENOLL CUADROS, MARÍA EMPAR;
CASINOS RAMO, BEATRIZ;
SILVA ANGULO, ÁNGELA;
RAMÓN VIDAL, DANIEL y
GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 740 979 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

Bacteria *Lactobacillus rhamnosus* para el tratamiento de, por ejemplo, la vaginosis bacteriana

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una novedosa bacteria del ácido láctico *Lactobacillus rhamnosus* adecuada para el tratamiento de, por ejemplo, la vaginosis bacteriana.

TÉCNICA ANTERIOR

10 La vaginosis bacteriana (VB) es uno de los trastornos más frecuentes en mujeres en edad de procrear. De acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los EE. UU., los factores de riesgo de la VB incluyen las irrigaciones vaginales y tener parejas sexuales nuevas o múltiples. La BV es causada por un desequilibrio de la microbiota bacteriana natural y se puede caracterizar microbiológicamente por el reemplazo de la microbiota vaginal predominantemente de lactobacilos por potenciales bacterias vaginales patógenas. El cambio de una microbiota saludable dominada por lactobacilos que producen H₂O₂ y ácido láctico a una compleja microbiota multiespecie se puede producir con relativa rapidez y dar como resultado una VB.

15 Como se analiza en, por ejemplo, el documento EP0257007 (presentado en 1987), se ha sabido desde hace mucho tiempo que la vaginosis bacteriana (VB) se acompaña de un aumento del pH (elevación del pH normal/saludable de aproximadamente 4 a un pH por encima de 4,5) y una disbiosis microbiana en la que la microbiota vaginal de *Lactobacillus*, normalmente dominante se ve sobrepasada por un sobrecrecimiento de microorganismos predominantemente anaerobios.

20 El documento EP2509610B1 (HSO Health Care, Viena - presentado el 13/09/2011 y publicado/otorgado en 2013) proporciona un resumen de la técnica anterior de los antecedentes pertinentes del presente documento.

25 Como se analiza en el documento EP2509610B1, la vagina humana sana está dominada por una variedad de especies de *Lactobacillus*, que desempeñan un papel esencial en la protección de las mujeres contra la infección genitourinaria. Los lactobacilos tienen la capacidad de adherirse a los epitelios vaginales, inhibir la adherencia y el crecimiento de patógenos, reducir los nutrientes disponibles de otro modo para los patógenos y modular la respuesta inmunitaria del huésped y el microentorno. Lo más importante es que los lactobacilos metabolizan el glucógeno contenido en las células de la cúpula vaginal, formando ácido láctico como producto final. Por tanto, en una vagina saludable, se alcanzan valores de pH de alrededor de 4,0, un nivel en el que muchos patógenos no pueden crecer.

30 Cuando se administra a una mujer en forma de una composición farmacéutica (por ejemplo, cápsulas vaginales para administración vaginal), el efecto protector de los lactobacilos contra patógenos potenciales en la vagina se genera a través de la actividad metabólica de los lactobacilos. Las bacterias consumen glucógeno y otras fuentes de glucosa y producen ácido láctico. El bajo pH generado de esta manera es perjudicial para las bacterias y hongos menos deseables y, por tanto, protege la mucosa vaginal contra las infecciones.

35 Debido a que la infección vaginal es un mecanismo importante de enfermedad responsable del parto prematuro, mantener el equilibrio natural y saludable de la microbiota de *Lactobacillus* en la vagina es en particular importante durante el embarazo. Una carencia de lactobacilos puede alterar el equilibrio microbiano en la vagina, lo que con frecuencia da como resultado el síndrome de vaginosis bacteriana, que se puede asociar con un cambio cuantitativo y cualitativo de los lactobacilos que se producen normalmente a una microbiota mixta dominada por bacterias anaerobias. De acuerdo con la técnica, la vaginosis bacteriana se puede caracterizar por una pérdida completa de lactobacilos y un aumento concomitante en los bacilos gramvariables y gramnegativos, principalmente entre ellos *Gardnerella vaginalis* así como *Bacteroides*, *Prevotella* y *Mobiluncus*. Sin embargo, la pérdida de lactobacilos vaginales también deja a las mujeres no gestantes susceptibles a la infección, lo que puede dar como resultado una endometritis o incluso una enfermedad inflamatoria pélvica.

40 Durante la menopausia, se produce una involución del aparato genital femenino, lo que refleja posiblemente una esperanza de vida biológica integrada interrelacionada con el eje endocrino neurohipofisario. El principal cambio universal es la atrofia vaginal. La sequedad vaginal, el ardor, el prurito y la dispareunia son síntomas frecuentes junto con la disuria, la polaquiuria y las infecciones recurrentes. La atrofia genitourinaria después de la menopausia se asocia con una disminución de la secreción de estrógenos acompañada por la disminución de los lactobacilos y el aumento de la colonización por microorganismos patógenos asociados con la vaginosis bacteriana y las infecciones urinarias. En mujeres posmenopáusicas, el tratamiento vaginal con estriol reduce la colonización por *Escherichia coli* y aumenta el número de lactobacilos, con el resultado de que la incidencia de infecciones urinarias y genitales recurrentes cae significativamente.

Se ha descrito que diversas especies de *Lactobacillus* pueblan la vagina en diversos grados. Durante algún tiempo se creyó que la microbiota de las mujeres sanas en edad fértil estaba dominada por *L. acidophilus* y *L. fermentum*, seguida de *L. brevis*, *L. jensenii* y *L. casei*. En otro estudio sobre la microbiota vaginal de *Lactobacillus*, los autores encontraron que la microbiota vaginal de la mayoría de las participantes estaba dominada por una única especie de *Lactobacillus*, y la presencia de otras especies mostraba una gran variabilidad individual. Las especies más frecuentes fueron *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*. En otro estudio, las cepas de *Lactobacillus* más frecuentemente aisladas fueron *L. jensenii*, *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. gasseri*. En recientes estudios austriacos, las especies de *Lactobacillus* predominantes identificadas por PCR específica de la especie, a saber, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. rhamnosus*, se usaron para generar huellas genéticas. *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. rhamnosus* se pueden considerar las especies predominantes en la vagina.

Para remediar las deficiencias en la microbiota de *Lactobacillus* (y, por consiguiente, en la capacidad protectora de la microbiota vaginal), la administración de óvulos vaginales que contienen lactobacilos es la forma más frecuente de sustitución de lactobacilos. Algunos autores creen que el uso tópico de lactobacilos es un tratamiento seguro y prometedor para la prevención de la vaginosis y las infecciones urinarias recurrentes.

