

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 410**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747	(2015.01)
C12R 1/225	(2006.01)
A61K 8/99	(2007.01)
A61L 15/36	(2006.01)
C12N 15/01	(2006.01)
A61Q 17/00	(2006.01)
A61Q 19/10	(2006.01)
A23L 33/135	(2006.01)
A61P 31/10	(2006.01)
A61P 15/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2014 PCT/EP2014/067177**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015 WO15022297**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2014 E 14757862 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3035943**

54 Título: **Cepa de Lactobacillus pentosus como probiótico**

30 Prioridad:

12.08.2013 EP 13382326

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

14.02.2020

73 Titular/es:

**GYNEA LABORATORIOS, S. L. (100.0%)
C/ Colom, 5
08184 Palau Solità Plegamans, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**ESPADALER MAZO, JORDI y
LOSADA DIAZ, MIGUEL ANGEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 742 410 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

Cepa de *Lactobacillus pentosus* como probiótico

5 La presente invención se refiere a los campos de la medicina, la microbiología y tecnología de los alimentos y, en particular, a una nueva cepa de *Lactobacillus pentosus* para ser utilizada como un probiótico en beneficio de la salud humana.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Probióticos

10 El concepto de microorganismos probióticos nació de la hipótesis del Premio Nobel Elie Metchnikoff, quien sugirió que el consumo de bacterias capaces de producir la fermentación (*Lactobacillus*) tiene un efecto positivo en la microbiota del colon, la reducción de la presencia de toxinas bacterianas y otras actividades microbianas que tienen un impacto negativo en la salud humana.

15 "Los probióticos son microorganismos vivos que, después de su administración a los consumidores, aporta más beneficios que la nutrición natural básica". Hoy en día hay una gran cantidad de referencias acerca de la utilidad de los probióticos para el tratamiento de varios trastornos de la salud gastrointestinal, así como estudios que sugieren su utilidad para activar el sistema inmunitario y prevenir las alergias.

20 Las bacterias probióticas deben cumplir varios requisitos relacionados con la falta de toxicidad, la viabilidad, la adhesión y efectos beneficiosos. Las propiedades de cada una de las cepas bacterianas son únicas y no se pueden extrapolar a otras cepas de la misma especie (Araya, M., et al, Orientaciones para la Evaluación de los Probióticos en los alimentos -. Conjunto FAO / Grupo de Trabajo de la OMS, la FAO / OMS, Editor Organización 2002, la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas y la Organización Mundial de la Salud: Ontario, Canadá). Por lo tanto, es importante encontrar aquellas cepas que tienen un mejor rendimiento en todos los requisitos de probióticos.

25 Aunque el concepto de probióticos se asoció con la flora microbiana intestinal, estudios llevados a cabo ya en 1988 mostraron que este concepto también podría extenderse a la flora vaginal de las mujeres. Algunos grupos científicos han estado desarrollando esta idea desde hace algunos años, que culminó con la identificación de algunas cepas de *Lactobacillus* que son útiles para el tratamiento de las complicaciones de la salud vaginal (Anukam, K.C., et al., Estudio clínico comparando probiótico *Lactobacillus* GR-1 y RC-14 con metronidazol gel vaginal para tratar la vaginosis bacteriana sintomática. *Microbes and Infection*, 2006, Vol. 8 (12-13): páginas 2772-2776; Larsson, P.G., et al, Los lactobacilos humanos como la suplementación de clindamicina en pacientes con vaginosis bacteriana reduce la tasa de recurrencia; un estudio de 6 meses de duración, doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo. *BMC Women's Health*, 2008. Vol. 8 N°1: página 3], lo que demuestra el concepto de probiótico para la salud vaginal.

Flora Vaginal Sana

La aparición de secreciones vaginales y la picazón son las causas más comunes de las visitas ginecológicas. Esto puede ser debido a reacciones alérgicas, al contacto con agentes irritantes (tela de fibra, jabón, spray, etc.) o en muchos casos debido a una infección.

35 La flora vaginal sana está compuesta principalmente por lactobacilos, que mantienen el pH ácido de la vagina (entre 3,9 y 4,3), impidiendo su colonización por otros microorganismos. Cuando esta flora natural se debilita, por ejemplo, por tratamientos con antibióticos sistémicos, la infección por especies patógenas se vuelve mucho más probable. Las complicaciones más frecuentes de la flora vaginal sana son candidiasis vulvovaginal y vaginosis bacteriana.

Candidiasis Vulvovaginal

40 *Candida* es una levadura altamente prevalente que se puede encontrar en pequeñas cantidades en la flora vaginal sin ningún síntoma de la enfermedad. Los síntomas aparecen cuando se perturba el equilibrio de la flora vaginal y la población de *Candida* aumenta en comparación con la cantidad de lactobacilos protectores. Los síntomas típicos de infección por *Candida* incluyen picazón y ardor vaginal, así como dispareunia y vaginismo. Aproximadamente, el 75% de los casos de la candidiasis vulvovaginal se deben a *Candida albicans*, y un 15% adicional de se deben a *Candida glabrata* (Richter, S.S., et al., Susceptibilidad antifúngica de *Candida* especies causantes de vulvovaginitis y epidemiología de los casos recurrentes. *J. Clin. Microbiol.*, 2005. Vol. 43 N° 5: páginas 2155-2162). Se estima que el 75% de las mujeres experimentan al menos un episodio en el transcurso de su vida. Por otra parte, el 25% de los casos son recurrentes con cuatro o más episodios por año.

50 La infección ocurre a menudo después de un tratamiento con antibióticos prescrito con un objetivo terapéutico diferente. También es común en las mujeres que toman anticonceptivos orales que contienen estrógenos, en mujeres embarazadas y en mujeres con diabetes. Las infecciones por *Candida* se tratan con antimicóticos, tales como los fármacos de triazol (por ejemplo, fluconazol, clotrimazol, miconazol, itraconazol) o nistatina. Sin embargo, es de destacar que cepas de *Candida glabrata* tienden a mostrar una alta resistencia contra tales tratamientos, mientras que hasta el 20% de las cepas de *Candida albicans* aisladas en clínicas presenta resistencia al fluconazol,

uno de los tratamientos más típicos, haciendo hincapié en la importancia de encontrar nuevas herramientas terapéuticas para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal.

5 Además de su pH ácido, el fluido vaginal contiene varias proteínas antimicrobianas, tales como la lisozima, defensinas y lactoferrina. Durante la candidiasis vulvovaginal la concentración de estas sustancias aumenta más allá de los niveles normales en aproximadamente el 25% de las mujeres (Valore, E.V., et al., Deficiencia reversible de polipéptidos antimicrobianos en la vaginosis bacteriana. Infect. Immun., 2006. Vol. 74 N°10: páginas 5693-5702]. Esta respuesta es por lo general insuficiente para protegerse de levaduras tales como *Candida*, ya que el efecto de estas sustancias es más bacteriostático o bactericida que antimicótico. Sin embargo, ya que la flora vaginal sana está compuesta principalmente de bacterias del género *Lactobacillus*, este aumento anormal de proteínas antimicrobianas puede contribuir a retrasar aún más la recuperación de la flora sana de la vagina. Por otra parte, esto subraya la necesidad de considerar la resistencia a estos factores antimicrobianos en la búsqueda de lactobacilos adecuado para ser utilizados como probióticos.

Vaginosis Bacteriana

15 La vaginosis bacteriana es causada por un crecimiento excesivo de las especies bacterianas generalmente ausentes en la flora vaginal o que se encuentran en cantidades muy pequeñas. Las especies más comunes son *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae*, pero un agente etiológico preciso no se ha encontrado hasta ahora. Aproximadamente, 1 de cada 5 mujeres desarrollará vaginosis bacteriana a lo largo de un intervalo de entre 6 y 12 meses. Aunque la vaginosis bacteriana puede causar descargas vaginales inusuales y olor a pescado, la mayoría de los casos son asintomáticos. Una característica típica de la vaginosis bacteriana es el aumento del pH por encima de aproximadamente 4,5, debido a la desaparición de los lactobacilos, lo que facilita aún más el crecimiento de otras especies bacterianas.

20 La vaginosis bacteriana se trata con antibióticos, como metronidazol y clindamicina. Sin embargo, la vaginosis bacteriana muestra una alta tasa de recurrencia, hasta un 35% durante el primer mes y hasta el 70% durante el primer año. También se ha observado que el tratamiento antibiótico de la vaginosis puede conducir a la candidiasis vulvovaginal con una infección secundaria, ya que los antibióticos, especialmente clindamicina, también afectan a lactobacilos.

25 Además, se ha demostrado que las mujeres que tienen vaginosis bacteriana tienden a tener bebés prematuros o bebés con bajo peso - menos de 2,5 kg -. A veces, la infección puede extenderse a las trompas de Falopio. Este tipo de infección se llama enfermedad inflamatoria pélvica (EIP) y puede causar infertilidad y daños a las trompas de Falopio, lo que aumenta el riesgo de embarazo ectópico. La vaginosis bacteriana también aumenta el riesgo de infecciones del tracto urinario y enfermedades de transmisión sexual.

Probióticos para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal y la vaginosis bacteriana

35 Actualmente existen varias cepas de probióticos comercializados para ayudar a controlar la candidiasis vulvovaginal, como *Lactobacillus rhamnosus* GR1, *Lactobacillus fermentum* RC14, *Lactobacillus plantarum* P17630 y *Lactobacillus acidophilus* NAS. Sin embargo, ninguno de ellos ha sido probado por su capacidad para resistir las elevadas concentraciones de factores antimicrobianos que se producen en aproximadamente 1 de cada 4 casos de infección. Además, sólo hay una solución probiótica (BION Flore Intime®, compuesto por cepas de *Lactobacillus rhamnosus* GR1 y *Lactobacillus reuteri* RC14) para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal cuyas declaraciones de eficacia están respaldadas por un ensayo clínico aleatorio controlado con placebo (Martínez, R.C.R., et al., el tratamiento mejorado de la candidiasis vulvovaginal con fluconazol más probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus reuteri* RC-14. Letters in Applied Microbiology, 2009. Vol. 48 N° 3: páginas 269-274].

40 Por otro lado, hay dos productos probióticos para el tratamiento de la vaginosis bacteriana cuyas declaraciones sobre la salud están respaldadas por estudios clínicos aleatorizados, controlados con placebo.: BION Flore Intime® - *Lactobacillus rhamnosus* GR1 y *Lactobacillus fermentum* RC14 - y EcoVag® - *Lactobacillus gasseri* DSM 14869 y *Lactobacillus rhamnosus* DSM 14870 - (Anukam, K.C., et al, 2006, *supra*; Larsson, P.G., et al, 2008, *supra*).

45 El estado de la técnica describe otras cepas como potenciales probióticos vaginales, tales como el documento EP1436380 B1, que describe la cepa de *Lactobacillus pentosus* NCIMB 41114 aislada a partir de un cultivo fecal obtenido de un individuo adulto sano y cultivada en presencia de tetraciclina. El documento describe que, debido a su capacidad de suprimir el crecimiento de especies de *Candida* y a que la cepa es resistente a tetraciclina y antibióticos relacionados, puede ser útil para combatir el crecimiento indeseable de *Candida* en cualquier región del cuerpo, en particular para el Síndrome del Intestino Irritable. Este documento no dice nada acerca de la actividad inhibitoria de la cepa contra la *Candida glabrata*, ni demuestra la capacidad de la cepa para adherirse al epitelio vaginal y sobrevivir en el ambiente vaginal o resistir frente a las sustancias antimicrobianas presentes en éste, tales como lisozima.

