

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 222**

51 Int. Cl.:

A61K 8/64	(2006.01)
A61K 35/747	(2015.01)
C12R 1/225	(2006.01)
A61P 15/02	(2006.01)
A61K 31/4168	(2006.01)
C07K 14/335	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 38/12	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2019 PCT/US2019/048732**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.03.2020 WO20047203**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2019 E 19855845 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2024 EP 3843701**

54 Título: **Bacteriocinas para mejorar la colonización vaginal de Lactobacillus productor de peróxido de hidrógeno para la salud de reproducción femenina**

30 Prioridad:

30.08.2018 US 201862724797 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.09.2024

73 Titular/es:

**OSEL, INC. (100.0%)
320 Logue Avenue
Mountain View, California 94043, US**

72 Inventor/es:

**PARKS, THOMAS P. y
NILSEN, TRINE**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 980 222 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

Bacteriocinas para mejorar la colonización vaginal de *Lactobacillus* productor de peróxido de hidrógeno para la salud de reproducción femenina

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención da a conocer procedimientos para aumentar los niveles de bacterias vaginales sanas mediante el tratamiento de la mucosa vaginal con bacteriocinas derivadas de *Lactobacillus gasseni*, *Lactobacillus paragasseri* y otras especies bacterianas. Las bacteriocinas son sorprendentemente ventajosas por ser selectivamente activas contra *Lactobacillus iners*, pero relativamente inactivas contra especies de *Lactobacillus* productores de peróxido de hidrógeno (H₂O₂). *Lactobacillus iners* a menudo se asocia con disbiosis del microbioma vaginal y puede contribuir a la recurrencia de infecciones vaginales, tales como la vaginosis bacteriana (VB).

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] En general, la microbiota vaginal sana muestra una baja diversidad de especies y contiene comunidades bacterianas dominadas por sólo unos pocos *Lactobacillus* spp., que son bacilos grampositivos que desempeñan un papel importante en la resistencia a la infección mediante la producción de ácido láctico y la acidificación de la vagina, mediante la producción de otros productos antimicrobianos, tales como H₂O₂ y péptidos antimicrobianos, o compitiendo por los sitios de unión con patógenos vaginales (véase, Osset et al., 2001. Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. J. Infect. Dis. 183: 485-91). Las especies de *Lactobacillus* más comúnmente aisladas del tracto reproductivo de mujeres sanas en todo el mundo incluyen *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri*. Véase, por ejemplo, Srinivasan et al., 2012. Bacterial Communities in Women with Bacterial Vaginosis: High Resolution Phylogenetic Analyses Reveal Relationships of Microbiota to Clinical Criteria PLoS One 7(6), número de artículo: e37818; Antonio et al., (1999) J. Infect. Dis. 180: 1950-1956; Vasquez et al., (2002) J. Clin. Microbiol. 40: 2746-2749; Vallor, A.C., et al. J Infect Dis. 1 diciembre 2001, 184(111): 1431-6; Ravel, J., et al. Proc Natl Acad Sci, Estados Unidos. 15 de marzo de 2011, 108 Suplemento 1:4680-7. Estas especies son filogenética y funcionalmente diferentes de las especies de *Lactobacillus* alimentarias y/o ambientales. Metabolizan la glucosa en ácido láctico, contribuyendo al mantenimiento de un pH vaginal bajo ($\leq 4,5$) que representa una parte importante de la defensa no específica de la vagina del huésped. De hecho, se ha demostrado que las mujeres que tienen una microbiota vaginal con baja diversidad de especies, dominada por *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* (es decir, microbiota dominada por *Lactobacillus*), experimentan una menor frecuencia de gonorrea, infecciones por clamidia, tricomoniasis, VB y adquisición de VIH. Las cepas de *L. crispatus* y *L. jensenii* producen habitualmente H₂O₂, un agente bactericida, mientras que aproximadamente la mitad de las cepas de *L. gasseri* producen H₂O₂ y las cepas de *L. iners* generalmente no son capaces de producir H₂O₂ (Antonio, M.A. et al., (1999) J. Infect. Dis. 180: 1950-1956; France, M.T. et al., (2016) Appl Environ Microbiol. 82: 7063-7073). Los *Lactobacillus* productores de H₂O₂ se consideran *Lactobacillus* vaginales protectores, generalmente asociados con la salud vaginal. Por el contrario, *L. iners*, un *Lactobacillus* que no produce H₂O₂, no se considera un *Lactobacillus* protector porque coexiste con organismos de VB y a menudo está presente durante la VB.