Si bien la suplementación vaginal es una práctica que viene de antiguo y ampliamente aceptada para la sustitución de lactobacilos, la administración oral de un preparado de *Lactobacillus* representa un nuevo concepto para la restitución de una microbiota vaginal normal. Los resultados relativamente recientes indican que las cepas probióticas *L. rhamnosus* GR-1 (ATCC 55826) y *L. reuteri* RC-14 (ATCC 55845) se pueden tomar por vía oral diariamente durante dos meses sin ningún efecto secundario. El consumo dio como resultado una mejora significativa de la microbiota vaginal en términos de aumento de la presencia de lactobacilos y disminución de levaduras y coliformes. Mientras que un grupo de autores analizó los efectos beneficiosos en términos de una alteración en la inmunidad de la mucosa o del ascenso de bacterias probióticas a la vagina desde el área rectal, otro grupo demostró recientemente, por amplificación por PCR específica de la especie, que *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 se pueden proporcionar al entorno vaginal cuando se administran por vía oral.

En vista de la técnica anterior analizada anteriormente, la invención como se describe en el documento EP2509610B1 se refiere al uso de una combinación de cepas depositadas específicas de *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *L. jensenii* y/o *L. gasseri* para el tratamiento de la vaginosis bacteriana (VB). En la tabla 11 en la página 15 se muestra que, por ejemplo, la *L. rhamnosus* depositada (DSM22560) tiene una capacidad relativamente buena para reducir el pH.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

El problema que se va a resolver por la presente invención es proporcionar una novedosa cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con buenas propiedades, en particular en relación con el tratamiento de infecciones vaginales y genitales y genitourinarias vaginales femeninas y/o infecciones urinarias causadas por carencia de *Lactobacillus* (tal como, por ejemplo, la vaginosis bacteriana).

Como se puede observar en los ejemplos de trabajo a continuación, la novedosa cepa de *L. rhamnosus* descrita en el presente documento con el número de registro CECT 8800 (en el presente documento también denominada BPL005) tiene una serie de buenas/mejoradas en particular en relación con el tratamiento de, por ejemplo, la vaginosis bacteriana.

Los resultados del ejemplo de trabajo 1 en el presente documento demostraron las siguientes características positivas pertinentes de la cepa de *L. rhamnosus* aislada CECT 8800 (= BPL005):

1: Se aisló *de novo* de cepas aisladas de la vagina de mujeres sanas, es decir, no hay razón obvia para creer que no sea una cepa novedosa como tal;

2: El perfil de ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD) demostró que la cepa es diferente de las otras y la secuenciación del ARNr de 16S mostró que BPL005 es una cepa única de *L. rhamnosus*;

3: BPL005 tenía la mayor capacidad de las cepas aisladas de la vagina para reducir los niveles de pH;

4: En ensayos sin control de pH, BPL005 proporcionó un rápido efecto de disminución del pH. La rápida producción de ácido láctico en el caso de la cepa BPL005 concuerda con su alta capacidad para reducir el pH en poco tiempo. Respecto a la producción del resto de ácidos, la cepa BPL005 fue la mejor productora de las cepas sometidas a prueba;

5: Con respecto a la resistencia a los productos comerciales ginecológicos, la cepa BPL005 fue resistente a la concentración más alta sometida a prueba y no se observaron inhibiciones;

6: La secuenciación genómica del genoma completo de la cepa BPL005 mostró que tenía un contig único de 3,023 Mb, es decir, la secuencia del genoma no era una secuencia descrita en la técnica anterior.

Como se analiza anteriormente, se ha sabido desde hace mucho tiempo que la vaginosis bacteriana (VB) se acompaña de un aumento del pH (elevación del pH normal/saludable de aproximadamente 4 a un pH por encima de 4,5) y una disbiosis microbiana en la que la microbiota vaginal de *Lactobacillus*, normalmente dominante se ve sobrepasada por un sobrecrecimiento de microorganismos predominantemente anaerobios.

En consecuencia, el hecho de que la novedosa cepa CECT 8800 (= BPL005) *L. rhamnosus* descrita en el presente documento tenga una muy buena capacidad para reducir los niveles de pH es importante en relación con el uso de la cepa para el tratamiento de, por ejemplo, la vaginosis bacteriana.

En resumen y sin limitarse a la teoría, en base a las buenas propiedades descritas en el presente documento de la novedosa cepa de *C. rhamnosus* CECT 8800 (= BPL005) *L.* descrita en el presente documento, no hay razón para creer que no sería útil para el tratamiento de las infecciones vaginales y genitales y genitourinarias femeninas y/o las infecciones urinarias causadas por una carencia de *Lactobacillus* (por ejemplo, la vaginosis bacteriana).

Los resultados del ejemplo de trabajo 2 en el presente documento mostraron que la cepa BPL005 tenía niveles similares de reducción del pH que los mejores probióticos sometidos a prueba de productos probióticos ginecológicos comerciales pertinentes en el presente documento.

Los resultados del ejemplo de trabajo 3 en el presente documento mostraron una buena eficacia de la cepa BPL005 en el procedimiento de producción a escala de laboratorio (volumen 1 l) y los datos del polvo liofilizado elaborado mostraron que la cepa BPL005 ha obtenido una buena estabilidad en un período de 15 meses.

Los resultados del ejemplo de trabajo 4 en el presente documento mostraron una buena eficacia de la cepa BPL005 en el procedimiento de producción a escala industrial (volumen 1500 l) y los datos del polvo liofilizado elaborado mostraron que la cepa BPL005 ha obtenido una muy buena estabilidad.

Para poder fabricar un producto comercial pertinente en el presente documento, es evidente que es una ventaja que la cepa de *Lactobacillus* se puede producir apropiadamente a escala industrial; en consecuencia, el ejemplo de trabajo 4 del presente documento demuestra otras propiedades ventajosas de la novedosa cepa de *L. rhamnosus* CECT 8800 (= BPL005) descrita en el presente documento.

En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a una bacteria *L. rhamnosus* de ácido láctico con el número de registro CECT 8800 (en el presente documento también denominada BPL005) o un mutante de la misma, en el que la cepa mutante se obtiene usando la cepa depositada como material de partida, y en el que el mutante ha retenido o mejorado aún más la capacidad de reducir los niveles de pH de CECT 8800.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición dietética o farmacéutica que comprende la bacteria del primer aspecto y/o cualquier modo de realización de la misma descrito en el presente documento.

El término "dietético" se refiere de acuerdo con la técnica a la dieta o la regulación del aporte de alimentos o piensos. En consecuencia, una composición dietética es una composición que es adecuada para añadirse a un producto alimenticio para un ser humano o un producto alimenticio para un animal.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición dietética o farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto y/o cualquier modo de realización de la misma descrita en el presente documento, para su uso en el tratamiento de un trastorno en una mujer, en el que el trastorno es un desequilibrio de la microbiota bacteriana vaginal natural, una infección vaginal, una infección genital femenina, una infección genitourinaria o una infección urinaria.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un producto lácteo, un producto de bebida, un producto alimenticio para nutrición humana y/o un producto de pienso para nutrición animal caracterizado por que el producto contiene una composición dietética de acuerdo con el segundo aspecto y/o cualquier modo de realización del mismo descrito en el presente documento.