55 Okkers, D.J. *et al.* 1999 describe que la cepa de *Lactobacillus pentosus* TV35b, aislada a partir de las secreciones de fórnix posterior de la vagina de una paciente prenatal, producía un péptido de tipo bacteriocina (pentocina TV35b), que es inhibidora para *Candida albicans*, entre otras especies bacterianas. El documento no dice nada

acerca de la actividad inhibidora de las cepas contra *Candida glabrata* (Okkers, D.J. et al., Caracterización de pentocina TV35b, un péptido de tipo bacteriocina aislado de *Lactobacillus pentosus* con un efecto fungistático en *Candida albicans*, *Journal of Applied Microbiology*, 1999, Vol. 87, Nº 5, páginas 726-734).

5 Por otro lado, el estado de la técnica describe cepas vaginales que no presentan actividad inhibidora contra *Candida albicans*. Por ejemplo, en Dimitonova *et al.* 2007, se evaluó la actividad inhibidora de 20 cepas de lactobacilos, aisladas a partir de muestras vaginales de mujeres búlgaras sanas. Ninguna de las 20 cepas inhibió el crecimiento de *Candida albicans* (Dimitonova, S.P. et al., Actividad antimicrobiana y propiedades protectoras de lactobacilos vaginales de mujeres búlgaras sanas, *Anaerobe*, 2007, Vol. 13, Nº 5-6, páginas 178-184).

10 El estado de la técnica también enseña que la presencia de la actividad inhibidora contra *Candida albicans* no significa que la cepa bacteriana sea también antagonista frente a *Candida glabrata*. Por ejemplo, en Pascual L.M. et al., 2008, una cepa de *Lactobacillus* aislada de la vagina de mujeres no embarazadas, sanas, pre-menopáusicas, fue identificada como *Lactobacillus rhamnosus* L60. *Lactobacillus rhamnosus* L60 mostró un amplio espectro de actividad antimicrobiana contra patógenos urogenitales, y resistencia a antibióticos comúnmente prescritos para las infecciones causadas por estos patógenos. Esta cepa fue antagonista frente a 10 cepas de *Candida albicans*, pero
15 no era antagonista frente a las 3 cepas de *Candida glabrata* sometidas a ensayo (Pascual, L.M. et al., *Lactobacillus rhamnosus* L60, un probiótico potencial aislado de la vagina humana, *Journal of General and Applied Microbiology* 2008, Vol. 54, Nº 3, páginas 141-148).

20 Por lo tanto, el hecho de que los lactobacilos descritos como potenciales para su uso como probiótico vaginal sean aislados de la vagina no significa que presenten actividad inhibidora frente a especies de *Candida*. Por otra parte, el hecho de que una cepa de *Lactobacillus* sea antagonista frente a *Candida albicans* no significa que también posean actividad frente a otras especies de *Candida*, tales como *Candida glabrata*. Por lo tanto, ser antagonista de las especies de *Candida* no es una característica inherente de lactobacilos.

25 El documento WO 2012/101500 A1 describe una composición efervescente en forma sólida para uso en aplicaciones vaginales para el tratamiento de infecciones vaginales. La composición efervescente comprende, entre la presencia de agentes patógenos en el entorno vaginal. La cepa se selecciona de una larga lista de las especies más comunes utilizadas como probióticos, del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El documento no incluye un ensayo para evaluar las propiedades de las cepas. La invención está enfocada a la composición galénica diseñada para potenciar la supervivencia de los probióticos durante su fabricación y para mejorar la administración. Las cepas mencionadas en el documento están comercialmente disponibles y los patógenos mencionados son comunes en las patologías vaginiales.
30

35 El documento JP 2008013502 A describe el uso de un producto obtenido mediante un proceso de fermentación de una planta crucífera, tal como, por ejemplo, brócoli, con bacterias del ácido láctico, tales como *Lactobacillus pentosus*, para tratar o prevenir infecciones por *Candida*, tales como la vaginitis. Se realizan ensayos con cepas depositadas de *Candida albicans*. Este documento no dice nada acerca de la actividad inhibitoria del producto fermentado contra *Candida glabrata*.

40 Por otro lado, como se explicó anteriormente, las sustancias antibacterianas en el fluido vaginal se incrementan más allá de los niveles normales en aproximadamente el 25 % de las mujeres que experimentan una candidiasis vulvovaginal. Estas sustancias tienen un efecto inhibitorio significativo sobre lactobacilos. Algunos lactobacilos se utilizan actualmente como probióticos vaginales, sin embargo, ninguno de ellos ha sido sometido a ensayo en cuanto a la capacidad de sobrevivir en las condiciones en que los factores antimicrobianos se incrementaron en el fluido vaginal. Por otra parte, ninguno de los probióticos vaginales actuales ha sido sometido a ensayo en cuanto a su actividad específica contra *Candida glabrata*. *C.glabrata* representa una fracción significativa de las infecciones por *Candida* y muestra una mayor resistencia a los tratamientos antimicóticos actuales, presentando así un mayor reto terapéutico.

45 **SUMARIO DE LA INVENCION**

50 Los inventores proporcionan una nueva cepa de *Lactobacillus pentosus* adecuada como un probiótico para el tratamiento de infecciones vaginales, como resultado de extensos estudios de diferentes cepas de lactobacilos aislados a partir de seres humanos sanos. La cepa I1001 fue aislada de la flora vaginal de una mujer joven y sana que vivía en malas condiciones higiénicas. La cepa de *Lactobacillus pentosus* fue depositada el 06 de marzo de 2009 en la Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980, Paterna, Valencia, España), por el depositante AB-Biotics, SA, situada en el Edificio Eureka, oficina P1M1.1, Campus UAB, Bellaterra-08193 (España). La cepa de *L. pentosus* recibió el número de acceso CECT 7504 después de que la Autoridad Internacional de Depósito declarara la cepa viable.

55 El depositante AB-Biotics, S.A. autoriza a la solicitante, GYNEA Laboratorios S.L., a referirse al mencionado material biológico depositado en la solicitud de patente europea con número de referencia del representante P2723EP00 o en cualquier solicitud de patente posterior derivada de ella o reivindicando prioridad de ella, y dio su consentimiento

incondicional e irrevocable de que el material depositado esté a disposición del público de conformidad con Artículo 33 EPC a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente antes mencionada.

La cepa CECT 7504 fue seleccionada entre las 100 cepas de lactobacilos aisladas debido a las siguientes propiedades distintivas:

- 5 • Alta supervivencia a los factores antimicrobianos que se encuentran en el fluido vaginal, especialmente lisozima. Como se explicó anteriormente, estos factores a menudo se incrementan en un subconjunto de pacientes con candidiasis (aproximadamente el 25% de los casos), y podría ser muy perjudicial para muchos probióticos. Como se indica en la sección de ejemplos, sólo una fracción de los lactobacilos de origen vaginal puede sobrevivir al aumento de las concentraciones de lisozima que se pueden encontrar en pacientes con candidiasis vulvovaginal, pero no en
- 10 pacientes sanos (véase el EJEMPLO 3 que figura más abajo, donde 10 cepas de *Lactobacillus* son evaluadas). Esto significa que la resistencia a estas proteínas no es una característica inherente de lactobacilos. Por otra parte, se cree que ninguna técnica anterior describe probióticos vaginales con la capacidad de sobrevivir en las condiciones en las que la concentración de factores antimicrobianos naturales se incrementa en el fluido vaginal. Por lo tanto, los probióticos conocidos no serían eficaces para este subconjunto de pacientes. Sorprendentemente, la cepa CECT
- 15 7504 mostró una resistencia marcada a estas condiciones, por lo tanto, está especialmente indicada para este subconjunto de pacientes. En particular, la cepa CECT 7504 mostró una alta resistencia a la lisozima en concentraciones de hasta 16 mg/l (véase la FIG. 2). La lisozima es el factor antimicrobiano que se encuentra en la concentración más alta en el fluido vaginal, además de ácidos orgánicos, y el único cuya actividad está más dirigida contra organismos Gram-positivos, tales como *Lactobacillus*. Por otro lado, la cepa comercial de *L. plantarum*
- 20 P17630 (ISADIN) mostró una marcada disminución de la viabilidad (90%) cuando se expone a concentraciones de lisozima superiores a 4 mg/l, tales como las que se pueden encontrar en algunos pacientes con candidiasis vulvovaginal.
- La capacidad de inhibir el crecimiento tanto de *C. albicans* como de *C. glabrata*, mostrando así un espectro de actividades más amplio para ayudar a controlar las infecciones por *Candida*, como la candidiasis vulvovaginal. Como se indica en la técnica de antecedentes y las secciones de ejemplos, algunos lactobacilos de origen vaginal muestran actividad antagonista significativa contra uno o dos aislados de *Candida*, pero solo una fracción pequeña muestra una actividad significativa frente a un panel de varios aislados de ambas especies de *Candida albicans* y
- 25 *Candida glabrata* (véase el EJEMPLO 4). Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, la capacidad de inhibir las cepas de *Candida* no es una característica inherente de lactobacilos. Sorprendentemente, la cepa CECT 7504 mostró una mayor actividad frente a las tres cepas de *C. albicans* sometidas a ensayo en comparación con la cepa probiótica comercial de *Lactobacillus plantarum* P17630, y también mostró una alta actividad contra una cepa de *C. glabrata* y alguna actividad contra una cepa diferente de *C. glabrata*, mientras que tanto *L. plantarum* P17630 como otras cepas de tipo salvaje mostraron baja actividad contra la primera cepa y ninguna actividad contra la última cepa de *C. glabrata* (TABLA 3).
- 30 • La capacidad de sobrevivir frente a altas concentraciones de agentes antimicóticos usados típicamente para tratar las infecciones por *Candida*, permitiendo de este modo que la cepa bacteriana de la presente invención sea co-administrada con dichos agentes antimicóticos.
- Una mejora de la capacidad para acidificar el fluido vaginal en comparación con otros aislados y control comercial, mostrando así un alto potencial para ayudar a tratar la vaginosis bacteriana. La capacidad de acidificar el fluido vaginal es a menudo extrapolada a partir de la capacidad de acidificar los medios de cultivo de laboratorio típicos o
- 40 leche. Sin embargo, la composición del fluido vaginal (baja concentración de nutrientes) es muy diferente de la composición de los medios de laboratorio o leche, que son ricos en nutrientes. En su lugar, la cepa de la invención ha sido sometida a ensayo en un medio que simula la composición real de fluido vaginal.
- La capacidad de adherirse fuertemente a las células epiteliales vaginales.
- 45 • Un buen crecimiento en medio industrial.
- Buena tolerabilidad cuando se sometió a ensayo en un modelo animal de irritación vaginal.
- Buena tolerancia y capacidad de colonización cuando se sometió a ensayo en voluntarios humanos.

En resumen, se cree que ninguna técnica anterior describe una cepa de *Lactobacillus* y, en particular, una cepa de

50 *Lactobacillus pentosus* con las características antes mencionadas. La técnica describe otras cepas de *Lactobacillus* particularmente buenas para una de dichas características, pero lo que es digno de mención es que la cepa de *Lactobacillus pentosus* CECT 7504 cumple con todas esas cualidades juntas. Además, para cumplir las características clave mencionados anteriormente para el tratamiento de las infecciones vaginales, la cepa de la invención también presenta buenas características probióticas relacionados con la falta de toxicidad, la viabilidad, la adhesión y efectos beneficiosos. Los ejemplos que figuran más abajo proporcionan (a modo de ejemplo) protocolos para determinar cada una de las características probióticas y también se demostró que la cepa CECT 7504 tiene

55 excelentes características probióticas.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de *Lactobacillus pentosus* CECT 7504. La expresión "cantidad eficaz" como se usa aquí, significa una cantidad de agente lo suficientemente alta como para presentar el beneficio deseado, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del juicio médico.