[0003] En la mayoría de las mujeres sanas en edad fértil, la microbiota vaginal está dominada por 10⁷-10⁹ unidades formadoras de colonias (UFC) de *Lactobacillus* por gramo de líquido. Algunas mujeres en edad fértil carecen o tienen niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal protector, lo que puede deberse al hecho de que el ecosistema vaginal se ve afectado dinámicamente por el ciclo menstrual, los medicamentos, el estado de salud general, las prácticas sexuales y de higiene y la anticoncepción. Cuando se pierde el entorno ácido normal de una vagina sana dominado por *Lactobacillus* spp. productores de H₂O₂ protectores, generalmente se reemplaza por una microbiota más diversa poblada por especies que no son *Lactobacillus*, tales como *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Eggerthella* y organismos del orden *Clostridiales*. Este aumento en el número y diversidad de tales bacterias anaeróbicas y la pérdida de *Lactobacillus* spp., productor de H₂O₂ protector son características de la disbiosis y la VB. La VB se asocia con un mayor riesgo de contraer múltiples infecciones de transmisión sexual (ITS), incluidas clamidia, gonorrea, herpes genital, tricomoniasis, infección por VIH y VPH y progresión a neoplasia intraepitelial cervical (NIC). La VB también está implicada en numerosas complicaciones ginecológicas y obstétricas, incluida la enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), endometritis e infecciones posoperatorias, tales como la endometritis poscesárea y la celulitis del manguito vaginal poshisterectomía. También se han descrito fuertes asociaciones entre la VB y el parto prematuro, el aborto espontáneo, las infecciones del líquido amniótico y los malos resultados de la fecundación in vitro. La presencia de lactobacilos disminuye las probabilidades de respuestas inflamatorias fetales a la colonización placentaria con patógenos.

[0004] Aunque *L. iners* puede acidificar la vagina como otros *Lactobacillus* spp. productores de H₂O₂, *L. iners* produce menos ácido láctico, nada de ácido D-láctico y nada de H₂O₂, ofreciendo así comparativamente menos protección global contra la colonización vaginal por especies patógenas. Además, *L. iners* es el único *Lactobacillus* spp vaginal a recuperar en grandes cantidades en microbiotas diversas y durante la VB. Véase, por ejemplo, Vaneechoutte, M. et al. (2017) Research in Microbiología, 168(9-10): 826-36. Por lo tanto, el papel de *L. iners* es ambiguo, ya que existe en la microbiota vaginal de mujeres asintomáticas y al mismo tiempo es la única especie vaginal de *Lactobacillus* que

puede coexistir con bacterias asociadas a la VB. Véase, por ejemplo, Petrova, MI et al (2017) Trends Microbiol. 25(3): 182-91; Beamer, M.A. et al. (2017) Anaerobe, 45: 40-3. *L. iners* es la única especie de *Lactobacillus* que se sabe que produce una citotoxina (inerolisina), que es similar a la vaginolisina producida por *G. vaginalis* (Rampersaud R. et al. (2011) J Bacteriol 193:1034-41). La expresión de la citotoxina de *L. iners* está altamente regulada por incremento durante la VB (Macklaim JM et al. (2013) Microbiome 1:12). *L. iners* tiene un genoma inusualmente pequeño con capacidades metabólicas reducidas y tiene una mayor dependencia de nutrientes exógenos que otros lactobacilos vaginales (Macklaim J.M. et al. (2011) Proc Natl Acad Sci USA 108 Suppl 1:4688-95; France, M.T. et al., (2016) Appl Environ Microbiol. 82:7063-7073). La mucosa vaginal que está poblada con cantidades importantes de *L. iners* pueden predisponer a las mujeres a desarrollar una microbiota más diversa que contenga bacterias asociadas a la VB porque la comunidad bacteriana dominada por *L. iners* es la menos estable y *L. iners* suele ser la principal especie de *Lactobacillus* presente durante la transición a la VB. Véase, por ejemplo, Gajer, P. et al. (2012) Sci. Transl. Med. 4(132): 132ra52; Macklaim, J.M. et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 supl. 1:4688-95; Santiago, G.L. et al. (2012) PLoS' One, 7(9):e45281. Por ejemplo, las mujeres colonizadas con *L. crispatus*, una especie vaginal protectora, tienen un riesgo cinco veces menor de desarrollar VB, mientras que las mujeres con *L. iners* tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar VB. Véase, Verstraelen, H. et al. (2009) BMC Microbiol., 9:116, doi: 10.1186/1471-2180-9-116. Dado que *L. iners* es resistente al metronidazol, normalmente el único *Lactobacillus* presente durante la VB, y compite por el mismo nicho ecológico que los otros lactobacilos vaginales, suele ser la primera especie de *Lactobacillus* que emerge y recoloniza la vagina después del tratamiento de la VB con metronidazol. Véase, por ejemplo, Jakobsson, T. et al. (2007) J. Clin. Microbiol. 45(9): 3145; Srinivasan, S. et al. (2012) PLoS One, 7(6): e37818; Ferris, M.J. et al. (2007) J. Clin. Microbiol. 45(3): 1016-8. Dover et al. (Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology (2007) Artículo ID 78248) describe un estudio de seguridad de un péptido antimicrobiano lactocina 160, producido por *Lactobacillus rhamnosus* vaginal. Maldonado-Barragan et al (BMC Microbiology (2016) 16:37) describe la purificación y caracterización genética de la gassericina E, una nueva bacteriocina inducible por cocultivo de *Lactobacillus gasseri* EV1461 aislada de la vagina de una mujer sana.