A continuación se describe un modo de realización de la presente invención, solo a modo de ejemplos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Novedosa cepa de *Lactobacillus rhamnosus*

Una muestra de la novedosa cepa de *Lactobacillus rhamnosus* BPL005 se ha depositado en CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) con el número de acceso CECT 8800 con una fecha de depósito del 15 de diciembre de 2014. El depósito se ha realizado en las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los propósitos del procedimiento de patentes.

El primer aspecto de la invención se refiere a la novedosa cepa descrita en el presente documento o "un mutante de la misma".

Está claro para el experto que, usando la cepa depositada como material de partida, el lector experto puede, mediante mutagénesis convencional o técnicas de aislamiento, obtener de forma rutinaria otros mutantes o derivados de los mismos que conserven los rasgos característicos y ventajas pertinentes descritos en el presente documento. En consecuencia, el término "un mutante de la misma" del primer aspecto se refiere a cepas mutantes obtenidas usando la cepa depositada como material de partida.

Expresado de forma alternativa, la invención se refiere a un procedimiento para obtener una cepa mutante de la bacteria *L. rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800 que comprende las siguientes etapas:

(i): preparar mutantes de la bacteria *L. rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800;

(ii): analizar los mutantes preparados en la etapa (i) e identificar una cepa mutante que haya retenido o mejorado aún más la capacidad de CECT 8800 para reducir los niveles de pH; y

(iii): aislar la cepa mutante identificada en la etapa (ii) para obtener de este modo la cepa mutante de la bacteria *L. rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800, en el que la cepa mutante ha retenido o mejorado aún más la capacidad de CECT 8800 para reducir los niveles de pH.

Preferentemente, el primer aspecto se refiere a una bacteria *L. rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800 (en el presente documento también denominada BPL005).

El artículo (Chenoll E, Codoñer FM, Martínez-Blanch JF, Ramón D, Genovés S, Menabrito M. 2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus rhamnosus* strain BPL5 (CECT 8800), a probiotic for treatment of bacterial vaginosis. *Genome Announc* 4(2):e00292-16. doi:10.1128/genomeA.00292-16. Copyright© 2016 Chenoll *et al.*) se publicó en abril de 2016, es decir, después de la fecha de prioridad del documento EP15174222.8 del 29 de junio de 2015 de la presente solicitud.

Este artículo divulga la secuencia del genoma completo de la bacteria *L. rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800 de la presente invención.

Es evidente que era un trabajo rutinario para un experto obtener una cepa mutante de CECT 8800 incluso sin el conocimiento de la secuencia del genoma; con la secuencia, esto es aún más fácil.

Una composición dietética o farmacéutica - segundo aspecto de la invención

Como se analiza anteriormente, un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición dietética o farmacéutica que comprende la bacteria del primer aspecto y/o cualquier modo de realización de la misma descrito en el presente documento.

La composición dietética comprende, en general, adyuvantes y/o excipientes dietéticos o nutricionales aceptables.

La composición farmacéutica comprende, en general adyuvantes y/o excipientes farmacéuticos aceptables.

Típicamente, dicha composición comprende las bacterias en una forma concentrada que incluye concentrados congelados, secados o liofilizados que tienen típicamente una concentración de células viables, que está en el intervalo de 10^4 a 10^{14} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición. Puede ser preferente que el intervalo esté en el intervalo de 10^6 a 10^{14} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición o esté en el intervalo de 10^8 a 10^{14} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición. Un intervalo pertinente también puede estar en el intervalo de 10^6 a 10^{13} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición.

Puede ser preferente que la composición comprenda bacterias liofilizadas (liofilizadas expresadas de forma alternativa).

La composición puede contener, como componentes adicionales, crioprotectores (por ejemplo, maltodextrina) y/o aditivos convencionales, incluyendo nutrientes tales como extractos de levadura, glúcidos y vitaminas.

Si la composición comprende bacterias liofilizadas, entonces preferentemente comprende crioprotectores adecuados (por ejemplo, maltodextrina).

Según entiende el experto en el presente contexto, la composición dietética o farmacéutica como se describe en el presente documento comprenderá en determinados modos de realización una multiplicidad de cepas que pertenecen a la misma especie o que pertenecen a especies diferentes. Un ejemplo típico de dicha combinación útil de bacterias de ácido láctico en una composición como se describe en el presente documento es una mezcla de una *Leuconostoc* sp. y una o más *Lactococcus* subsp., tales como *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* o *Lc.s lactis* subsp. *lactis biovar. diacetilactis*.

También puede ser, por ejemplo, *L. crispatus*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus jensenii* y/o *L. gasseri*.

Pueden ser preferentes formas de aplicación de las composiciones de acuerdo con las invenciones adecuadas para la ingestión oral o la administración vaginal tópica. Como ejemplo, las bacterias probióticas para uso femenino se pueden administrar por vía oral en forma de cápsulas, o (rellenadas en sobres) suspendidas en una bebida, o en forma de leche fermentada (yogur). Cuando se administran por vía oral, se espera que sobrevivan al paso a través del estómago y el duodeno (mostrando una determinada estabilidad hacia el ácido y la bilis) y que colonicen temporalmente el intestino. Desde allí, pequeñas cantidades de bacterias ascenderán a la vagina y (de nuevo temporalmente) colonizarán la mucosa vaginal. Las bacterias probióticas también se pueden usar convencionalmente como cápsulas u óvulos vaginales y se pueden aplicar directamente a la vagina. El efecto protector de los lactobacilos contra los patógenos potenciales en la vagina se genera a través de la actividad metabólica de los lactobacilos. Las bacterias consumen glucógeno y otras fuentes de glucosa y producen ácido láctico. El bajo pH generado de esta manera es perjudicial para las bacterias y hongos menos deseables y, por tanto, protege la mucosa vaginal contra las infecciones. Por lo tanto, una composición de acuerdo con la invención se puede administrar en forma de óvulos, cápsulas vaginales para administración vaginal o como cápsulas recubiertas, comprimidos, sobres, pastillas, perlas, viales para ingestión oral, así como yogur, bebidas de yogur, leche fermentada, zumos, y otras bebidas y alimentos fermentados.

Uso para el tratamiento de un trastorno en una mujer - tercer aspecto de la invención

Como se analiza anteriormente, un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición dietética o farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto y/o cualquier modo de realización de la misma descrita en el presente documento, para su uso en el tratamiento de un trastorno en una mujer, en el que el trastorno es un desequilibrio de la microbiota bacteriana vaginal natural, una infección vaginal, una infección genital femenina, una infección genitourinaria o una infección urinaria.

Como lo entiende el experto en el presente contexto, en relación con el trastorno en una mujer, por ejemplo, una composición dietética o farmacéutica como se describe en el presente documento se usará muchas veces para restablecer y/o mantener una microbiota bacteriana vaginal saludable.