5 Una amplia variedad de especies bacterianas del ácido láctico tiene un largo historial de uso seguro aparente. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha desarrollado un sistema de concesión del estado de "Presunción Cualificada de Seguridad" (QPS) de las unidades taxonómicas con un largo historial probado de uso aparentemente seguro. La cepa CECT 7504 pertenece a una especie bacteriana que tiene un estatus QPS (Andreoletti, O., et al., El mantenimiento de la lista de microorganismos QPS añaden intencionadamente a los alimentos o piensos. Pregunta n.º: EFSA-Q-2008-006, The EFSA Journal, 2008, Vol. 923: páginas 1-48)].

10 La aparición y propagación de la resistencia a los agentes antimicrobianos en las bacterias representan una amenaza para la salud humana y animal y presentan un importante coste económico y social. Cuando la resistencia a un agente antimicrobiano es inherente a una especie bacteriana, se conoce generalmente como 'resistencia intrínseca' (a veces llamada 'resistencia natural'). Se presume que la resistencia intrínseca presenta un potencial mínimo de propagación horizontal, mientras que la resistencia adquirida mediada por los genes añadidos se considera que tiene un alto potencial de dispersión lateral. Los inventores de la presente invención han encontrado que la cepa que forma la composición de la invención no presenta resistencia significativa alguna a los antibióticos de importancia humana y / o veterinaria (ampicilina, gentamicina, estreptomina, eritromicina, tetraciclina, clindamicina y cloranfenicol) según las directrices de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (Bories, G., et al., Actualización sobre los criterios utilizados en la evaluación de la resistencia bacteriana a los antibióticos de importancia humana o veterinaria. The EFSA Journal, 2008, Vol. 732: páginas 1-15), lo que evita el riesgo de una posible transferencia de la resistencia a los antibióticos a las especies patógenas.

15 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de la cepa de la invención, para su uso como un producto farmacéutico, un medicamento, un producto alimenticio, un suplemento dietético, un alimento médico, o un producto de higiene personal.

20 Como se dijo anteriormente, la cepa CECT 7504 muestra una actividad significativa frente a especies de *Candida*. Por lo tanto, en un tercer aspecto, la invención proporciona la composición como se ha definido anteriormente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de una composición tal como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un producto farmacéutico, un medicamento, un producto alimenticio, un producto comestible, un suplemento dietético, un alimento médico o un producto de higiene personal para la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis. Éste puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis en un ser humano, que comprende administrar a dicho ser humano que lo necesite una cantidad eficaz de la composición tal como se define en el primer aspecto de la invención.

25 La composición de la invención es particularmente útil para el tratamiento profiláctico de individuos susceptibles a la candidiasis y también para el tratamiento terapéutico de individuos infectados con microorganismos del género *Candida*. En particular, la composición de la invención se puede administrar a bebés, niños y enfermos de SIDA para prevenir o tratar las aftas (candidiasis oral) o la dermatitis del pañal por *Candida*. Además, los pacientes con SIDA se beneficiarían de la composición descrita en este documento como que se reduciría la probabilidad de adquirir una infección por *Candida*, y si se adquiere, experimentarían menos translocación de *Candida* cuando se ingiere por vía oral. La composición también es útil para prevenir infecciones que ponen en peligro el feto en mujeres embarazadas, parto prematuro e infección del tracto urinario.

30 Dada la actividad anti-*Candida* de la cepa CECT 7504, junto con su capacidad de adherirse a las células epiteliales y para soportar los factores antimicrobianos que se encuentran en el fluido vaginal, en una realización particular, la composición de la invención es especialmente útil en la prevención y / o el tratamiento de la candidiasis vaginal. En una realización más particular, la candidiasis es causada por *Candida glabrata*. Como se explicó arriba, la cepa de la invención es especialmente útil en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis vaginal con una respuesta inflamatoria alta.

35 La expresión "alta respuesta inflamatoria" en esta descripción se entiende como el incremento observado durante la candidiasis vulvovaginal en las concentraciones de proteínas antimicrobianas contenidas en el fluido vaginal, tales como lisozima, defensinas y lactoferrina (Valore, E.V., et al. *supra*). Lisozima es una de las sustancias antibacterianas en una concentración elevada en el fluido vaginal. Su concentración varía entre 1 y 4 mg/l en mujeres sanas y mujeres afectadas por la vaginosis bacteriana, pero puede alcanzar 16 mg/l o más en mujeres que padecen candidiasis vulvovaginal. Por lo tanto, la definición de "alta respuesta inflamatoria" de acuerdo con esta descripción puede basarse en los niveles de lisozima. Es difícil establecer los niveles de lisozima a partir de los cuales se pueda considerar que exista "una alta respuesta inflamatoria", debido a que la técnica no los describe. En esta descripción, se puede considerar que "una alta respuesta inflamatoria" está presente cuando las concentraciones de lisozima son iguales a o mayores que 4 mg/ml.

Las infecciones por *Candida* también pueden ocurrir en otros epitelios fuera del tracto vaginal, tales como el epitelio intestinal o el epitelio de la cavidad oral. Por lo tanto, la actividad anti-*Candida* de la cepa CECT 7504 y su capacidad de adherirse al epitelio puede ser útil para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por *Candida* en el intestino o la cavidad oral. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona la composición como se definió anteriormente para su uso en la prevención o el tratamiento de la candidiasis oral y/o la candidiasis intestinal. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de una composición tal como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un producto farmacéutico, un medicamento, un producto alimenticio, un producto comestible, un suplemento dietético, un alimento médico, o un producto de higiene personal para la prevención y/o tratamiento de la candidiasis oral y/o intestinal. Esto puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis oral y/o intestinal en un ser humano, que comprende administrar a dicho ser humano en necesidad del mismo una cantidad eficaz de la composición tal como se define en el primer aspecto de la invención.

Por último, como se dijo anteriormente, la cepa CECT 7504 muestra una alta capacidad de acidificar el medio vaginal. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención proporciona la composición como se define en el primer aspecto de la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la vaginosis bacteriana. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de una composición tal como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un producto farmacéutico, un medicamento, un producto alimenticio, un producto comestible, un suplemento alimenticio, un alimento médico o un producto de higiene personal para la prevención y/o el tratamiento de la vaginosis bacteriana. Esto puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o el tratamiento de la vaginosis bacteriana en un ser humano, que comprende administrar a dicho ser humano que lo necesite una cantidad eficaz de la composición tal como se define en el primer aspecto de la invención.

La composición de la invención puede prepararse en cualquier forma adecuada que no afecte negativamente a la viabilidad de la cepa que forma la composición de la invención. La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para la formulación en vista del propósito particular de la composición está dentro del alcance de las personas ordinarias expertas en la técnica de la tecnología farmacéutica. La composición se puede administrar por vía oral, vaginal o rectal, o el uso de diferentes formas de administración al mismo tiempo (por ejemplo, por vía oral y por vía vaginal).

En este sentido, la composición de la invención está en forma sólida o líquida y puede estar, entre otras cosas, en forma de polvos, comprimidos o pastillas, comprimidos para chupar, preparaciones de película, soluciones, aerosoles, gránulos, píldoras, suspensiones, emulsiones, cápsulas, comprimidos y cápsulas enterocubiertos, jarabes, líquidos, elixires, dulces, goma de mascar, supositorios, micro-enemas, tabletas vaginales, cápsulas de gelatina vaginales, cremas, geles, pomadas, lociones, tampones, servilletas, almohadillas, tiras de fusión, preservativos, pesarios, aerosoles, tintura o extractos fluidos.

La composición de acuerdo con la invención se puede formular en una forma en la que la cepa de la invención sea el único agente activo o esté mezclada con uno o más de otros agentes activos y / o se mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables o aditivos o ingredientes adecuados en el caso de un producto alimenticio o un producto comestible. En una forma de realización particular de la invención, la composición contiene adicionalmente uno o más agentes activos adicionales. Preferiblemente, el agente o agentes activos adicionales son otras bacterias probióticas que no son antagónicas a la cepa que forma la composición de la invención. Debido a la capacidad de la cepa de la invención de sobrevivir a altas concentraciones de agentes antimicóticos usados típicamente para tratar las infecciones por *Candida*, en una realización particular, la composición de la invención se puede administrar en combinación con fármacos antimicóticos de triazol o nistatina en la prevención y / o el tratamiento de la candidiasis. Su compatibilidad se ha demostrado en los ejemplos que figuran más adelante. Dependiendo de la formulación, la cepa se puede añadir como bacterias purificadas, como un cultivo bacteriano, como parte de un cultivo bacteriano, como un cultivo bacteriano que ha sido post-tratado, y solo o junto con portadores o ingredientes adecuados. También pueden añadirse prebióticos.

La expresión "producto farmacéutico" se entiende en su sentido amplio en esta descripción, incluyendo cualquier composición que comprende un ingrediente activo - en este caso, la cepa de la invención preferiblemente en forma de composición, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. La expresión "producto farmacéutico" no se limita a medicamentos. La expresión "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en este documento se refiere a compuestos, materiales, composiciones y / o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico, apropiados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio / riesgo razonable. Cada portador, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Portadores, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos estándar.

El producto farmacéutico puede adoptar diferentes formas o nombres dependiendo de la ruta de aprobación del producto y también en función del país. Por ejemplo, un medicamento es un producto farmacéutico en particular. Un alimento médico es otro producto farmacéutico en particular. Las expresiones "alimento médico" o "alimentos para fines médicos especiales" se utilizan en algunos países para referirse a un alimento especialmente formulado y destinados al tratamiento dietético de una enfermedad que tiene necesidades nutricionales distintivas que no pueden

ser satisfechas solo por una dieta normal. Se definen en normativas tales como la Food and Drug Administration's 1988 Orphan Drug Act Amendments en los Estados Unidos, y la Directiva de la Comisión 1999/21/CE en Europa. Los alimentos médicos son distintos de la categoría más amplia de complementos alimenticios y de alimentos tradicionales que guardan una declaración de propiedades saludables. Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención es un alimento médico.

5 A menudo, las composiciones bacterianas probióticas, tales como la descrita en este documento, se consideran como suplementos alimenticios. Un suplemento alimenticio, también conocido como complemento dietético o complemento nutricional se considera otro producto farmacéutico en particular. Esta es una preparación destinada a complementar la dieta y proporcionar nutrientes o ingredientes beneficiosos que generalmente no se ingieren en la
10 dieta normal o no puede ser consumidos en cantidades suficientes. Sobre todo, los suplementos alimenticios son considerados como productos alimenticios, pero a veces se definen como fármacos, productos naturales para la salud o productos nutraceuticos. En el sentido de la presente invención, los suplementos dietéticos incluyen también nutraceuticos. Los suplementos dietéticos se venden generalmente "over the counter" (de venta libre), es decir, sin receta médica. Si el suplemento alimenticio adopta la forma de una píldora o una cápsula, comprende excipientes
15 que son el mismo que el utilizado en medicamentos. Un suplemento alimenticio, sin embargo, también puede adoptar la forma de un producto alimenticio que está reforzado con algunos nutrientes (por ejemplo, una barrita o yogur).

Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención es un suplemento alimenticio.

20 Si la composición de acuerdo con la invención es un suplemento alimenticio, éste se puede administrar como tal, se puede mezclar con un líquido bebible adecuado, tal como agua, yogur, leche o zumo de fruta, o se puede mezclar con alimentos sólidos o líquidos. En este contexto, el suplemento alimenticio puede estar en forma de comprimidos o pastillas, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, sobres, dulces, barras, jarabes y formas de administración correspondientes, generalmente en forma de una dosis unitaria. Preferiblemente, el suplemento
25 alimenticio que comprende la composición de la invención se administra en forma de comprimidos, pastillas, cápsulas o polvos, fabricado en procesos convencionales de preparación de suplementos dietéticos.