[0005] Por lo tanto, las mujeres con niveles bajos de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ pueden tener una mayor susceptibilidad a VB y complicaciones ginecológicas y obstétricas asociadas, tales como EIP (enfermedad inflamatoria pélvica), transmisión de patógenos, mayores tasas de aborto espontáneo, parto prematuro y menores tasas de éxito cuando se someten a un tratamiento de fertilización *in vitro*, en comparación con mujeres con niveles poblacionales relativamente altos de *Lactobacillus* spp. que producen H₂O₂. Los procedimientos para aumentar los niveles poblacionales de *Lactobacillus* spp. que producen H₂O₂ en la mucosa vaginal se han descrito ya a principios de los años 1990. Más recientemente, se ha desarrollado un procedimiento para combinar productos que contienen *Lactobacillus* spp. que producen H₂O₂ con el uso de antibióticos. Sin embargo, sin eliminar las grandes poblaciones de *L. iners* de la mucosa vaginal para crear un nicho para *Lactobacillus* spp. para crecer y recolonizar el microbioma, los no-*Lactobacillus* spp. asociados con la VB se recolonizarán y provocarán más casos de VB. Por lo tanto, se necesita un producto bactericida para el tratamiento de infecciones vaginales, que inhiba selectivamente *L. iners*, creando un nicho vaginal para *Lactobacillus* spp. protectores productores de H₂O₂ para crecer y desarrollarse. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0006] Cualquier referencia a la invención que proporciona un procedimiento de tratamiento debe interpretarse como una referencia a composiciones para uso en dicho procedimiento.

[0007] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de bacteriocinas de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y al menos un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, en la que: dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, tiene actividad bactericida selectiva contra *L. iners*; dicho al menos un péptido aislado se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y un péptido aislado que tiene del 90 % al 99 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4; y la composición de bacteriocinas es una formulación adecuada para aplicaciones intravaginales. Dicho al menos un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, está presente en una cantidad suficiente para exhibir propiedades bactericidas de la composición de bacteriocinas. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la invención incluye además al menos un antibiótico activo contra organismos asociados a VB.

[0008] En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar a una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4. El procedimiento implica administrar por vía intravaginal a la paciente una composición de bacteriocinas de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y al menos un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, en el que: al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, tiene actividad bactericida selectiva contra *L. iners*; y dicho al menos un péptido aislado se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y un péptido aislado que tiene del 90 % al 99 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. Dicho al menos un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, se administra en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de *L. iners* y para promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginales endógenos productores de H₂O₂.

[0009] En algunas realizaciones, el procedimiento para tratar a una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus*

vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 implica además administrar opcionalmente a la paciente al menos un antibiótico activo contra organismos asociados a VB, en el que el antibiótico se administra en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de organismos asociados a la VB. En algunas realizaciones, el procedimiento implica administrar el antibiótico en una cantidad que está entre aproximadamente 30 mg y aproximadamente 2000 mg por dosis diaria y se administra a la paciente una o dos veces al día durante hasta 7 días. En algunas realizaciones, el procedimiento implica administrar el antibiótico de manera simultánea con la cantidad de péptido o combinación de péptidos.

[0010] En algunas realizaciones, el procedimiento para tratar a una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 implica además administrar opcionalmente una composición bacteriana viva que comprende *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂, en el que la composición bacteriana viva se administra en una cantidad suficiente para promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ administrado. En algunas realizaciones, el *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ se selecciona del grupo que consiste en *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ es *L. crispatus* CTV-0.5.

[0011] Las siguientes realizaciones se pueden combinar con cualquiera de los aspectos anteriores de la presente invención. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el péptido aislado de la composición de bacteriocinas es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas incluye una combinación de los péptidos aislados de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas incluye una combinación de los péptidos aislados de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas incluye una combinación de los péptidos aislados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.

[0012] En algunas realizaciones, la formulación de dicho al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, es un gel, crema, pomada, espuma, película, cápsula, comprimido, polvo, pesario, inserto o supositorio adecuado para aplicaciones intravaginales tópicas. En algunas realizaciones, la cantidad de péptido, o combinación de péptidos, incluida en la composición de bacteriocinas está entre el 0,001 % (p/p) y el 3 % (p/p). En algunas realizaciones, el antibiótico se selecciona del grupo que consiste en clindamicina, metronidazol, secnidazol, tinidazol y astodrímico sódico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0013]

La Figura 1 muestra la sensibilidad de las cepas de las principales especies vaginales de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* y *L. iners*) a la inhibición por el sobrenadante del cultivo libre de células K7 de *L. paragasseri*.

La Figura 2 ilustra el crecimiento de *L. iners* HM-702 y *L. paragasseri* K7, cultivados de manera individual y cocultivados juntos en medio MRS:NYC III. El crecimiento de *L. iners* HM-702 y *L. paragasseri* K7 para cada experimento de cultivo se midió en (UFC/ml), a las cero horas y después de 24 horas. La concentración inicial de *L. iners* HM-702 fue >2 log mayor que la de *L. paragasseri* K7. El límite de detección para *L. iners* cocultivado fue de 10⁶ UFC/ml.

La Figura 3 ilustra la destrucción de *L. iners* HM-702 en presencia de 40 UB/ml de bacteriocinas Gask7 semipurificadas durante 24 horas, medidas en UFC/ml de *L. iners* HM-702.

La Figura 4 ilustra la inhibición de *L. iners* HM-702 en presencia de 100 UB/ml de bacteriocinas Gask7 semipurificadas y 1000 UB/ml de bacteriocinas Gask7 a las cero horas, después de 24 horas y a las 48 horas, medida en UFC/ml de *L. iners* HM-702.

La Figura 5A presenta un cromatograma de fase inversa de las fracciones del péptido K7B α.

La Figura 5B presenta la SDS-PAGE de las fracciones del péptido K7B α del desarrollo de la cromatografía de fase inversa.