El tercer aspecto se puede formularse de forma alternativa como relacionado con un procedimiento para el tratamiento de un trastorno en una mujer, en el que el trastorno desequilibrio de la microbiota bacteriana vaginal natural, infección vaginal, infección genital femenina, infección genitourinaria o infección urinaria, en una mujer humana, que comprende administrar una cantidad pertinente de una composición dietética o farmacéutica de acuerdo con el segundo aspecto y/o cualquier modo de realización de la misma descrito en el presente documento a la mujer humana.

Ejemplos de un trastorno pertinente en el presente documento son vaginosis, vaginitis, vaginosis bacteriana crónica, infección crónica por levaduras, infección urinaria crónica en la menopausia, vaginitis atrófica, vaginosis o vaginosis bacteriana.

En un modo de realización preferente, el trastorno en una mujer es vaginosis bacteriana (VB).

Además, las composiciones de acuerdo con la invención son en particular adecuadas para su uso en el tratamiento o prevención de la vaginosis bacteriana asintomática y recurrente en el embarazo o parto prematuro causado por vaginosis bacteriana.

Producto lácteo, producto de bebida, producto alimenticio, etc. - cuarto aspecto de la invención

Como se analiza anteriormente, un cuarto aspecto de la invención se refiere a un producto lácteo, un producto de bebida, un producto alimenticio para nutrición humana y/o un producto de pienso para nutrición animal caracterizado por que el producto contiene una composición dietética de acuerdo con el segundo aspecto y/o cualquier modo de realización del mismo descrito en el presente documento.

Los productos lácteos de la presente invención pueden consistir en leche, yogur, queso, productos homogeneizados (basados en leche, queso, fruta), leche fermentada o no fermentada (incluyendo leche en polvo, leche sin lactosa, batidos) que contengan probióticos. El queso terapéutico se puede obtener

mediante la adición de microorganismos probióticos adecuados en una forma secada concentrada en una determinada fase de procesamiento del queso para garantizar el suministro de la dosis de los microorganismos necesarios para el organismo. Las bebidas pueden ser bebidas instantáneas o agua que contiene las composiciones de acuerdo con la presente invención.

- 5 Dichos integradores, productos lácteos y alimenticios son adecuados para su uso en el tratamiento los mismos trastornos en una mujer que se analizaron anteriormente, es decir, para su uso en el tratamiento de un trastorno en una mujer, en el que el trastorno es un desequilibrio de la microbiota bacteriana vaginal natural, infección vaginal, infección genital femenina, infección genitourinaria o infección urinaria.

- 10 Un modo de realización de la invención se refiere a un procedimiento para preparar un producto alimenticio fermentado o de pienso fermentado que comprende añadir una bacteria *Lactobacillus rhamnosus* de ácido láctico del primer aspecto a un material de partida de un producto alimenticio o de pienso y mantener el material de partida inoculado de este modo en condiciones en las que la bacteria de ácido láctico está metabólicamente activa.

- 15 Los materiales de partida de productos alimenticios útiles incluyen cualquier material que se someta convencionalmente a una etapa de fermentación bacteriana del ácido láctico, tal como leche, materiales vegetales, productos cárnicos, zumos de frutas, mosto, masas, soja y rebozados.

Los productos fermentados, que se obtienen por el procedimiento, incluyen, como ejemplos típicos, productos lácteos tales como leche fermentada, yogur, queso, incluyendo productos de queso fresco o mozzarella, y suero de leche.

- 20 En otros modos de realización, el material de sustrato es un material de partida para un pienso para animales tal como forraje, por ejemplo, hierba, material de cereal, guisantes, alfalfa u hoja de remolacha azucarera, en el que se inoculan cultivos bacterianos en el cultivo de pienso que se va a ensilar para obtener una conservación del presente documento, o en productos de residuos animales ricos en proteínas, tal como las vísceras de la matanza y las vísceras de peces, también con el objetivo de preservar estos despojos para propósitos de alimentación animal.

- 25

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Aislamiento y caracterización de *L. rhamnosus* BPL005 de la invención

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

1. Aislamiento y selección de las cepas

- 30 Para obtener cepas aisladas de la vagina de mujeres sanas, se tomaron muestras del área media de la vagina de catorce mujeres premenopáusicas sanas de entre 18 y 45 años. Los criterios de exclusión fueron mujeres embarazadas o en período de lactancia, que estuvieran menstruando en el momento del muestreo, o con un tratamiento antimicrobiano contra vaginitis previa.

- 35 Se extendieron hisopos en placas de agar MRS y se incubaron anaeróbicamente a 37 °C. Se seleccionaron bacilos grampositivos no esporulados como presuntos lactobacilos. Los cultivos puros se almacenaron a largo plazo (-20 °C) en glicerol para análisis adicional.

2. Identificación molecular

Para garantizar que las cepas aisladas sean únicas, se generaron perfiles de ADN polimórfico amplificado aleatorio de agarosa (RAPD) y se rechazaron cepas aisladas duplicadas.

- 40 La identificación molecular se llevó a cabo mediante secuenciación génica del ARNr de 16S, como Chenoll *et al.* (Novel Probiotic Bifidobacterium bifidum CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium Helicobacter pylori. 2011. Applied and Environmental Microbiology. 77(4): 1335-1343). Brevemente, se extrajo y purificó ADN de los cultivos puros y se amplificó el ADN de 16S mediante tecnología de PCR. Se purificaron y secuenciaron los productos de amplificación. La identificación se logró comparando secuencias obtenidas con la base de datos BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

- 45

3. Selección de la mejor cepa reductora de pH

Para estudiar la capacidad de las cepas de lactobacilos para reducir los niveles de pH, se cultivaron cultivos normalizados de las cepas se cultivaron en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) durante 17 h a 37 °C. El pH final se midió con la ayuda de un medidor de pH. Los ensayos se realizaron por triplicado. Una vez que se habían realizado los experimentos por separado, se sometió a prueba la combinación de las cepas más reductoras para disminuir los niveles de pH. Para realizar este ensayo, ambas cepas se cocultivaron en medio MRS durante 17 h a 37 °C, y se midió el pH final con la ayuda de un medidor de pH.