La cepa de la invención puede ser también incluida en una variedad de productos alimenticios o productos comestibles, tales como productos lácteos (un yogur, un queso, una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado a base de leche, un helado, un producto a base de cereal fermentado, un polvo a base de
30 leche), pan, barras, coberturas, galletas y cereales, una bebida o un aliño. La expresión "producto comestible" se usa aquí en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que puede ser ingerida por un animal, es decir, un producto que es organolépticamente aceptable. La expresión "producto alimenticio" se entiende como un producto comestible que también proporciona un soporte nutricional para el cuerpo. Ejemplos de otros productos alimenticios son productos de carne (por ejemplo, salchichas o carne para untar), coberturas de chocolate, rellenos y glaseados, chocolate, productos de confitería, productos horneados
35 (tartas, pasteles), salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores de café. Productos alimenticios particularmente interesantes son los suplementos dietéticos y las fórmulas infantiles. El producto alimenticio comprende preferentemente un material de soporte tal como gachas de avena, alimentos fermentados de ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, hidratos de carbono, proteínas y proteínas glicosiladas. En una forma de realización particular, la cepa de la invención está encapsulada o recubierta.

40 Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención es un producto alimenticio.

Algunas de las formas antes mencionadas se consideran dispositivos médicos en algunos países, por ejemplo, cápsulas vaginales, un tampón u otros tipos de aplicadores. Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención es un dispositivo médico.

45 En otra realización particular, la composición de la invención es un producto de higiene personal, que puede ser vendido "over the counter" en un supermercado o en una farmacia. Ejemplos de producto de higiene personal son tampones, compresas, toallas sanitarias, pañales, jabones, champús, geles, pomadas, cremas, aerosoles y lociones.

En particular, la composición de la invención está en forma de tabletas intravaginales mucoadhesivas desintegrables que se aplican por vía intravaginal utilizando un dispositivo aplicador. Los comprimidos de 700 mg comprenden particularmente hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa anhidra y ácido cítrico y 100 mg (1-2x10⁹ ufc) de la cepa CECT
50 7504 (véase el EJEMPLO 8).

Por lo tanto, ha de entenderse que la composición de la invención es útil en el tratamiento de la candidiasis y vaginosis bacteriana, independientemente de la forma de la composición, es decir, independientemente de ser un producto farmacéutico, un medicamento, un producto alimenticio, un producto comestible, un suplemento alimenticio, un alimento médico, o un producto de higiene personal.

55 Las cepas de la invención se producen mediante el cultivo de las bacterias en un medio adecuado y bajo condiciones adecuadas. Las cepas se pueden cultivar solo para formar un cultivo puro, o como un cultivo mixto junto con otros microorganismos, o mediante el cultivo de bacterias de diferentes tipos por separado y luego combinándolas en las proporciones deseadas. Después del cultivo, la suspensión celular se recupera y se utiliza

como tal o se trata de la manera deseada, por ejemplo, mediante la concentración o la liofilización para ser empleada posteriormente en la preparación de productos farmacéuticos o comestibles. A veces, la preparación probiótica se somete a un proceso de inmovilización o de encapsulación con el fin de mejorar la vida útil. Varias técnicas para la inmovilización o la encapsulación de bacterias son conocidas en la técnica.

- 5 Es evidente que mediante el uso de la cepa depositada como material de partida, el experto en la materia puede de manera rutinaria, por mutagénesis convencional o técnicas de re-aislamiento, obtener más mutantes o derivados de los mismos que conservan o mejoran las características y ventajas de la cepa que forma la composición de la invención que se describen en la presente memoria. En una forma de realización del primer aspecto de la invención, el mutante se obtiene mediante el uso de tecnología de ADN recombinante. En otra forma de realización del primer aspecto de la invención, el mutante se obtiene por mutagénesis aleatoria. En una tercera forma de realización del primer aspecto de la invención, la variante es una variante que se produce de manera natural. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener un mutante de la cepa de *Lactobacillus pentosus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 7504, que comprende el uso de la cepa depositada como material de partida y la aplicación de mutagénesis, en el que el mutante obtenido conserva o mejora las actividades antimicóticas y / o antibacterianas y/o la capacidad de colonizar el tracto vaginal de la cepa originaria depositada.

- 10 La cantidad eficaz de unidades formadoras de colonias (ufc) para la cepa en la composición será determinada por el experto en la técnica y dependerá de la formulación final. Por ejemplo, cuando se administra por vía oral, la cepa de la invención está presente en la composición en una cantidad que da una dosis diaria eficaz de 10^7 a 10^{12} ufc, de acuerdo con la legislación vigente, preferiblemente de 10^9 a 10^{11} ufc y, cuando se administra por vía vaginal o por vía rectal, en una cantidad que da una dosis diaria eficaz de 10^3 a 10^{12} ufc, preferiblemente de 10^5 a 10^{10} ufc. La expresión "unidad formadora de colonias" ("ufc") se define como el número de células bacterianas reveladas por recuentos microbiológicos en placas de agar. Los suplementos dietéticos contienen por lo general cepas probióticas en una cantidad comprendida entre 10^7 y 10^{12} ufc / g. En una realización particular, la composición de la invención es un suplemento alimenticio que comprende entre 10^9 - 10^{11} ufc / g.

- 20 El uso general de la cepa CECT 7504 es en forma de células viables. Sin embargo, también podría extenderse a células no viables tales como cultivos muertos o lisados celulares (obtenidos, por ejemplo, por la exposición a pH alterado, tratamiento con ultrasonidos, radiación, temperatura o presión, entre otros medios para matar o lisar bacterias) o composiciones que contienen factores beneficiosos producidos por la cepa CECT 7504.

- 30 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretende excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Objetos adicionales, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la puesta en práctica de la invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en este documento.

- 35 Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan en este documento para fines ilustrativos, y sin pretender que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Patrones de electroforesis de campo pulsante de ADN genómico restringido con *Sma*-I y *Sfi*-I de (de derecha a izquierda): *Lactobacillus pentosus* CECT 7504 (I1001), *Lactobacillus plantarum* P17630 y marcador molecular de ADN (M).

5 La FIG. 2 muestra el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* en un fluido vaginal simulado suplementado con lisozima (concentración final 0, 4 y 16 mg/l). "Lys" significa "lisozima". I1001 es la cepa CECT 7504 y P17630 es la cepa control de *L. plantarum* P17630.

10 La FIG. 3 muestra cómo la cepa *L. pentosus* CECT 7504 (I1001) presenta un crecimiento equiparable al probiótico bien conocido *L. rhamnosus* GG en un medio de cultivo que simula un medio industrial. "t" representa "tiempo" y ufc/ml son el número de células viables.

15 La FIG. 4 muestra la cantidad de ADN de las especies *L. pentosus* y *L. plantarum* encontrados en el fluido vaginal de mujeres voluntarias participantes en el estudio después de la administración del producto. Los datos se expresan como medias y error estándar de la media (SEM). El tiempo se indica en horas tras la administración; las copias de ADN por ml de fluido vaginal están en una escala logarítmica. Los círculos en blanco corresponden a datos de voluntarios que toman el producto durante 5 días consecutivos, y los círculos negros corresponden a datos de voluntarios que toman el producto durante 3 días consecutivos.

EJEMPLOS

Tal como se usa en este documento, I1001 corresponde a *Lactobacillus pentosus* CECT 7504.

EJEMPLO 1. Aislamiento del microorganismo

20 La cepa CECT 7504 fue aislada de torundas vaginales de mujeres jóvenes y sanas de entre 14-21 años de edad que viven en malas condiciones higiénicas. Las muestras se disolvieron en tampón PBS a pH 7,4, y se sembraron alícuotas en diferentes medios para la incubación en diferentes condiciones. El tiempo de incubación dependió de la tasa de crecimiento de la cepa y funciona normalmente a partir de 24 h hasta 3 días. El aislamiento de cepas individuales se realizó con los mismos medios de selección, a continuación, se realizaron tinciones Gram y ensayos de los exámenes microscópicos para su caracterización inicial.

25 La cepa se cultivó inicialmente en medio MRS complementado con 100 µg/l de novobiocina (Sigma), 5 µg/ml de nistatina 5 µg/ml de cicloheximida (Sigma), 1 mg/l de ampicilina, 10 µg/ml de vancomicina y se incubaron a 30 °C en condiciones anaerobias y pH 6,4. La tinción Gram mostró una clara tinción Gram-positiva, así como morfología de bacilos no formadores de esporas.

30 EJEMPLO 2. Caracterización taxonómica de la cepa

35 Las bacterias se recogieron, lavaron y resuspendieron en tampón de pre-lisis (480 ml de EDTA 50 mM, pH 8,0; 120 ml de lisozima 10 mg/ml) a 37 °C durante 60 min. Se extrajo el ADN utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega). Después de la centrifugación de las bacterias pre-tratadas a 14000 g durante 2 min para eliminar el sobrenadante, se siguió el protocolo de Promega. Brevemente, las bacterias se resuspendieron en solución de lisis de núcleos y se incubaron a 80 °C durante 5 min y después se enfriaron a temperatura ambiente. Los lisados celulares se incubaron en solución de RNasa a 37 °C durante 60 min y las proteínas se precipitaron mediante la adición de la solución de precipitación de proteínas y agitación a alta velocidad. Las muestras se enfriaron y se centrifugaron a 15000 g durante 3 min. Los sobrenadantes que contenían el ADN se transfirieron a tubos limpios de microcentrífuga de 1,5 ml y se mezclaron con 600 µl de isopropanol por inversión. El ADN se recogió por centrifugación a 15000 g durante 2 min y se vertió cuidadosamente el sobrenadante. Las muestras de ADN se lavaron con 600 µl de etanol al 70% invirtiendo suavemente el tubo varias veces. El etanol se separó por aspiración, después de la centrifugación a 15000 g durante 2 min. Por último, el sedimento de ADN se resuspendió en 100 µl de una solución de rehidratación mediante incubación a 65 °C durante 1 h. Las muestras fueron almacenadas a 2-8 °C.

45 2.1. Identificación de géneros y especies

El ARNr 16S fue amplificado por PCT utilizando los cebadores universales Eub27f y Eub1492r, que producen un fragmento de la secuencia prácticamente completa del gen 16S (más de 1.400 nucleótidos) (TABLA 1). Después, el ADN se lavó utilizando el kit 10 Quiaquick (Quiagene).

TABLA1. Cebadores usados para la amplificación y secuenciación del gen 16S

Paso	Cebador	Orientación	Secuencia 5' →3'
Amplificación	Eub27f	directa	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO: 1) 5
	Eub1492r	inversa	TACGGYTACCTTGTACGACTT (SEQ ID NO: 2)
Secuenciación	27f	directa	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO: 3)
	357f	directa	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO: 4) 10
	907r	inversa	CCGTC AATTCCTTTGAGTTT (SEQ ID NO: 5) 15
	1492r	inversa	GGTTACCTTGTACGACTT (SEQ ID NO: 6)

Se realizaron cuatro reacciones de secuenciación consecutivas para cada muestra en

20 un analizador genético 3130 (Applied Biosystems), utilizando el kit BigDye v.3.1 y los cebadores que se muestran en la TABLA 1. La recogida de datos y los cromatogramas fueron construidos usando el software de Análisis de Secuencia de ADN v.5.2 (Applied Biosystems) y se examinó mediante análisis visual con Chromas (Technelysium Pty Ltd.) y BioEdit (Ibis Biosciences). SEQ ID NO: 7 es la secuencia del gen 16S de la cepa CECT 7504.