La Figura 6 presenta la SDS-PAGE de las bacteriocinas purificadas de *L. paragasseri* K7 (Gask7A α, Gask7B α y Gask7B β) y de *E. coli* Shuffle (Gask7A β). Gel izquierdo: bacteriocinas visualizadas con colorante proteico SafeEx migrando entre 3 y 6 kDa. Gel derecho: Zonas de inhibición del crecimiento de *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 en agar blando MRS superpuesto para detectar las bacteriocinas purificadas directamente en el gel (incubado durante 20 horas a 30 °C).

La Figura 7 presenta el espectro EM MALDI-TOF del péptido de bacteriocina K7B α con m/z de 5512,0.

La Figura 8 presenta el espectro EM MALDI-TOF del péptido de bacteriocina K7B β con m/z de 4762,3.

La Figura 9 presenta el espectro EM MALDI-TOF del péptido de bacteriocina K7A α con m/z de 6091,5.

La Figura 10 ilustra la inhibición de *L. iners* HM-702, *G. vaginalis* HM-133, *L. iners* + *G. vaginalis* ("Li + Gv", cocultivo, cultivado en medio NYC III) y *L. crispatus* SJ-3C (cultivado en MRS) en presencia de 100 UB/ml de bacteriocina GaskK7 semipurificada, 20 µg/ml de metronidazol o la combinación de 100 UB/ml de bacteriocina K7 + 20 µg/ml de metronidazol después de 48 horas, medida mediante densidad óptica (DO) a 600 nm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

[0014] La presente invención proporciona una composición de bacteriocinas adecuada para administración intravaginal donde la composición inhibe selectivamente *L. iners*. Específicamente, tal como se describe en el presente documento, la presente invención proporciona procedimientos y composiciones para tratar mujeres que tienen niveles bajos de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ y microbiota diversa asociada con VB para reducir selectivamente la población de *L. iners* como medio para crear un nicho ecológico para la colonización de la mucosa vaginal por una población de *Lactobacillus* que produce H₂O₂.

[0015] En otras palabras, la presente invención descrita en el presente documento implica una terapia de reemplazo para mujeres diagnosticadas con microbiota diversa asociada con VB y bajos niveles de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂, en la que *L. iners*, que ofrece poca resistencia al crecimiento de bacterias asociadas con VB, se reduce selectivamente y se reemplaza por *Lactobacillus* protector productor de H₂O₂, que ofrece resistencia al crecimiento de bacterias asociadas a la VB. Tal como se describe con más detalle a continuación, la presente invención enseña procedimientos, composiciones y reactivos para la preparación y uso de formulaciones de bacteriocinas.

II. DEFINICIONES

[0016] Tal como se usa en el presente documento, el término "composición de bacteriocinas" se refiere a una composición que funciona para inhibir la supervivencia y/o el crecimiento de microorganismos específicos. En particular, la composición de bacteriocinas contendrá al menos un péptido aislado de una bacteriocina, que tiene actividad antibacteriana contra *L. iners*. Además, la composición de bacteriocinas contendrá al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición de bacteriocinas de la presente invención se puede usar para la prevención o el tratamiento de diversos síntomas asociados con la VB. Para los fines de la presente invención, las composiciones de bacteriocinas descritas en el presente documento no son adecuadas para la administración oral.

[0017] Tal como se usa en el presente documento, el término "bacteriocina" se refiere a péptidos, péptidos complejados o proteínas producidas por cepas particulares de bacterias que son biológicamente activas con acción bactericida (es decir, antibacteriana) contra otras especies bacterianas. Por ejemplo, las bacteriocinas GaskK7A y GaskK7B, producidas por la cepa bacteriana *Lactobacillus paragasseri* K7, son biológicamente activas con actividad bactericida selectiva contra *L. iners* vaginal. Tanto K7A como K7B son bacteriocinas de dos componentes, lo que significa que cada bacteriocina tiene dos péptidos que le confieren una actividad máxima. La bacteriocina GaskK7A está compuesta por el péptido GaskK7A α (SEQ ID NO: 3) y el péptido GaskK7A β (SEQ ID NO: 4); y la bacteriocina GaskK7B está compuesta por el péptido GaskK7B α (SEQ ID NO: 1) y el péptido GaskK7B β (SEQ ID NO: 2). Las especies bacterianas y/o cepas bacterianas de las mismas que son capaces de producir bacteriocinas se denominan "bacteriocinógenas". Los ejemplos no limitantes de especies bacteriocinógenas incluyen cepas particulares de *Lactobacillus paragasseri*, *Lactobacillus gasseri* y otras especies, cuyos detalles se describen en el presente documento. Por tanto, en el contexto de la presente divulgación, el término "cepas bacteriocinógenas" se utiliza para referirse a cepas particulares de especies bacterianas que son capaces de producir bacteriocinas. El término "*L. (para)gasseri*" se utiliza en el presente documento para referirse colectivamente a las especies *L. paragasseri* y *L. gasseri*.