- 50

4. Identificación del perfil de ácidos orgánicos

Para obtener el perfil de ácidos orgánicos de las cepas seleccionadas, cada cepa se cultivó anaeróbicamente a 37 °C en fermentadores de 1 l (Biobundle; Applikon), en el medio industrial optimizado en Biopolis para lactobacilos. Para cada cepa, se sometieron a ensayo dos condiciones: con y sin control de pH. En ambos casos, los niveles de pH se monitorizaron durante el ensayo. Se recogieron muestras a lo largo del ensayo. Para la cuantificación de ácidos orgánicos, se mezclaron 0,8 ml de sobrenadante libre de células mediante agitación en vórtex con 0,2 ml de una mezcla que contenía ácido metafosfórico al 5 %, sulfato de cobre (1,56 mg/ml) y ácido 4-metil valérico 50 mM como patrón interno. A continuación, se filtraron las muestras con un tamaño de poro de 0,45 µm y se diluyeron 1/2 y 1/10. La evaluación de los ácidos orgánicos se realizó mediante cromatografía HPLC. Se inyectó una alícuota de 10 µl de muestras procesadas en un HPLC Alliance 2695 (Waters) equipado con una columna Rezex (ácido orgánico ROA (H+) 8 % 300 × 7,8 mm, 8 µm [Premium]) en las condiciones definidas por el fabricante. La detección se logró mediante un índice de detector de refracción (2414 Waters). El eluyente se desgasificó H₂SO₄ 2,5 mM a un caudal isocrático de 0,6 ml/min. En todos los casos, se construyeron curvas de cuantificación añadiendo la mezcla previamente definida.

5. Resistencia a productos comerciales.

Para someter a prueba la resistencia de la cepa BPL005 a diferentes productos ginecológicos, se disolvieron alícuotas de las soluciones madre directas de cada producto en medio de caldo a 5120 µg/ml y se filtraron a 0,22 µm. Las soluciones madre se almacenaron a -80 °C. Desde la primera dilución, se realizaron ½ diluciones en serie en un intervalo de 512-0,125 µg/ml. Los inóculos se obtuvieron directamente de una colonia de 24 h, se resuspendieron en solución salina a 0,5 MacFarland y se diluyeron 1/20 en solución salina. Se realizaron ensayos en placas de múltiples pocillos y se incubaron anaeróbicamente a 37 °C durante 24 h. La concentración inhibidora mínima (MIC) se estableció como la concentración mínima en la cual el antibiótico ejerce una inhibición clara (sin crecimiento). En el caso de productos con alta turbidez, los ensayos incluyeron una segunda etapa en la que 5 µl de caldo de 24 h de BPL005 en medio IST en presencia de productos comerciales diluidos en serie se dejaron caer en placas de agar para confirmar el crecimiento del probiótico.

6. Secuencia del genoma

Para obtener la secuencia del genoma completo y el análisis del genoma completo de la cepa BPL005, se están realizando la secuenciación del genoma y un análisis bioinformático.

i) Secuenciación:

Para obtener el genoma completo de la cepa seleccionada, se obtuvo un sedimento altamente concentrado del banco de células maestras y se extrajo manualmente el ADN de alta pureza siguiendo a Pitcher *et al.* (Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. 1989. Letters in Applied Microbiology. 8 (4): 151-156). La secuenciación se ha realizado con la ayuda de la plataforma Pacific Biosciences (PacBio).

ii) Análisis bioinformáticos:

Se han ensamblado las secuencias brutas obtenidas de la secuenciación del genoma completo construyendo una estructura que se va a usar para la anotación del genoma. Se predecirán los ARNt, los ARNr y los marcos de lectura abiertos (ORF). Se anotará la funcionalidad de los ORF comparando cada ORF con una base de datos que contiene todas las secuencias del reino de las bacterias. Una vez que la funcionalidad de los genes se asocie a cada ORF, se buscarán y se enumerarán los genes de virulencia y resistencia a los antibióticos.

RESULTADOS

1. Aislamiento y selección de las cepas

En total, se obtuvieron catorce muestras y se extendieron en placas de agar MRS para obtener cepas aisladas. Se obtuvieron catorce cepas de 100 cepas aisladas recuperadas. Todas ellas se obtuvieron de muestras de vagina. Una vez recuperadas, las cepas se almacenaron a largo plazo (-20 °C) en glicerol para análisis adicional. Las cepas aisladas obtenidas se clasificaron en base a la tinción de Gram y la morfología celular. Catorce bacilos grampositivos no esporulados. Se clasificaron como presuntos lactobacilos y, por tanto, se seleccionaron para su posterior identificación.

2. Identificación molecular

Una vez que se recuperaron las cepas aisladas, se realizaron perfiles de RAPD de agarosa para rechazar cepas aisladas duplicadas. En base a los perfiles de RAPD, las catorce cepas aisladas se agruparon en

seis cepas diferentes. Las cepas se identificaron mediante secuenciación del ARNr de 16S (Tabla 1) y se seleccionaron cepas de *Lactobacillus* para estudios adicionales (Tabla 2). Además, se incluyeron en el estudio cepas de colección *L. crispatus* CECT 4840 y *L. iners* DSM 13335.

Tabla 1. Grupos obtenidos por perfil de RAPD y secuenciación del ARNr de 16S.

Género	Cepas aisladas (cepas)
<i>Lactobacillus</i>	14 (6)
Patógenos	10 (5)
"Bacteria no cultivada"	6 (6)
Otros	14 (14)

5

Tabla 2. Obtención de cepas de lactobacilos.

Identificación	Cepa
<i>Lactobacillus casei</i>	BPL013
	BPL016
<i>L. jensenii</i>	BPL017
	BPL035
	BPL044
<i>L. rhamnosus</i>	BPL005

3. Selección de la mejor cepa reductora de pH

Se estudió la capacidad de las cepas para reducir los niveles de pH. La tabla 3 resume los resultados obtenidos. En ensayos realizados con una sola cepa, los niveles de pH disminuyeron en todos los casos. La mayor reducción de pH se obtuvo en el caso de la cepa *L. rhamnosus* BPL005, siendo el pH final 3,82.

10

Tabla 3. Niveles de pH obtenidos en cultivos de crecimiento de cepas de lactobacilos (ensayo con cultivos puros).

Cepa	pH
Control (medio sin cultivo)	6,1
<i>L. crispatus</i> CECT4840	4,55
<i>L. iners</i> DSM13335	4,52
<i>L. casei</i> BPL013	4,30
<i>L. jensenii</i> BPL016	4,46
<i>L. jensenii</i> BPL017	4,30
<i>L. jensenii</i> BPL035	4,34
<i>L. jensenii</i> BPL044	4,61
<i>L. rhamnosus</i> BPL005	3,82

En base a los resultados de reducción del pH, la cepa *L. rhamnosus* BPL005 y *L. casei* BPL013 se seleccionaron para estudios adicionales.

4. Identificación del perfil de ácidos orgánicos

15

Los ácidos orgánicos se han descrito como metabolitos inhibidores y también como compuestos con un efecto prebiótico. En este sentido, las cepas BPL005 y BPL013 se analizaron en base a su producción de ácidos orgánicos en fermentaciones de 1 l. Con respecto a la disminución del pH en ensayos sin control del pH, en el caso de la cepa BPL005, el pH comenzó a disminuir muy rápidamente. A las 5 horas de fermentación, el nivel de pH fue de 3,7 y a las 10 horas de fermentación el pH alcanzó su mínimo (pH 3,0).