25 La identificación de género se realizó mediante la herramienta Ribosomal Database Project (RDP) (Wang, Q., et al., Clasificador bayesiano Naive para una rápida asignación de secuencias de ARNr en la nueva taxonomía bacteriana. Appl. Environ. Microbiol., 2007, Vol. 73 (16): páginas 5261-5267]. La identificación de especies se realizó por comparación de la secuencia obtenida con secuencias de 16S de las cepas tipo, en el Ribosomal Database Project (Cole, J.R., et al, The Ribosomal Database Project (RDP-II) introduce myRDP y los datos públicos de calidad controlada Nucl. Acids Res., 2007, Vol. 35 (suppl_1). páginas. D169-172). El emparejamiento más cercano para la cepa de *Lactobacillus pentosus* JCM 1558 (100% puntuación de similitud máxima), que es la cepa tipo de la especie *Lactobacillus pentosus*. La secuencia 16S de la cepa CECT 7504 también se alineó con la base de datos de secuencias NCBI usando BLAST, dando como resultado un emparejamiento muy próximo con la cepa de *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0676. Debido al hecho de que las bases de datos de secuencias son dinámicas al incorporar continuamente nuevas secuencias genéticas, la cepa CECT 7504 se puede clasificar como *Lactobacillus pentosus* o *Lactobacillus plantarum*. Es sabido que las especies *Lactobacillus plantarum* y *pentosus* están estrechamente relacionadas, siendo así intercambiables en la práctica.

35 **2.2. Genotipado de la cepa**

40 La caracterización se realizó por digestión genómica y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE). La cepa CECT 7504 se sometió a un protocolo previamente descrito (Rodas, A.M., et al, Estudio polifásico de cepas de *Lactobacillus* de vino: Implicaciones taxonómicas. Int J Syst Evol Microbiol, 2005. Vol. 55 (1): páginas 197-207) con modificaciones menores. Las cepas se cultivaron en placas de agar MRS y se incubaron a 37 °C 5% de CO₂ durante 18 h. Las células se recogieron y se lavaron 3 veces en 8 ml de PET (Tris 10 mM, pH 7,6, NaCl 1 M) y después se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en 700 ml de tampón de lisis (Tris 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, SLS al 0,5%, ácido desoxicólico al 0,2%; 1 mg/ml de lisozima; 40 U/ml de mutanolisina; 20 mg/ml de RNasa). Un volumen igual de 1,6% de agarosa de bajo punto de fusión (FMC BioProducts, Rockland, ME, EE.UU.) se añadió a las células resuspendidas y se dejó que solidificara a 4 °C durante 1 h. Los insertos se transfirieron a 2 ml de tampón de lisis II (EDTA 0,5 M pH 9,2, 1% de N-lauril sarcosina y 1 mg / ml de pronasa) y se incubaron a 50 °C durante 48 h. Los insertos se lavaron entonces a temperatura ambiente con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). La digestión total del ADN se realizó separadamente con enzimas de restricción *Sma*-I y *Sfi*-I (Roche Diagnostics). La cepa probiótica comercial de *L. plantarum* P17630 se utilizó como control.

50 Una electroforesis en gel de campo pulsado se realizó utilizando un aparato CHEF DRIII (BioRad Laboratories). Los insertos se cargaron en un gel de agarosa al 1% (agarosa SeaKem ME, FMC BioProducts, ME, EE.UU.). La TABLA 2 describe las condiciones de electroforesis para cada enzima. Los marcadores de peso molecular de ADN fueron el marcador de escalera lambda PFG y el marcador de bajo intervalo PFG (New England Biolabs). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y UV utilizando el Sistema GelDoc (BioRad). Los resultados se representan en la FIG. 1.

TABLA2. Condiciones de electroforesis para este estudio

Enzima	Bloque	Pulso inicial (s)	Pulso final (s)	Tiempo (h)
--------	--------	-------------------	-----------------	------------

Sfi-I	1	2	10	10
	2	15	25	6
Sma-I	1	0,5	5	16

5 Como se muestra en la FIG. 1, los patrones de restricción de *Sfi-I* y *Sma-I* de electroforesis de campo pulsante fueron diferentes para la cepa de la invención *L. pentosus* CECT 7504 (I1001) y una cepa control comercial perteneciente a la especie estrechamente relacionada *L. plantarum* (P17630). La PFGE permite distinguir entre cepas de la misma especie, y por lo tanto puede ser utilizada para identificar únicamente una determinada cepa bacteriana dentro de las especies bacterianas (Rodas, A.M., *et al.*, 2005 *supra*).

EJEMPLO 3. Resistencia al fluido vaginal

10 El fluido vaginal contiene una gran variedad de factores antimicrobianos que actúan por diferentes mecanismos, tales como pH ácido, lisozima, lactoferrina y defensinas. Por lo tanto, demostrar que una cepa bacteriana es capaz de sobrevivir en un ambiente ácido (Dho, G., *et al.*, Características microbianas de *Lactobacillus plantarum* P17630 contenida en supositorios vaginales. GIMMOC, 2003. Vol. VII (2): páginas 102-8) no es garantía suficiente de que esta cepa será capaz de sobrevivir en el entorno vaginal, ya que contiene otros factores antimicrobianos además de pH ácido.

Fluido Vaginal (Sintético)

15 Se utilizó un simulador de fluido vaginal (Owen, D.H. *et al.*, Un simulador de fluido vaginal. Contraception, 1999. Vol. 59 N° 2: páginas 91-5], al que se añadieron proteínas y péptidos antibacterianos: 3,5 g/l de NaCl, 1,4 g/l de KOH, 0,22 g/l de Ca(OH)₂, 0,02 g/l de BSA, 2 g/l de ácido láctico, 1 g/l de ácido acético, 0,16 g/l de glicerol, 0,4 g/l de urea y 5 g/l de glucosa. El pH se ajustó posteriormente a 4,2 con ácido láctico.

Proteínas Antibacterianas

20 La lisozima es una de las sustancias antibacterianas en una mayor concentración en el fluido vaginal. Su concentración varía entre 1 y 4 mg/l en mujeres sanas o mujeres afectadas por vaginosis bacteriana, pero puede llegar a 16 mg/l o más en mujeres que padecen candidiasis vulvovaginal (Valore, E.V., *et al.*, 2006, *supra*). La lisozima tiene un amplio espectro de actividad antibacteriana, pero es especialmente activa contra bacterias, tales como lactobacilos. Por lo tanto, es de gran importancia para asegurar la selección de una cepa capaz de sobrevivir a altas concentraciones de lisozima con el fin de obtener un probiótico que puede beneficiar a todas las mujeres con candidiasis vulvovaginal.

Péptidos Antibacterianos

30 La actividad de defensinas β -2 y β -3 contra *Lactobacillus* ha sido bien documentada. Sin embargo, la defensina β -2 se encuentra en una concentración 30 veces menor que la defensina β -3 (Ghosh, S.K., *et al.*, cuantificación de defensinas beta-2 y -3 en los fluidos corporales: Aplicación de Estudios de la inmunidad innata. Clin Chem., 2007. Vol. 53 N°4: páginas 757-765]. La concentración de defensina β -3 en el fluido vaginal puede estar entre 1 y 5 mg/l.

35 Por el contrario, otras proteínas antimicrobianas, tales como lactoferrina, tienen poca actividad frente a *Lactobacillus*, por ejemplo, la actividad antibacteriana de la lactoferrina se basa principalmente en la interrupción del metabolismo de hierro bacteriano y los lactobacilos no requieren hierro para crecer (Archibald, F., Manganeso: su adquisición por parte y en función de las bacterias del ácido láctico. Critical Rev. Microbiol., 1986. Vol. 13 N°1: páginas 63-109].

40 Las cepas de lactobacilos se cultivaron durante la noche en caldo MRS. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en PBS a razón de 10⁷ ufc / ml. Se inocularon 20 μ l de la suspensión celular en 200 μ l de fluido vaginal simulado complementado con lisozima (0, 4 y 16 mg/l de concentración final) o 4 mg/l de lisozima más defensina β -3 (0, 2 y 4 mg/l de concentración final). Las placas de microtitulación se incubaron durante 3 h a 37 °C y el número de células viables que quedan en cada pocillo se contó mediante dilución en serie y siembra en agar MRS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

45 De 10 cepas de lactobacilos aisladas, la cepa CECT 7504 fue una de las cinco cepas que muestran resistencia tanto a la lisozima y como a la defensina β -3. La cepa CECT 7504 mostró una alta resistencia a concentraciones de lisozima de hasta 16 mg/l (véase la FIG. 2). Por otro lado, la cepa control *L. plantarum* P17630 (ISADIN) mostró una marcada disminución de la viabilidad (90%) cuando se expone a concentraciones de lisozima por encima de 4 mg/l, tales como las que se pueden encontrar en una fracción significativa de pacientes con candidiasis vulvovaginal.

Es de destacar, que tanto la cepa CECT 7504 como la cepa de *L. plantarum* P17630 eran resistentes a concentraciones de defensina β -3 de 2 mg/l y 4 mg/l, ya sea solo o en combinación con 4 mg/l de lisozima, lo que indica que ambas están preparadas a sobrevivir en el entorno de una vagina sana.

EJEMPLO 4. Propiedades anti-microbianas**4.1. Actividad contra *C. albicans* y *C. glabrata***

5 La actividad frente a *C. albicans* y *C. glabrata* fue sometida a ensayo usando el método de capa de agar. Brevemente, las cepas de lactobacilos se cultivaron durante la noche en agar MRS (Scharlab) y se colocaron con un asa estéril para bacterias como dos líneas rectas cruzadas. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y posteriormente se recubrieron con 6 ml de medio líquido YM (Scharlab) inoculado con 20 µl de un cultivo durante la noche de *Candida* en caldo YM. Las placas se dejaron enfriar y se incubaron de nuevo durante 14 h y la zona de inhibición se midió en tres puntos diferentes. Las cepas de lactobacilos fueron inicialmente sometidas a ensayo contra una cepa de *C. albicans* (CECT 1392). Las cepas que mostraban una actividad significativa fueron posteriormente sometidas a ensayo frente a cuatro cepas más de *Candida*: *C. albicans* CECT 1472 y 1002 y *C. glabrata* CECT 1448 y CECT 1900. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

10 De 46 cepas de lactobacilos aisladas a partir de muestras vaginales, 35 mostraron una actividad significativa frente a *C. albicans* CECT 1392. Sin embargo, sólo 8 cepas de lactobacilos muestran una actividad significativa contra las tres cepas de *C. albicans*. Además, sólo 3 cepas de lactobacilos muestran una actividad significativa, tanto frente a cepas de *C. albicans* como de *C. glabrata*. Una muestra de los resultados se muestra en la TABLA 3.