[0018] Tal como se usa en el presente documento, los términos "bacteriocina aislada" o "péptido aislado" se refieren a un péptido que ha sido identificado y separado, recuperado y/o purificado de un componente de su entorno natural. En otras palabras, una bacteriocina aislada o un péptido aislado, en el contexto de la presente invención, está sustancialmente libre de los materiales o contaminantes con los que el péptido o la bacteriocina está normalmente asociado en la naturaleza, en cultivo o de otro modo (por ejemplo, sintético). Se entiende que las composiciones de bacteriocinas descritas en el presente documento contendrán al menos un péptido aislado de una bacteriocina. Por tanto, cuando se hace referencia a al menos un péptido, o una combinación de péptidos, en el contexto de las composiciones y procedimientos de la presente invención, se entiende que dicho péptido, o combinación de dichos péptidos, es un péptido aislado (por ejemplo, un péptido aislado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos). Para los fines de la presente invención, los péptidos de las composiciones de bacteriocina descritos en el presente documento son péptidos aislados (por ejemplo, purificados).

[0019] Tal como se usa en el presente documento, el término "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sustancia, o mezcla de sustancias, utilizadas en la formulación de las composiciones de bacteriocinas, que proporciona características físicas deseables a las formulaciones de composiciones de bacteriocinas. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para el contacto con los

tejidos mucosos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otras complicaciones problemáticas proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. En algunas realizaciones, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o incluido en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea internacional generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Se pueden utilizar diversos excipientes farmacéuticamente aceptables y se describen en detalle a continuación.

[0020] Tal como se usa en el presente documento, la frase "actividad bactericida selectiva contra *L. iners*" se refiere a la actividad bactericida exhibida por las bacteriocinas (o péptidos) que se han incorporado a la composición de bacteriocinas de la presente invención, en la que al menos un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tienen una concentración inhibidora mínima (CMI) para *L. iners* que es al menos 2 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C), o al menos 3 veces menor que, al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o al menos 10 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C).

[0021] Tal como se usa en el presente documento, los términos "concentración inhibidora mínima" o "CMI, minimum inhibitory concentration" se refieren a la concentración más baja de la bacteriocina (es decir, el péptido o combinación de péptidos que tienen actividad bactericida) que inhibe el crecimiento bacteriano. En otras palabras, la CMI es la cantidad de péptido o combinación de péptidos que es suficiente para exhibir actividad antibacteriana. La CMI de al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, se determina usando procedimientos que se describen en detalle a continuación.

[0022] Tal como se usa en el presente documento, la frase "una cantidad suficiente para exhibir propiedades bactericidas" se refiere a la cantidad del péptido o combinación de péptidos presentes en la composición de bacteriocinas de la presente invención que proporciona a la composición la capacidad de inhibir selectivamente y/o destruir *L. iners*. La cantidad de péptido o combinación de péptidos de la composición de bacteriocinas se expresa como porcentaje en peso.

[0023] Tal como se usa en el presente documento, los términos "porcentaje en peso" o "% en peso" se usan indistintamente y, a menos que se defina lo contrario, se refieren al porcentaje de un componente (por ejemplo, péptido o combinación de péptidos) medido en peso por peso total de una composición de bacteriocinas en su conjunto. El porcentaje en peso está representado por "%" o "% p/p". A continuación, se describen en detalle composiciones de bacteriocinas que contienen un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, seleccionados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, que tienen valores de porcentaje en peso suficientes para exhibir las propiedades bactericidas.

[0024] Tal como se usa en el presente documento, los términos "idéntico", "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje de homología", en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son iguales (por ejemplo, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior) en identidad sobre una región específica, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada, por ejemplo, la longitud completa de la secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede realizar mediante diversos procedimientos, incluidos aquellos que utilizan software informático disponible públicamente, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Add. APL. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el procedimiento de búsqueda por similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (Estados Unidos) 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (CLUSTAL, GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA), o mediante inspección. Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia para dos secuencias son los algoritmos BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) y Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Clustal se puede utilizar para alinear más de dos secuencias. Para los fines de la presente invención, BLAST 2.0 se utiliza con los parámetros predeterminados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre una secuencia de referencia y una secuencia de comparación.

[0025] Los términos "correspondiente a", "determinado con referencia a" o "numerado con referencia a" cuando se usan en el contexto de la identificación de un residuo de aminoácido determinado en una secuencia polipeptídica, se refieren a la posición del residuo de una secuencia de referencia especificada cuando la secuencia de aminoácidos determinada está alineada al máximo y se compara con la secuencia de referencia. De este modo, por ejemplo, un residuo de aminoácido en un péptido "corresponde a" un aminoácido en el péptido de SEQ ID NO: 1 cuando el residuo se alinea con el aminoácido en SEQ ID NO: 1 cuando está alineado de manera óptima con SEQ ID NO: 1. El polipéptido que está alineado con la secuencia de referencia no necesita tener la misma longitud que la secuencia de referencia.

[0026] Tal como se usa en el presente documento, la frase "formulación adecuada para aplicaciones intravaginales"

se refiere a la vía de administración donde una sustancia (es decir, la composición de bacteriocinas) se aplica dentro de la vagina. Dichas formulaciones son para la administración local en la vagina, preferiblemente administración tópica, tal como cualquier superficie externa o interna de los genitales femeninos, incluyendo superficies mucosas en la cavidad vaginal y superficies no mucosas de la vulva y áreas de piel inmediatamente circundantes. Las formulaciones son habitualmente estériles o casi estériles. En general, las formulaciones vaginales no estériles tienen límites microbianos de ≤ 200 UFC/g para el recuento microbiano aeróbico total y ≤ 20 UFC/g para el recuento total combinado de levaduras y mohos, y ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Las formulaciones adecuadas para aplicaciones intravaginales incluyen, por ejemplo, un supositorio vaginal, una cápsula, un comprimido, un inserto, una crema, una pomada, un gel, un bálsamo, una espuma, un polvo, una compresa impregnada, un pesario, un aerosol, una loción, una suspensión, una preparación de ducha vaginal o un material insertable vaginalmente impregnado o recubierto, tal como un tampón.