20

En el caso de la cepa BPL013, el pH disminuyó gradualmente, con el pH más bajo a las 30 horas de fermentación.

Las tablas 4-5 muestran la producción de ácidos orgánicos. En el caso de fermentaciones con control del pH, se recuperaron muestras al final de la fermentación. En todos los casos, los niveles más altos se obtuvieron para el ácido láctico, siendo las concentraciones más altas 22,53 g/l en el caso de BPL013 y

19,90 g/l para la cepa BPL005, en fermentaciones con pH controlado. La rápida producción de ácido láctico en el caso de la cepa BPL005 concuerda con su alta capacidad para reducir el pH en poco tiempo. La producción de ácido láctico fue seguida de una disminución del pH en ambas cepas, siendo más notable en el caso de la cepa BPL005. Con respecto a la producción del resto de ácidos, la cepa BPL005 fue la mejor productora en todos los casos. Se ha informado de que estos ácidos orgánicos podrían inhibir las bacterias y levaduras patógenas (Juárez *et al.* Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal Lactobacillus strains to be considered as probiotic candidates. 2011. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 159: 399-406) En el caso del ácido láctico, los niveles obtenidos fueron más altos que los descritos previamente en la referencia de Juárez *et al.* citada anteriormente.

Tabla 4. Niveles de ácidos orgánicos (g/l) obtenidos en fermentaciones de BPL005.

	Concentración de ácidos orgánicos (g/l)			
	sin control de pH			control de pH
	5 h	22 h	45 h	22 h
Ácido láctico	3,172 ± 0,066	12,168 ± 0,223	15,635 ± 0,158	19,731 ± 0,232
Ácido acético	0,105 ± 0,050	0,123 ± 0,058	0,143 ± 0,058	0,145 ± 0,049
Ácido propiónico	0,740 ± 0,029	0,155 ± 0,029	0,210 ± 0,026	0,134 ± 0,013
Ácido butírico	0,074 ± 0,041	0,074 ± 0,041	0,072 ± 0,039	0,082 ± 0,041
Ácido succínico	0,114 ± 0,025	0,112 ± 0,042	0,157 ± 0,033	0,175 ± 0,008

Tabla 5. Niveles de ácidos orgánicos (g/l) obtenidos en fermentaciones de BPL013.

	Concentración de ácidos orgánicos (g/l)			
	sin control de pH			control de pH
	5 h	30 h	42 h	42 h
Ácido láctico	0.479 ± 0.090	1.387 ± 0.096	10.093 ± 0.088	22.814 ± 0.397
Ácido acético	0.060 ± 0.051	0.065 ± 0.051	0.084 ± 0.054	0.109 ± 0.064
Ácido propiónico	0.058 ± 0.041	0.045 ± 0.030	0.058 ± 0.027	0.058 ± 0.023
Ácido butírico	ND	ND	ND	ND
Ácido succínico	0.092 ± 0.001	0,11 ± 0.002	0.104 ± 0.023	0.133 ± 0.032

ND: No detectado.

5. Resistencia a ensayos de productos comerciales.

Los resultados obtenidos con los productos comerciales ginecológicos se resumen en la tabla 6. En todos los casos, la cepa BPL005 fue resistente a la concentración más alta sometida a prueba y no se observaron inhibiciones, ni siquiera en las concentraciones más altas en productos en matriz de gel y crema.

Tabla 6. Valores de MIC obtenidos para productos a base de progesterona.

Producto	MIC (mg/ml)
Ultrogestan	>20 mg/ml
Progeffik	>20 mg/ml
Prolutex	>20 mg/ml
Crinone	>22 mg/ml
Darstin	>2,22 mg/ml
* No fue posible someter a prueba una mayor concentración debido a su concentración inicial.	

6. Secuencia del genoma

Se ha secuenciado el genoma completo de la cepa BPL005. Se ha realizado la extracción del genoma completo; se ha corroborado la identificación de la cepa y se ha aplicado secuenciación. El conjunto dejó un cóntigo único de 3,023 Mb. No se predijeron secuencias como plásmidos.

Conclusiones

Los resultados de este ejemplo demostraron las siguientes características positivas pertinentes de la cepa de *L. rhamnosus* BPL005 aislada en el presente documento:

1: Se aisló *de novo* de cepas aisladas de la vagina de mujeres sanas, es decir, no hay razón obvia para creer que no sea una cepa novedosa como tal;

5 **2:** El perfil de ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD) demostró que la cepa es diferente de las otras y la secuenciación del ARNr de 16S mostró que BPL005 es una cepa única de *L. rhamnosus*;

3: BPL005 tenía la mayor capacidad de las cepas aisladas de la vagina para reducir los niveles de pH;

10 **4:** En ensayos sin control de pH, BPL005 proporcionó un rápido efecto de disminución del pH. La rápida producción de ácido láctico en el caso de la cepa BPL005 concuerda con su alta capacidad para reducir el pH en poco tiempo. Respecto a la producción del resto de ácidos, la cepa BPL005 fue la mejor productora de las cepas sometidas a prueba;

5: Con respecto a la resistencia a los productos comerciales ginecológicos, la cepa BPL005 fue resistente a la concentración más alta sometida a prueba y no se observaron inhibiciones;

15 **6:** La secuenciación genómica del genoma completo de la cepa BPL005 mostró que tenía un contig único de 3,023 Mb, es decir, la secuencia del genoma no era una secuencia descrita en la técnica anterior.

EJEMPLO 2: Comparación de BPL005 con los probióticos ginecológicos comerciales

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Células viables en producto.

20 Para estudiar en profundidad los diferentes productos probióticos comerciales ahora disponibles en el mercado, se analizó una colección de 18 productos basados en probióticos. Los productos sometidos a prueba se resumen en la tabla 7. Para cada producto, se obtuvo la concentración por recuentos en placas de MRS y se sometió a prueba la funcionalidad de las cepas. Para estudiar la funcionalidad, se aislaron cepas probióticas, se identificaron por secuenciación del ADNr 16S y se sometió a prueba su capacidad para disminuir el pH.

25 **Tabla 7.** Productos comerciales analizados.

Producto comercial	Tipo de producto
Barrita Ginegea Candida	Polvo
HydralinFlora	Cápsulas
mediGYNE	Cápsulas
GynOphilus LP	Cápsulas
GynOphilus	Cápsulas
FLORGYNAL TAMPÓN	Tampones
Symbiovag	Cápsulas
SYMBIO Vag	Cápsula vaginal dura
Muvagyn probiótico	Tampón
Muvagyn Probiótico	Cápsulas
Isadin α barcilus ISDIN	Cápsula vaginal suave
NORMOGIN 40 mg	Cápsulas
Lactonorm	Cápsulas
ACIDIF CV	Cápsulas
Vaginol	Cápsula vaginal dura
Gyno-canesflor	Cápsulas
Floragyn	Cápsula vaginal dura
Lactoflorene Gyn	Cápsula vaginal dura

Capacidad de reducir los niveles de pH

Se aislaron cepas probióticas de productos comerciales y se almacenaron a -80 °C. Se confirmó la identificación a nivel de especie mediante secuenciación del ADNr de 16S. Para cada cepa, los ensayos de reducción del pH se realizaron como se explica anteriormente. La cepa BPL005 se incluyó como control.