TABLA3

Cepa probiótica	<i>C.albicans</i> CECT 1392	<i>C.albicans</i> CECT 1472	<i>C.albicans</i> CECT 1002	<i>C.glabrata</i> CECT1448	<i>C.glabrata</i> CECT 1900
CECT7504	++	+	+++	++	+
P17630	+	+	++	+	-
Aislado 1036	+	+	-	-	-
Aislado 1048	+	+	-	-	-
Aislado 1056	+	+	-	-	-
Aislado 2029	+	+	++++	++	+
Aislado 2058	+	+	++	-	-
Aislado 2099	+	+	-	-	-
Aislado 3103	+	+	-	-	-
Aislado 3124	+	+	-	-	-
Aislado 3172	+	+	++	+	-
Grado de inhibición: +++> 5mm; ++ 3-5 mm; + 1-3 mm; - no inhibición					

20 La cepa CECT 7504 mostró una mayor actividad frente a las tres cepas de *C. albicans* en comparación con la cepa probiótica comercial *Lactobacillus plantarum* P17630. La mayor parte de los lactobacilos de tipo salvaje sometidos a ensayo mostraron actividad contra dos cepas como máximo. Además, la cepa CECT 7504 mostró una alta actividad contra una cepa de *C. glabrata* y alguna actividad contra una segunda cepa, mientras que tanto *L. plantarum* P17630 como otras cepas de tipo salvaje mostraron baja actividad contra la primera cepa y ninguna actividad contra la segunda cepa (TABLA 3).

4.2. Acidificación del entorno vaginal

25 Es ampliamente aceptado que una de las funciones fundamentales de la flora vaginal sana es la acidificación del fluido vaginal para prevenir el crecimiento excesivo de especies bacterianas no deseables, es decir, la vaginosis bacteriana, principalmente a través de la producción de los ácidos láctico y acético. Por lo tanto, una alta producción de ácido láctico es un rasgo deseable para una cepa probiótica para la gestión de la vaginosis bacteriana.

5 La capacidad de acidificar el fluido vaginal se extrapola a menudo a partir de la capacidad de las cepas de acidificar medios de cultivo de laboratorio típicos o leche. Sin embargo, la composición del fluido vaginal (baja concentración de nutrientes) es bastante diferente de la composición de los medios de cultivo de laboratorio o de la leche, que son ricos en nutrientes. Por lo tanto, suponiendo que una cepa tenga una buena capacidad para sobrevivir, crecer y acidificar el fluido vaginal debido a su capacidad de sobrevivir, crecer y acidificar un medio con una composición diferente es por lo menos arriesgada.

10 Con el fin de detectar el potencial para acidificar el fluido vaginal, se utilizó una simulación del fluido vaginal modificado (Owen, D.H. et al., 1999, *supra*) complementado con 4 mg/l de lisozima (la concentración más alta observada en la vaginosis bacteriana (Valore, E.V., et al, 2006, *supra*): 3,5 g/l de NaCl, 1,4 g/l de KOH, 0,22 g/l de Ca(OH)₂, 0,02 g/l de BSA, 2 g/l de ácido láctico, 1 g/l de ácido acético, 0,16 g/l de glicerol y 0,4 g/l de urea. El pH se ajustó a 5,5 usando NaOH 1N y la glucosa se añadió a 20 g/l para ser capaz de detectar una gota en el pH causado por la fermentación.

15 Las cepas de lactobacilos se cultivaron durante la noche en caldo MRS y se inocularon 50 µL en 3 ml de fluido vaginal simulado modificado. Se midió el pH después de la incubación durante la noche a 37 °C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La cepa CECT 7504 mostró la mayor capacidad de acidificar el fluido vaginal entre las cepas de lactobacilos sometidas a ensayo, que fue significativamente mayor que la capacidad mostrada por la cepa control P17630 (TABLA 4). La capacidad de acidificación de la cepa CECT 7504 también fue la mejor entre los materiales aislados con la actividad más alta frente a *Candida*.

20 TABLA 4

Cepa probiótica	pH final (media ± S.E.M.)	Diferencia estadística frente a control (ANOVA 1 vía con post-ensayo de Dunnett)
CECT 7504	4,44 ± 0,05	P < 0,05 (mejor que el control)
Aislado 2029	4,55 ± 0,03	P > 0,05
Aislado 2058	4,69 ± 0,04	P > 0,05
Aislado 3096	4,70 ± 0,01	P > 0,05
Aislado 3146	4,56 ± 0,01	P > 0,05
Aislado 3172	4,70 ± 0,02	P > 0,05
P17630 (control)	4,59 ± 0,02	-

EJEMLO 5. Adhesión a las células del epitelio vaginal

25 Cepas de lactobacilos marcadas con timidina tritiada se incubaron con cultivos confluentes de células HeLa, una línea celular obtenida a partir del epitelio del cuello uterino vaginal usada previamente para evaluar la adherencia de lactobacilos al epitelio vaginal ([Atassi, F., et al., Cepas de *Lactobacillus* aisladas de la microbiota vaginal de mujeres sanas inhiben *Prevotella bivia* y *Gardnerella vaginalis* en cocultivo y cultivo celular. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2006. Vol. 48 N°3: páginas 424-432; Mastromarino, P., et al, Caracterización y selección de cepas de *Lactobacillus* vaginales para la preparación de comprimidos vaginales. Journal of Applied Microbiology, 2002. Vol. 93 N°5: páginas 884-893]. Esta metodología permite contar todas las células de lactobacilos adheridas en lugar de la toma de muestras parciales de las células epiteliales y la realización de recuentos visuales de lactobacilos adheridos por microscopía, lo que resulta en recuentos más fiables.

35 Nuestra experiencia demuestra que la preincubación en medios ácidos (tales como el fluido vaginal) podría alterar la adherencia de las bacterias, principalmente debido a la expresión de proteínas HSP en la membrana. Por otra parte, es importante tener en cuenta que los presentes estudios se han realizado sobre una monocapa confluyente de células epiteliales para simular las condiciones reales del epitelio, no en las células epiteliales individuales en solución como se informó para otros probióticos (Culici, M., et al, Adherencia de *Lactobacillus plantarum* P17630 a las células epiteliales vaginales y su influencia en la adhesión de *Candida albicans*. GIMMOC, 2004. Vol. 8 N°1: páginas 34-41].

40 Células HeLa se cultivaron hasta 95-100% de confluencia en placas de 24 pocillos. Las cepas de lactobacilos se cultivaron durante la noche en 10 ml de medio MRS con timidina tritiada (10 µCi). Luego, las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación y se resuspendieron a razón de 5x10⁸ ufc/ml en fluido vaginal simulado con

pH ajustado a 5 usando ácido láctico durante 15 min a 37 °C. Partes alícuotas de 0,5 ml se diluyeron en PBS para obtener suspensiones de 2×10^7 ufc/ml y 2.5×10^6 ufc/ml, que son más o menos equivalentes a las bacterias a la proporción de células HeLa de 200:1 y 25:1.

5 Se añadieron 0,5 ml de las suspensiones bacterianas a los pocillos que contenían cultivos confluentes de células HeLa y se co-incubaron durante 45 min a 37 °C. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces con PBS para eliminar las bacterias poco adheridas. Finalmente, se rasparon los pocillos y el contenido se colocó en viales de centelleo para cuantificar la cantidad de timidina tritiada. Además, partes alícuotas de las suspensiones bacterianas inoculadas en las placas de 24 pocillos se colocaron en viales de centelleo para calcular la relación entre la radiactividad y las células bacterianas para cada cepa. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

10 La cepa CECT 7504 muestra mayor adherencia a las células epiteliales vaginales que la cepa control P17630 como se muestra en la tabla a continuación (TABLA 5):

TABLA 5

Cepa probióticas	Relación de bacterias a células 200:1	Relación de bacterias a células 25:1
CECT 7504	$2,35 \pm 0,85 \times 10^5$ bacterias/pocillo	$1,70 \pm 0,30 \times 10^4$ bacterias/pocillo
P17630	$1,05 \pm 0,55 \times 10^5$ bacterias/pocillo	$0,95 \pm 0,05 \times 10^4$ bacterias/pocillo

EJEMPLO 6. Crecimiento en medio industrial

15 Se inoculó un inóculo de 0,5% de un cultivo durante la noche de cada cepa a ensayar en 100 ml de Medio Comestible General (Saarela, M., et al., Ácido de fase estacionaria y tratamientos de calor para la mejora de la viabilidad de las bifidobacterias y lactobacilos probióticos. Journal of Applied Microbiology, 2004. Vol. 96 N° 6: páginas. 1205-1214] pre-calentado a 37 °C, que fue utilizado como un sustituto de los medios industriales. Este medio está compuesto por 20 g/l de glucosa, 30 g/l de peptona de soja, 7 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de $MgSO_4 \times 7 H_2O$ en tampón fosfato potásico 0,01 M (pH 6,3). Las cepas se incubaron a 37 °C y se extrajeron partes alícuotas de 100 µL en diferentes momentos (0, 3, 6 y 23 horas) con el fin de cuantificar el número de células viables mediante recuento en placa. La cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG (Valio Ltd), un probiótico bien conocido, se utilizó como control.

25 La cepa de *L. pentosus* CECT 7504 (I1001) muestra un crecimiento comparable a la del bien conocido probiótico *L. rhamnosus* GG en medio simulando medios industriales, alcanzando concentraciones de 10^9 ufc/ml después de un cultivo durante la noche a partir de un inóculo de 10^6 ufc/ml.

EJEMPLO 7. Tolerancia Vaginal en Conejos tras Administración Repetida

30 La tolerabilidad en la mucosa vaginal se determinó después de la administración de la cepa CECT 7504 a dos concentraciones diferentes (20 y 100 mg/ml, a 5×10^7 ufc/mg) en comparación con un grupo de control (solo vehículo), siguiendo la directriz ISO 10993-10:2002. Conejos hembra New Zealand White de 9-11 semanas de edad, de peso de 2,1 a 2,5 kg, fueron asignados al azar en tres grupos de 6 conejos cada uno y se mantuvieron en jaulas individuales a 17-20 °C y 50-70% de humedad relativa, y fueron alimentados con dieta estándar Teklad 2030C para conejo y agua del grifo ad libitum. Cada conejo se administró a la dosis de 1 ml/día una vez al día durante 7 días consecutivos por vía tópica en la vagina del conejo. Como vehículo se utilizó carboximetil celulosa de sodio al 1% en agua destilada como vehículo. El pH de las formulaciones fue de 7,6 para el vehículo solo, de 5,8 para la dosis de 20 mg/ml y de 5,6 para la dosis de 100 mg/ml.

40 La mortalidad se verificó dos veces al día y los signos clínicos una vez al día. El peso corporal se verificó dos veces durante la aclimatación, inmediatamente antes de la primera y la cuarta administración, y antes del sacrificio. Todos los animales se sacrificaron 24 horas después de la última administración por inyección intravenosa de pentobarbital sódico administrado en la vena de la oreja a una dosis de 60 mg/kg de peso corporal y un volumen de 1 ml/kg, y se realizó la autopsia. El aparato genital de cada animal fue examinado con especial énfasis en la superficie vaginal.

45 Después de separar la grasa y los tejidos adyacentes, los ovarios, la vagina y el útero de cada animal fueron fijados en tampón formalina al 10% neutra. Secciones de las zonas distal, medial y proximal de la vagina fueron embebidas, cortadas a un espesor nominal de 4 micrómetros, y teñidas con hematoxilina y eosina, y se examinaron microscópicamente, graduando las alteraciones observadas de acuerdo con la siguiente escala de evaluación (TABLA 6):

TABLA 6

Graduación de las reacciones	Valor numérico
------------------------------	----------------

1. Epitelio	Normal, intacto	0
	Degeneración celular o aplanamiento	1
	Metaplasia	2
	Erosión focal	3
	Erosión generalizada	4
2. Infiltración de leucocitos (por poder de campo) 400x	Ausente	0
	Mínima (< 25)	1
	Leve (26-50)	2
	Moderada (51-100)	3
	Marcada (>100)	4
3. Congestión vascular	Ausente	0
	Mínima	1
	Leve	2
	Moderada	3
	Marcada, con disrupción de vasos	4
4. Edema	Ausente	0
	Mínima	1
	Leve	2
	Moderada	3
	Marcada	4

5 La evaluación de las propiedades irritantes del producto de ensayo y la tolerabilidad se realiza basándose en las puntuaciones medias obtenidas. Se añaden los grados de evaluación microscópica de todos los animales en el grupo de ensayo y la suma se divide por el número de observaciones para obtener una media del grupo de ensayo, el valor medio de la irritación (MVI). La puntuación máxima es 16. Esto se repite para el grupo de control. La media del grupo de control se resta de la media del grupo de ensayo para obtener el índice de irritación, y se clasifican de acuerdo con la siguiente escala (TABLA 7):

TABLA 7

Grado medio	Índice de irritación (VIM)
0	Ninguna
1 a 4	Mínima
5 a 8	Leve
9 a 11	Moderada
12 a 16	Severa

10 Signos clínicos

No se observaron ni mortalidad ni signos clínicos de toxicidad sistémica durante el período de estudio, y todos los animales sobrevivieron a la autopsia prevista. No se observaron diferencias notables en el peso corporal o la ganancia de peso corporal en el Grupo 2 (20 mg/ml de dosis). La pérdida de peso corporal se registró en dos

hembras del Grupo 3 (100 mg/ml de dosis). Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (prueba de Dunnett) con respecto al grupo de control.