[0027] Tal como se usa en el presente documento, el término "antibiótico" se refiere a cualquier agente terapéutico (por ejemplo, un agente producido por microorganismos y/o sintéticamente) que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de y/o destruir uno o más microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos, parásitos y similares). Tal como se usan en el presente documento, los antibióticos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Entre las clases de antibióticos se incluyen, pero sin limitarse a las mismas, aminoglucósidos, anfenicoles (por ejemplo, cloranfenicol, tiamfenicol, azidamfenicol y similares), ansamicinas (por ejemplo, rifampicina y similares), carbacefems, carbapenems, cefalosporinas, glicopéptidos (por ejemplo, teicoplanina, vancomicina y similares), lincosainidas (por ejemplo, clindamicina, lincomicina y similares), macrólidos (por ejemplo, azitromicina, claritromicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, troleandomicina, telitromicina, espectinomina, quinupristina/dalfopristina y similares), monobactams, nitrofuranos (por ejemplo, furazolidona, nitrofurantoína, nifurtinol y similares), nitroimidazoles (por ejemplo, metronidazol, secnidazol, tinidazol, nimorazol, omidazol, azanidazol y similares), oxazolidinonas (por ejemplo, linezolid, tedizolid y similares), penicilinas, polipéptidos (por ejemplo, bacitracina, colistina, polimixina B y similares), quinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, norfloxacina, ofloxacina, trovafloxacina y similares), sulfonamidas (por ejemplo, mafenida, prontosil, sulfacetamida, sulfametizol, sulfanilamida, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima, trimetoprima-sulfametoxazol y similares), tetraciclinas y otros (por ejemplo, arsfenamida, etambutol, fosfomicina, ácido fusídico, isoniazida, mupirocina, platensimicina, pirazinamida y similares). Ver, por ejemplo, Robert Berkow (ed.) The Merck Manual of Medical Information-Home Edition. Pocket (septiembre de 1999), ISBN 0-671-02727-1.

[0028] Clindamicina, metronidazol, secnidazol, tinidazol y VivaGel® (SPL-7013, o astodrímico sódico) son ejemplos de antibióticos que son particularmente activos contra *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* y organismos dentro del orden *Clostridiales*. La clindamicina, el metronidazol, el secnidazol y el tinidazol son particularmente activos contra anaerobios, tales como los que se encuentran en la VB. El astodrímico sódico (nombre comercial: VivaGel®) es un producto vaginal a base de agua de 1 % (p/p) de SPL-7013 mezclado en gel Carbopol® tamponado a un pH fisiológicamente compatible con la vagina humana normal. SPL-7013, el principio activo del gel de astodrímico, se construye a partir de un núcleo divalente, la benzhidrílamina amida de L-lisina, a partir del cual se añaden cuatro capas sucesivas de unidades de ramificación de L-lisina, creando el dendrímico SPL-7013 con 32 grupos amina en la superficie. Un grupo 1-(carboximetoxi)naftaleno-3,6-disulfonato de sodio está unido a cada uno de los 32 grupos superficiales de amina mediante enlaces amida. El producto químico es N2,N6-bis(N2,N6-bis(N2,N6-bis(N2,N6-bis(N2,N6-bis((3,6-disulfonaftalen-1-iloxi)acetil)-1-lisil)-1-lisil)-1-lisil)-1-lisil)-N1-(difenilmetil)-1-lisinamida con un peso molecular de 16.581 daltons. (Ver, Rupp et al., 2007. VivaGel™ (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer – microbicide for the prevention of HIV and SHV infection. International Journal of Nanomedicine 2(4):561-566).

[0029] Tal como se usa en el presente documento, la frase "microbiota diversa asociada con VB" se refiere a una afección en la que la mucosa vaginal carece de una cantidad suficiente de *Lactobacillus* spp. protector y está colonizada por una cantidad significativa de especies de *Lactobacillus* menos protectoras, *L. iners* y diversas especies que no son *Lactobacillus*, también denominadas "organismos asociados a la VB". Entre los ejemplos de especies que no son *Lactobacillus* asociadas a VB (es decir, organismos asociados a VB) se incluyen, pero sin limitarse a las mismas, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Eggerthella*, *Megasphaera* sp. tipo 1, *Dialister micaerophilus*, *Dialister* sp. 2, *Parvimonas micra*, *Prevotella buccalis*, *Prevotella timonensis*, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Mycoplasma hominis* y organismos del orden *Clostridiales* (por ejemplo, bacteria 1 asociada a VB (VBAB-1, VBAB-2 y VBAB-3). (Véase, Srinivasan et al., 2012. Bacterial Communities in Women with Bacterial Vaginosis: High Resolution Phylogenetic Analyses Reveal Relationships of Microbiota to Clinical Criteria PLoS One 7(6), número de artículo: e37818). La afección puede ser sintomática o asintomática. El término "microbiota vaginal" se refiere a los microorganismos de un ecosistema (es decir, los microorganismos que colonizan la vagina). El término "microbioma vaginal" se refiere a los genomas colectivos de los microorganismos en el nicho ecológico de la vagina o a los propios microorganismos.