RESULTADOS

5 Células viables en producto

Para estudiar en profundidad los diferentes productos probióticos comerciales ahora disponibles en el mercado, se analizó una colección de 18 productos basados en probióticos. Los productos sometidos a prueba se resumen en la tabla 8. Para cada producto, se obtuvo la concentración por recuentos en placas de MRS y se sometió a prueba la funcionalidad de las cepas. Para estudiar la funcionalidad, se aislaron cepas probióticas, se identificaron por secuenciación del ADNr 16S y se sometió a prueba su capacidad para disminuir el pH.

Tabla 8. Análisis comparativo de productos comerciales.

Producto comercial	Tipo de producto	Bacterias viables (UFC/g)	Cantidad (g)	Total de bacterias viables (UFC)	Bacterias viables teóricas (UFC)
Barrita Ginegea Candida	Polvo	5,70E+09	2	1,14E+10	1,00E+09
HydralinFlora	Cápsulas	2,77E+10	0,20	5,53E+09	1,00E+08
mediGYNE	Cápsulas	1,30E+09	0,20	2,60E+08	1,00E+08
GynOphilus LP ¹	Cápsulas	1,78E+09	0,88	1,56E+09	877 mg ¹
GynOphilus ¹	Cápsulas	4,00E+09	0,34	1,36E+09	341 mg ¹
FLORGYNAL TAMPÓN	Tampones	1,18E+09	1,60	1,88E+09	-
SYMBIO Vag	Cápsula vaginal dura	9,00E+08	2	1,80E+09	1,00E+09
Muvagyn probiótico	Tampones	2,20E+07	3,10	6,83E+07	1,00E+08
Muvagyn Probiótico	Cápsulas	1,80E+09	0,41	7,33E+08	1,00E+08
Isadin α barcilus ISDIN	Cápsula vaginal suave	7,70E+08	2,82	2,17E+09	1,00E+08
NORMOGIN 40 mg ¹	Cápsulas	3,20E+06	1,00	3,20E+06	40 mg ¹
Lactonorm	Cápsulas	6,40E+08	0,42	2,70E+08	1,00E+11 ²
ACIDIF CV	Cápsulas	1,40E+08	1,05	1,47E+08	5,00E+08
Vaginal ³	Cápsula vaginal dura	-	-	-	-
Gyno-canesflor	Cápsulas	2,20E+10	0,34	7,41E+09	1,00E+08
Floragyn ⁴	Cápsula vaginal dura	5,90E+04	2,00	1,18E+05	-
Lactoflorene Gyn	Cápsula vaginal dura	2,34E+05	0,62	1,44E+05	1,20E+06

¹La dosis se administra en mg, no en UFC; ²Viables en el momento de encapsulación; ³No hay probióticos en la composición; ⁴Probióticos lisados

Como se muestra en la tabla 8, los resultados fueron muy variables. Algunos de ellos mostraron células viables menores que las especificaciones.

15 Capacidad de reducir los niveles de pH

Se aislaron cepas probióticas de productos comerciales y se sometió a prueba su capacidad para reducir los niveles de pH. En la tabla 9 se muestra la comparación obtenida entre ellas.

Tabla 9. Reducción del nivel de pH obtenido para probióticos comerciales.

Producto	Probióticos aislados	pH final
MediGYNE	<i>L. gasseri</i>	4,33
	<i>L. rhamnosus</i>	3,55
HydralinFlora	<i>L. plantarum</i>	3,55
GynOphilus LP	<i>L. casei rhamnosus</i> Döderlein	4,20
FLORGYNAL tampón	<i>L. rhamnosus</i>	4,25
	<i>L. fermentum</i>	4,10
Muvagyn	<i>L. gasseri</i> LN40	4,21
	<i>L. fermentum</i> LN99	4,23
	<i>L. rhamnosus</i> LN113	4,24
Isadin α barcilus ISDIN	<i>L. plantarum</i>	3,93
GynOphilus	<i>L. casei rhamnosus</i> Döderlein	4,17
Lactonorm	<i>L. acidophilus</i>	4,23
BPL005 (control)	<i>L. rhamnosus</i>	3,73

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa BPL005 tenía niveles similares de reducción del pH que los mejores probióticos sometidos a prueba.

Conclusiones

- 5 Los resultados de este ejemplo mostraron que la cepa BPL005 tenía niveles similares de reducción del pH que los mejores probióticos sometidos a prueba de productos probióticos ginecológicos comerciales pertinentes en el presente documento.

EJEMPLO 3: Evaluación de la productividad de la cepa de *Lactobacillus BPL005* en producción a escala de laboratorio (volumen 1 l)

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

- 10 Para la evaluación de la productividad, se construyeron un banco de células maestras y un banco de células de trabajo a -80 °C.

- 15 Se realizó la producción a escala de laboratorio en un fermentador de 1 l (Biobundle; Applikon), en un medio industrial optimizado para lactobacilos. Se obtuvo el cultivo en condiciones estándar (Tabla 10) y se recogieron las células mediante centrifugación. Después de recoger el sedimento, se resuspendió en una solución de vehículo a base de maltodextrina y se congeló a -80 °C y se liofilizó.

Tabla 10. Condiciones de fermentación

Parámetro	Valor
OD Fermentador t 0 h	0,1
Temperatura	37 °C
Agitación	100 rpm
Atmósfera	Anaerobiosis
pH	6,3
Medio de cultivo	BRFS

Para evaluar la resistencia de la cepa a los procedimientos de congelación y liofilización, se verificó la viabilidad celular en placas de agar MRS antes de la recogida y después de la liofilización.

Estudio de estabilidad de producto liofilizado

- 20 El polvo liofilizado se envasó al vacío y se almacenó a 5 °C (± 3 °C). Se verificó la estabilidad del producto mediante recuentos en MRS durante 15 meses.

RESULTADOS

Para obtener la evaluación de la eficacia de la cepa BPL005, se realizó una producción a escala de laboratorio. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11. Los resultados obtenidos mostraron una buena eficacia de la cepa BPL005 en el procedimiento de producción a escala de laboratorio.

Tabla 11. Resultados obtenidos después de fermentación a 1 l.

Parámetro	Valor
Tiempo de cosecha	20 h
OD final	8,1
UFC finales/ml en fermentador	9×10^9 UFC/ml
UFC finales/g en liofilizado	$2,7 \times 10^{12}$ UFC/g

- 5 El polvo liofilizado se envasó al vacío y se almacenó a 5 °C. Se verificó la estabilidad del producto mediante recuentos en MRS. La cepa BPL005 ha obtenido una buena estabilidad en un período de 15 meses.