Hallazgos Macroscópicos y Microscópicos

5 Se observó un aumento de la incidencia de la coloración rojiza de la mucosa vaginal en comparación con el grupo de Control después de 7 días de la administración tópica de la cepa CECT 7504 a las concentraciones de 20 mg/ml y 100 mg/ml (5×10^7 ufc/mg). Se observó inflamación en la submucosa vaginal, así como aumento de la incidencia y / o gravedad de la congestión vascular y la infiltración de leucocitos debido a una respuesta inmune. Sin embargo, la respuesta fue dependiente de la dosis, y las alteraciones eran de gravedad mínima a 20 mg/kg y ligera a 100 mg/kg. 10 En general, el valor de irritación media (VIM) obtenido en el Grupo 2 fue de 0,83, lo que indica que no hay respuesta irritativa a la concentración de 20 mg/ml. El valor de irritación media (VIM) obtenido en el Grupo 3 fue de 2,33, lo que indica una irritación mínima en la concentración de 100 mg/ml. Debe tenerse en cuenta que la microflora del tracto genital en la mucosa de conejo es muy escasa, conteniendo básicamente *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Pseudomonas* (Jacques, M., et al., La microflora normal del tracto genital de la hembra de conejo. Can J Vet Res., 1986. Vol. 50: páginas 272-4]. Así, a diferencia de la flora vaginal en humanos, casi no hay lactobacilos y, por lo tanto, se observó una reacción inmune a un cuerpo extraño después de la administración de *Lactobacillus pentosus* CECT 7504. 15

EJEMPLO 8. Colonización Vaginal y Tolerabilidad en Voluntarios Femeninos después de la Administración Repetida

20 Un ensayo clínico de diseño abierto se llevó a cabo en 10 voluntarias con edades entre 18-40 años, con el fin de determinar la capacidad de la cepa CECT 7504 para colonizar el epitelio vaginal (como punto final primario) y para evaluar la tolerabilidad del producto (como punto final secundario). La administración se ensayó durante 3 y 5 días para evaluar si la duración de la exposición al probiótico influyó en su capacidad para colonizar el epitelio vaginal. Los criterios de inclusión fueron tener menstruaciones regulares y la voluntad de abstenerse de actividad sexual durante los días de la administración del producto y en la noche antes del día de muestreo. Fueron excluidas las mujeres que usan productos intravaginales, que tiene una infección vaginal o que toman antibióticos a partir de 15 días antes del inicio del estudio, así como mujeres con inmunosupresión, lactantes o embarazadas. El protocolo fue revisado y aprobado por el comité ético del Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), y se llevó a cabo de conformidad con la Declaración de Helsinki y las directrices de Buena Práctica Clínica. 25

30 Se prepararon comprimidos intravaginales mucoadhesivos desintegrables de 700 mg hechas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), lactosa anhidra y ácido cítrico, y que contenían 100 mg ($1-2 \times 10^9$ ufc) de la cepa CECT 7504, con una fuerza de compresión de 60 N. Las voluntarias (21-36 años de edad, mediana de 29 años) fueron asignadas al azar para recibir ya sea comprimidos durante 3 días consecutivos (5 mujeres) o 5 días consecutivos (5 mujeres). Los comprimidos se aplicaron por vía vaginal por las voluntarias antes de ir a dormir, utilizando un dispositivo aplicador. Se utilizaron torundas estériles para recoger muestras de fluido vaginal justo antes de la primera administración y en los días 1, 3 y 8 después de la última administración. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Para evaluar la tolerabilidad, los voluntarios registraron los síntomas vaginales al día durante 3 semanas a partir del primer día de la administración de los comprimidos vaginales. 35

40 Se extrajo el ADN de las muestras usando el sistema automatizado EasyMAG (Biomerieux) y las muestras se ensayaron para determinar la presencia de la cepa CECT 7504 utilizando una PCR cuantitativa específica para las especies *L. pentosus* y *L. plantarum*. La amplificación fijó como objetivo una región de 144 pares de bases dentro de la región intergénica de ARNr 16S-23S. La sonda fue 5'-marcada con FAM y 3'-marcada con NFQ-MGB (Applied Biosystems). La amplificación se llevó a cabo utilizando TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El calentamiento consistió en 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C.

45 La desnaturalización se realizó a 95 °C durante 15 s seguido de hibridación y extensión a 60 °C durante 60 s, durante 45 ciclos. Las secuencias de los cebadores y la sonda se indican a continuación (TABLA 8).

TABLA 8

	Secuencia 5'→3'
Cebador directo	TGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAT(SEQ ID NO: 8)
Cebador inverso	TGTTCTCGGTTTCATTATGAAAAATA(SEQ ID NO: 9)
Sonda	ACATTCTTCGAACTTTGT(SEQ ID NO: 10)

Se encontró que el probiótico era bien tolerado. Se informó de flujo vaginal leve por parte de algunas voluntarias, pero en otros estudios se ha demostrado que es atribuible a la introducción del producto en la vagina y no a la cepa

probiótica, como también se observa este efecto en voluntarios que recibieron el producto placebo (Stapleton A.E ., et al, Ensayo aleatorizado, controlado con placebo de fase 2 de un probiótico *Lactobacillus Crispatus* intravaginal para la Prevención de la infección del tracto urinario recurrente, *Clinical Infectious Diseases*, 2011, Vol. 52 N°10: páginas1212-17). No se encontró el ADN de cepas de *L. pentosus* o de *L. plantarum* en cantidades detectables en la línea base en las voluntarias. Sin embargo, se encontraron un promedio de 10^6 copias de ADN por ml de fluido vaginal en la mañana después de la última administración del probiótico (FIG. 4). Dos días más tarde, el probiótico fue aún detectable independientemente del grupo. En 2 de 5 pacientes en el grupo que recibió el comprimido durante 5 días consecutivos, el probiótico todavía era detectable 8 días después de la última administración, pero no en los que recibieron el producto durante 3 días.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araya, M., et al., Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food - Joint FAO/WHO Working Group, FAO/WHO, Editor 2002, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization: Ontario, Canadá.

15 Anukam, K.C., et al., Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes and Infection*, 2006 Vol. 8 N°12-13: páginas 2772-2776.

Larsson, P.G., et al., Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BMC Women's Health*, 2008, Vol. 8 N°1: página 3.

20 Richter, S.S., et al., Antifungal Susceptibilities of Candida Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, Vol. 43 N°5: páginas 2155-2162

Valore, E.V., et al., Reversible Deficiency of Antimicrobial Polypeptides in Bacterial Vaginosis. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74 N°10: páginas 5693-5702.

25 Martinez, R.C.R., et al., Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Letters in Applied Microbiology*, 2009, Vol. 48 N°3: páginas 269-274.

Okkers, D. J.et al., Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*, *Journal of Applied Microbiology*, 1999, Vol. 87, N° 5, páginas 726-734.

30 Dimitonova, S.P. et al., Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women, *Anaerobe* 2007, Vol. 13, N° 5-6, páginas 178-184.

Pascual, L.M. et al., *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina, *Journal of General and Applied Microbiology* 2008, Vol. 54, N° 3, páginas 141-148.

Andreoletti, O., et al., The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. *Pregunta nº : EFSA-Q-2008-006. The EFSA Journal*, 2008, Vol. 923: páginas 1-48.

35 Bories, G., et al., Update on the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal*, 2008, Vol. 732: páginas 1-15.

Wang, Q., et al., Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, Vol. 73 N°16: páginas 5261-5267.

40 Cole, J.R., et al., The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucl. Acids Res.*, 2007, Vol. 35 (supl_1): páginas D169-172.

Rodas, A.M., et al., Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, Vol. 55 N°1: páginas 197-207.

Dho, G., et al., Microbial characteristics of *Lactobacillus plantarum* P17630 contained in vaginal suppositories. *GIMMOC*, 2003, Vol. VII N°2: páginas 102-108.

45 Owen, D.H. et al., A vaginal fluid simulant. *Contraception.*, 1999, Vol. 59 N°2: páginas 91-95.

Ghosh, S.K., et al., Quantification of Human beta-Defensin-2 and -3 in Body Fluids: Application for Studies of Innate Immunity. *Clin Chem*, 2007, Vol. 53N° 4: páginas 757-765.

Archibald, F., Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Crit Rev Microbiol.*, 1986, Vol. 13 N°1: páginas 63-109.

Atassi, F., et al., *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2006, Vol. 48 N°3: páginas. 424-432.

5 Mastromarino, P., et al., Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. Journal of Applied Microbiology, 2002, Vol. 93 N°5: páginas 884-893.

Culici, M., et al., Adhesion of *Lactobacillus plantarum* P 17630 to vaginal epithelial cells and its influence on *Candida albicans* adhesion. GIMMOC, 2004, Vol. 8 N°1: páginas 34-41.

Saarela, M., et al., Stationary-phase acid and heat treatments for improvement of the viability of probiotic lactobacilli and bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology, 2004, Vol. 96 N°6: páginas 1205-1214.

10 Jacques, M., et al., The normal microflora of the female rabbit's genital tract. Can J Vet Res., 1986, Vol. 50: páginas 272-274.

Stapleton A.E, et al., Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial of a *Lactobacillus crispatus* Probiotic Given Intravaginally for Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection, Clinical Infectious Diseases, 2011, Vol. 52 N°10: páginas 1212-1217.

15 EP1436380 B1

Listado de secuencias

<110> GYNEA Laboratorios S.L.