[0030] Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento" o "tratar" una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 (es decir, una puntuación de Nugent mayor o igual a 4) se refiere al aumento de los niveles de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂, la disminución de la puntuación de Nugent a 0-3, la reducción de la gravedad de los síntomas y/o la reducción de la frecuencia de los síntomas asociados con la microbiota diversa asociada con la VB.

[0031] Tal como se usa en el presente documento, la frase "*Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂" se refiere a "*Lactobacillus* spp. protector", una especie de bacterias que son bacterias anaeróbicas facultativas Gram positivas que producen lactato (ácido láctico) a partir de fuentes de carbohidratos, tales como la glucosa, caracterizadas específicamente por la capacidad de producir H₂O₂. Estos *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ se consideran organismos comensales que colonizan la mucosa vaginal. *L. crispatus*, *L. gassen* y *L. jensenii* son especies vaginales capaces de producir H₂O₂, tal como se describe en Antonio et al. The Journal of Infectious Diseases 1999, 180:1950-6. "*Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno" se refiere a colonias de *Lactobacillus* spp. protectores que se han originado en la mucosa vaginal de una paciente. "*Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ administrado" se refiere al *Lactobacillus* spp. protector que se ha originado a partir de una composición bacteriana viva administrada a la mucosa vaginal de una paciente.

[0032] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "puntuación de Nugent" se refiere a un procedimiento de laboratorio estándar para diagnosticar VB en entornos de investigación, tal como lo describen Nugent *et al.* La puntuación de Nugent varía de 0 a 10 y se calcula mediante una evaluación microscópica manual de muestras vaginales teñidas con Gram y evaluando la concentración relativa de *Lactobacillus* spp., bacilos y cocos Gram negativos y Gram variables, y bacilos Gram negativos curvos, que se describe en detalle a continuación. (Ver, Nugent, R.P., Krohn, M. A, Hillier, S.L., 1991. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J. Clin. Microbiol. 29(2): 297-301).

[0033] Tal como se usa en el presente documento, el término "composición bacteriana viva" se refiere a una composición que contiene al menos una cepa de *Lactobacillus* vaginal vivo productor de H₂O₂ tal como, por ejemplo, *L. crispatus*, *L. gasserii* o *L. jensenii*. Como ejemplo no limitante, las cepas útiles de *L. crispatus* incluyen *Lactobacillus crispatus* CTV-05 y *Lactobacillus crispatus* SJ-3C. Para los fines de la presente invención, CTV-05 y SJ-3C se consideran cepas equivalentes de *L. crispatus*.

[0034] Tal como se usan en el presente documento, los términos "aproximadamente" y "aproximadamente igual" se usan en el presente documento para modificar un valor numérico e indicar un intervalo definido alrededor de ese valor. Si "X" es el valor, "aproximadamente X" o "aproximadamente igual a X" generalmente indica un valor de 0,90X a 1,10X. Cualquier referencia a "aproximadamente X" indica al menos los valores X, 0,90X, 0,91X, 0,92X, 0,93X, 0,94X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X, 1,05X, 1,06X, 1,07X, 1,08X, 1,09X y 1,10X. Por tanto, "aproximadamente X" pretende describir, por ejemplo, "0,98X". Cuando se aplica "aproximadamente" al comienzo de un intervalo numérico, se aplica a ambos extremos del intervalo. Por tanto, "de aproximadamente 6 a 8,5" equivale a "de aproximadamente 6 a aproximadamente 8,5". Cuando se aplica "aproximadamente" al primer valor de un conjunto de valores, se aplica a todos los valores de ese conjunto. Por tanto, "aproximadamente 7, 9 u 11 %" equivale a "aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 % o aproximadamente 11 %".

[0035] Tal como se usa en el presente documento, los términos "que comprende" o "comprende" pretenden significar que las composiciones y procedimientos incluyen los elementos citados, pero no excluyen otros. "Consiste esencialmente en" se refiere a aquellos elementos necesarios para una realización determinada. La frase permite la presencia de elementos adicionales que no afectan materialmente la característica o características básicas y novedosas o funcionales de la realización determinada (por ejemplo, composiciones y procedimientos). "Que consiste en" se refiere a composiciones, procedimientos y componentes respectivos de los mismos, tal como se describe en el presente documento, que excluyen cualquier elemento no mencionado en esa descripción de la realización. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta divulgación.

III . COMPOSICIONES DE BACTERIOCINAS

Bacteriocinas

[0036] Un péptido, o una combinación de péptidos, adecuado para su uso en una composición de bacteriocinas de la presente invención puede ser cualquier péptido, o combinación de péptidos, que tenga actividad bactericida contra *L. iners*. En algunas realizaciones, los péptidos son bacteriocinas que se clasifican como no lantibióticas o bacteriocinas de Clase IIb y son producidas por cepas de bacterias Gram positivas, que incluyen, por ejemplo, *Lactobacillus paragasseri*, *Lactobacillus gasserii* y otras especies. Las no lantibióticas son una clase de bacteriocinas con residuos no modificados excepto por la formación de puentes disulfuro y bacteriocinas circulares. En algunas realizaciones, las bacteriocinas no lantibióticas útiles para la presente invención son bacteriocinas de dos péptidos, que pertenecen al subgrupo de bacteriocinas, Clase IIb. Las bacteriocinas de clase IIb consisten en dos péptidos cuya actividad total depende de la acción complementaria de los dos péptidos diferentes (véase, Nissen-Meyer J, Oppegard, C, Rogne, P, Haugen, HS y Kristiansen, PE. 2010. Structure and mode of action of the two-peptide (Class IIb). Probiotics Antimicrob Proteins 2:52-60.).