Conclusiones

- 10 Los resultados de este ejemplo mostraron una buena eficacia de la cepa BPL005 en el procedimiento de producción a escala de laboratorio (volumen 1 l) y los datos del polvo liofilizado elaborado mostraron que la cepa BPL005 ha obtenido una buena estabilidad en un período de 15 meses.

EJEMPLO 4: Producción industrial de la cepa de lactobacilos BPL005 (volumen 1500 l)

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Producción a escala industrial

- 15 Se llevó a cabo la producción industrial en un fermentador de 1500 l. Se realizó el crecimiento en un medio industrial optimizado para lactobacilos. Se obtuvo el cultivo en condiciones estándar (anaeróbicamente, con control del pH y la temperatura) y se recogieron las células mediante centrifugación en una centrífuga industrial.

Optimización de la liofilización

- 20 Una vez obtenido el sedimento, se resuspendió en un vehículo (a base de maltodextrina) y se liofilizó en un liofilizador industrial. Para obtener la capacidad de la cepa para resistir el procedimiento de liofilización, se verificó la viabilidad en placas de agar MRS justo después del procedimiento de fermentación y después del procedimiento de liofilización industrial. La pureza del cultivo y el producto liofilizado se verificó mediante perfiles de RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico) electroforética de colonias seleccionadas al azar.

- 25 **Evaluación del período de validez del polvo a granel.**

Se está estudiando el período de validez del polvo a granel. Se almacenan alícuotas de polvo a granel con 5 °C y 25 °C. Se realizará periódicamente una evaluación mediante recuentos en agar MRS.

RESULTADOS

Producción a escala industrial

- 30 Se llevó a cabo la producción industrial en un fermentador de 1500 l siguiendo las condiciones estándar. El cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* BPL005 dio $6,55 \times 10^9$ UFC/ml. Este resultado está en consonancia con los resultados obtenidos en escala de 1 l y es aceptable en términos de eficacia del procedimiento.

Optimización de la liofilización

- 35 Los recuentos obtenidos se resumen en la tabla 12. Los resultados obtenidos mostraron una buena eficacia de la cepa BPL005 en el procedimiento de producción a escala de 1500 l.

Tabla 12. Resultados obtenidos después de fermentación a 1500 l.

Tiempo de cosecha	17h
UFC finales/ml en fermentador	$6,55 \times 10^9$ UFC/ml
UFC finales/g en liofilizado	$5,53 \times 10^{11}$ UFC/g

Evaluación del período de validez del polvo a granel.

La estabilidad obtenida en la producción de 1500 l a 5 °C y 25 °C de la cepa liofilizada envasada al vacío BPL005 mostró que el producto era muy estable a una temperatura de 5 °C. Los resultados obtenidos a 25 °C muestran una disminución baja aceptable en los números.

Conclusiones

- 5 Los resultados de este ejemplo mostraron una buena eficacia de la cepa BPL005 en el procedimiento de producción a escala industrial (volumen 1500 l) y los datos del polvo liofilizado elaborado mostraron que la cepa BPL005 ha obtenido una muy buena estabilidad.

REFERENCIAS

EP0257007 (archivado 1987)

- 10 1: EP2509610B1 (HSO Health Care, Viena - presentado el 13/09/2011 y publicado/otorgado en 2013)
- 2: Chenoll E, Codoñer FM, Martinez-Blanch JF, Ramón D, Genovés S, Menabrito M. 2016. Complete genome sequence of *Lactobacillus rhamnosus* strain BPL5 (CECT 8800), a probiotic for treatment of bacterial vaginosis. *Genome Announc* 4(2):e00292-16. doi:10.1128/genomeA.00292-16. Copyright© 2016 Chenoll *et al.* - publicado en abril de 2016

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria *Lactobacillus rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800.
2. Una composición dietética o farmacéutica que comprende la bacteria de la reivindicación 1.
3. La composición dietética o farmacéutica de la reivindicación 2, en la que la composición tiene una concentración de células viables, que está en el intervalo de 10^4 a 10^{14} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición, preferentemente en la que la concentración de células viables está en el intervalo de 10^6 a 10^{13} UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de la composición.
4. La composición dietética o farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende las bacterias en forma congelada, en forma secada o en forma liofilizada.
5. La composición dietética o farmacéutica de la reivindicación 4, en la que la composición comprende las bacterias en forma liofilizada y la composición también comprende crioprotectores adecuados (por ejemplo, maltodextrina).
6. La composición dietética o farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es adecuada para la ingestión oral o la administración vaginal.
7. La composición dietética o farmacéutica de la reivindicación 6, en la que la composición está en forma de óvulos, cápsulas vaginales para administración vaginal o como cápsulas recubiertas, comprimidos, sobres, pastillas, perlas, viales, para ingestión oral, yogur, bebidas de yogur, leche fermentadas, zumos, y otras bebidas y alimentos fermentados.
8. La composición dietética o farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es una composición farmacéutica que también comprende adyuvantes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
9. Una composición dietética o farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 para su uso en el tratamiento de un trastorno en una mujer, en la que el trastorno es un desequilibrio de la microbiota bacteriana vaginal natural, infección vaginal, infección genital femenina, infección genitourinaria o infección urinaria.
10. La composición dietética o farmacéutica para su uso como en la reivindicación 9, en la que el trastorno es vaginosis, vaginitis, vaginosis bacteriana crónica, infección crónica por levaduras, infección urinaria crónica en la menopausia, vaginitis atrófica, vaginosis o vaginosis bacteriana.
11. La composición dietética o farmacéutica para su uso como en la reivindicación 10, en la que la infección es vaginosis bacteriana.
12. Un producto lácteo, un producto de bebida, un producto alimenticio para la nutrición humana y/o un producto de pienso para alimentación animal, **caracterizado por que** el producto contiene una composición dietética de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.
13. Un procedimiento para preparar un producto alimenticio fermentado o de pienso fermentado que comprende añadir una bacteria *Lactobacillus rhamnosus* de ácido láctico de la reivindicación 1 a un material de partida de un producto alimenticio o de pienso y mantener el material de partida inoculado de este modo en condiciones en las que la bacteria de ácido láctico está metabólicamente activa.
14. Un procedimiento para obtener una cepa mutante de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800 que comprende las siguientes etapas:
 - (i) preparar mutantes de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800;
 - (ii) analizar los mutantes preparados en la etapa (i) e identificar una cepa mutante que haya retenido o mejorado aún más la capacidad de CECT 8800 para reducir los niveles de pH; y
 - (iii) aislar la cepa mutante identificada en la etapa (ii) para obtener de este modo la cepa mutante de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* del ácido láctico con el número de registro CECT 8800, en la que la cepa mutante ha retenido o mejorado aún más la capacidad de CECT 8800 para reducir los niveles de pH.