20 <120> Cepa de *Lactobacillus* como probiótico

<130> P2723PC00

<150> EP13382326

25 <151> 12-08-2013

<160> 10

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

30 <211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <221> fuente

<222> 1..19

<223> /mol_tipo="ADN no asignado " /nota="Cebador directo para la amplificación " /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 1

40 gagtttgatc ctggctcag 19

<210> 2

<211> 22

45 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <221> fuente

<222> 1..22

<223> /mol_ tipo="ADN no asignado " /nota="Cebador inverso para la amplificación " /organismo="Secuencia Artificial"

<400> 2

55 tacggytacc ttgttacgac tt 22

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 742 410 T3

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 5 <223> /mol_tipo="ADN no asignado " /nota="Cebador directo 27f para la secuenciación " /organismo="Secuencia Artificial "

<400> 3
 agagtttgat cctggctcag 20
 10

<210> 4
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..57
 20 <223> /mol_tipo="ADN no asignado " /nota="Cebador directo 357f para la secuenciación " /organismo="Secuencia Artificial "

<400> 4
 cgcccggcgc gccccgcgcc cggcccgcgc ccccccccc cctacgggag gcagcag 57
 25

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..20
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado " /nota="Cebador inverso 907r para la secuenciación " /organismo="Secuencia Artificial "

35 <400> 5
 ccgtcaattc ctttgagttt 20

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado " /nota="Cebador inverso 1492r para la secuenciación " /organismo="Secuencia Artificial "

45 <400> 6
 ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 7
 <211> 1384
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus pentosus
 55

<220>
 <221>fuente
 <222> 1..1384
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Secuencia del gen 16S de la cepa CECT 7504" /organismo="Lactobacillus pentosus"

60 <400> 7
 65 gattggtgct tgcacatga tttacatttg agtgagtggc gaactggtga gtaacacgtg 60

ES 2 742 410 T3

ggaaacctgc ccagaagcgg gggataaac ctggaacag atgctaatac cgcataacaa 120
 cttggaccgc atgggtccgag tttgaaagat ggcttcggct atcacttttg gatgggtcccg 180
 cggcgtatta gctagatggg ggggtaacgg ctcacatgg caatgatagc tagccgacct 240
 gagagggtaa tcggccacat tgggactgag acacggccca aactcctacg ggaggcagca 300
 gtagggaatc ttccacaatg gacgaaagtc tgatggagca acgccgcgtg agtgaagaag 360
 ggtttcggct cgtaaaactc tgttggttaa gaagaacata tctgagagta actgttcagg 420
 tattgacggg atttaaccag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcggtataac 480
 gtaggtggca agcgttgctc ggatttattg ggcgtaaagc gagcgcaggc ggttttttaa 540
 gtctgatgtg aaagccttcg gctcaaccga agaagtgcac cggaaactgg gaaacttgag 600
 tgcagaagag gacagtggaa ctccatgtgt agcggtgaaa tgcgtagata tatggaagaa 660
 caccagtggc gaaggcggct gtctggtctg taactgacgc tgaggctcga aagtatgggt 720
 agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc ataccgtaa cgatgaatgc taagtgttgg 780
 agggtttccg cccttcagtg ctgcagctaa cgcattaagc attccgcctg gggagtacgg 840
 ccgcaaggct gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgggtg agcatgtggt 900
 ttaattcgaa gctacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac atactatgca aatctaagag 960
 attagacggt cccttcgggg acatggatac aggtggtgca tggttgtcgt cagctcgtgt 1020
 cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tattatcagt tgccagcatt 1080
 aagttgggca ctctggtgag actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca 1140
 aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggatgg tacaacgagt 1200
 tgcgaactcg cgagagtaag ctaatctctt aaagccattc tcagttcggg ttgtaggctg 1260
 caactcgctt acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc cgcggtgaat 1320
 acgttcccgg gccttgtaga caccgcccgt cacacatga gagtttgtaa caccxaaagt 1380
 cggt 1384

- 5 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador directo para la cuantificación por PCR en tiempo real "
 /organismo="Secuencia Artificial"
- 15 <400> 8
 tggatcacct ccttctaag gaat 24
- 20 <210> 9
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 742 410 T3

<220>
<221> fuente
<222> 1..27
5 <223> /mol_ tipo="ADN no asignado" /nota="Cebador inverso para la cuantificación por PCR en tiempo real "
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 9
10 tgttctcggg ttccattatga aaaaata 27

<210> 10
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15

<220>
<221> fuente
<222> 1..19
20 <223> /mol_ tipo="ADN no asignado" /nota="Sonda para la cuantificación por PCR en tiempo real "
/organismo="Secuencia Artificial"

<400> 10
acattcttcg aaactttgt 19

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende la cepa de *Lactobacillus pentosus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 7504.
- 5 2. La composición como se define en la reivindicación 1, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis.
3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis vaginal.
4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis vaginal causada por *Candida glabrata*.
- 10 5. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis vaginal con una respuesta inflamatoria elevada.
6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis en combinación con fármacos antimicóticos de triazol o nistatina.
- 15 7. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la candidiasis oral o intestinal.
8. La composición como se define en la reivindicación 1, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la vaginosis bacteriana.
9. La composición como se define en la reivindicación 1, para su uso como un medicamento.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que es un producto farmacéutico.
- 20 11. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que es un producto alimentario o un producto comestible.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, que es un suplemento alimenticio.
13. La composición según la reivindicación 1, que es un producto de higiene personal.
14. Una cepa de *Lactobacillus pentosus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 7504.
- 25 15. Un método para obtener un mutante de la cepa de *Lactobacillus pentosus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 7504, que comprende utilizar la cepa depositada como material de partida y aplicar mutagénesis, donde el mutante obtenido mantiene o potencia las actividades antimicóticas y/o antibacterianas y/o la capacidad de colonizar el tracto vaginal de la cepa originaria depositada.
- 30

FIG. 1

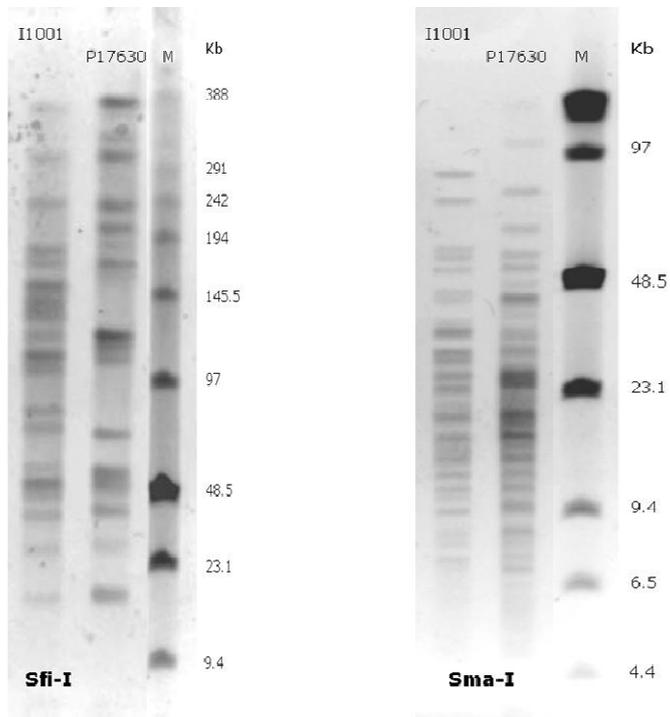


FIG.2

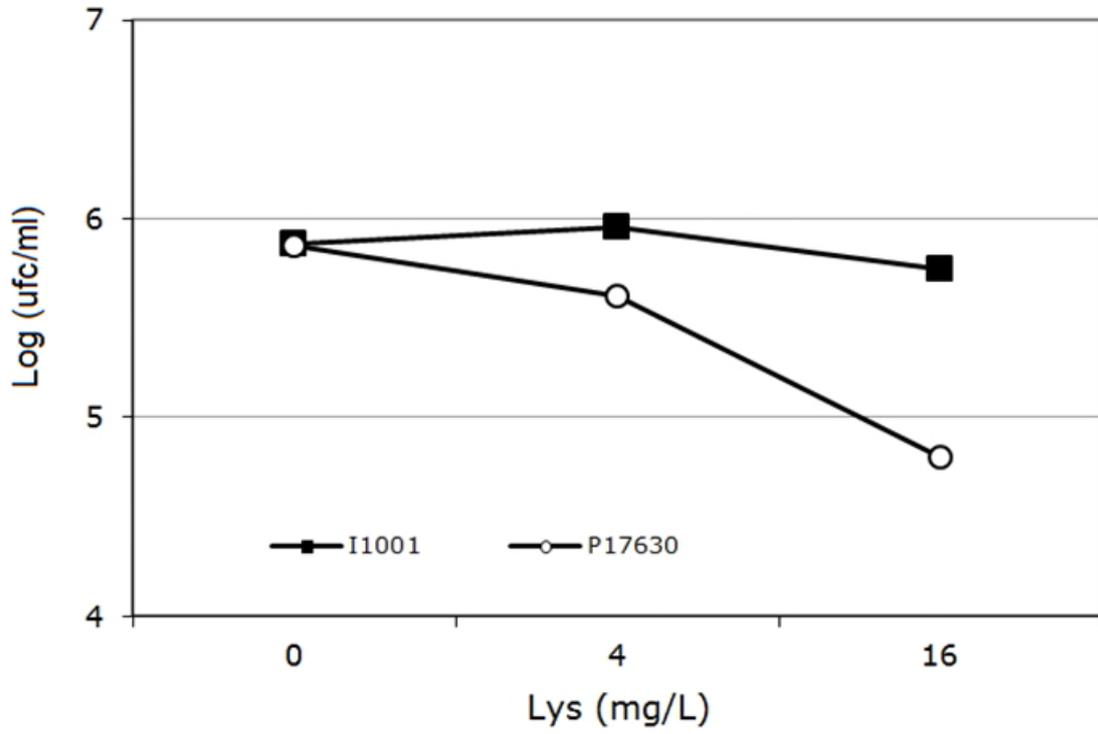


FIG. 3

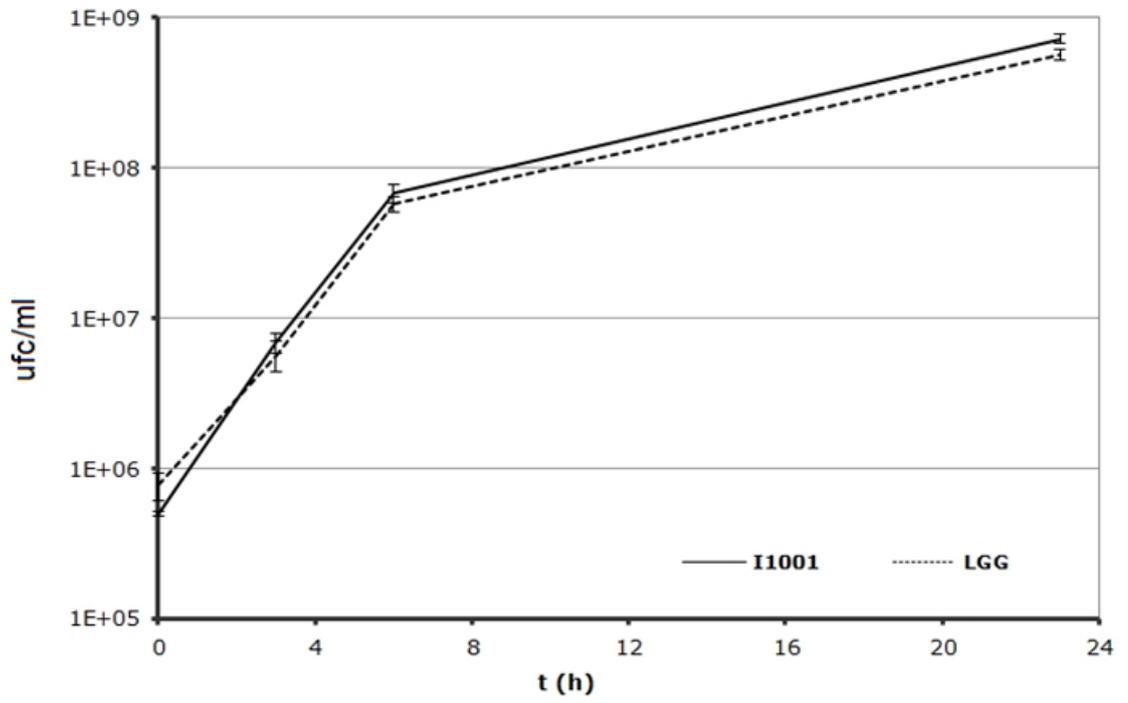


FIG. 4