[0037] Por ejemplo, las bacteriocinas de Clase IIb (dos péptidos) útiles para la presente invención son aquellas que son producidas por la cepa K7 de *Lactobacillus paragasseri*. *L. paragasseri* K7 produce bacteriocina gassericina K7A (Gask7A) y bacteriocina gassericina K7B (Gask7B), cada una de las cuales consiste en dos péptidos, α y β . Las secuencias de ADN que codifican los péptidos α y β de la bacteriocina Gask7A se definen con el número de acceso de GenBank ASRG02000001, con el ID de proteína KDA99706 correspondiente al péptido α Gask7A y el ID de

- 5 proteína KDB00192 correspondiente al péptido β GasK7A. Las secuencias de ADN que codifican los péptidos α y β de la bacteriocina GasK7B se definen con el número de acceso de GenBank ASRG02000002, con el ID de proteína KDA99085 correspondiente al péptido α de GasK7B y el ID de proteína KDA99086 correspondiente al péptido β de GasK7B. Otro ejemplo de una cepa bacteriana productora de bacteriocina de Clase IIb es *L. gasseri* LF221, que produce las bacteriocinas acidocina LF221A y acidocina LF221B. Previamente se determinó que las secuencias de ADN de GasK7A y GasK7B eran similares a las secuencias de ADN de acidocina 1, F221A y LF221B, respectivamente.
- 10 Es decir, las secuencias de los péptidos α y β de la bacteriocina GasK7A son idénticas a las secuencias de los péptidos α y β de LF221A (número de acceso de GenBank AY295874; ID de proteína AAP55752 para la secuencia de péptido α LF221A parcial y AAP55753 para la secuencia de péptido β LF221A completa). Las secuencias de los péptidos α y β de la bacteriocina GasK7B son casi idénticas a las secuencias de los péptidos α y β LF221B (GenBank AY297947), excepto por una diferencia de aminoácidos en los homólogos de los péptidos α y β (IDs de proteína AAP56344 y AAP56345 para LF221B α y LF221B β , respectivamente). (Véase, Peternel et al. 2010. Wide-Inhibitory Spectra Produced by *Lactobacillus gasseri* K7. Probiotics and Antimicro. Prot. 2(4):233-240).
- 15 [0038] Por tanto, los péptidos adecuados para su uso en una composición de bacteriocinas de la presente invención pueden ser cualquier péptido, o combinación de péptidos, que se hayan aislado de las bacteriocinas IIb de *L. paragasseri* K7 identificadas anteriormente, o bacteriocinas lib con secuencias de ADN y aminoácidos similares a *L. paragasseri* K7, que han sido producidas por otras cepas de *L. paragasseri*, cepas de *L. gasseri* (por ejemplo, *L. gasseri* LF221) o cepas de otras especies bacterianas. La Tabla 1 a continuación incluye una lista de ejemplo de cepas
- 20 bacterianas de *L. paragasseri*, *L. gasseri* y otras especies bacterianas que tienen secuencias de ADN y aminoácidos similares a las de *L. paragasseri* K7 que codifican secuencias peptídicas similares o idénticas (es decir, homólogos) de los péptidos α y β de bacteriocinas GasK7A y/o GasK7B.

Tabla 1. Cepas bacterianas de ejemplo que codifican homólogos a los péptidos de bacteriocina GasK7, con los números de acceso de ADN (línea superior de cada entrada, región codificante) y proteína (línea inferior de cada entrada) correspondientes de la base de datos GenBank

Cepa bacteriana	Péptido GasK7A α	Péptido GasK7A β	Péptido GasK7B α	Péptido GasK7B β
<i>L. paragasseri</i> K7	ASRG02000001.1, 4364-4388	ASRG02000001.1, 4386-4408	ASRG02000002.1, 112159-112366	ASRG02000002.1, 112396-112593
	KDA99706.1	KDB00192.1	KDA99085.1	KDA99086.1
<i>L. gasser</i> 4M13	CP021427.1, 101027-101026	CP021427.1, 100918-101027	CP021427.1, 327800-328027	CP021427.1, 327593-327790
	ART98326.1	ART98327.1	ART97716.1	ART97715.1
<i>L. gasser</i> JG141	PQWW01000014.1, 56965-57224	PQWW01000014.1, 56776-56965	PQWW01000006.1, 97846-98073	PQWW01000006.1, 97639-97836
	RBQ00943.1	RBQ00942.1	RBQ01516.1	RBQ01515.1
<i>L. gasser</i> 505	NZ_LZDT01000024.1, 39554-40193	NZ_LZDT01000024.1, 40193-40402	NZ_LZDT01000010.1, 751-978	NZ_LZDT01000010.1, 544-741
	WP 020807648.1	WP 020807649.1	WP 049159833.1	WP_003649213.1
<i>L. paragasseri</i> JCM5344	BEX10100008.1, 43556-43795	BEX10100008.1, 43795-44004	BEX10100001.1, 223186-223413	BEX10100001.1, 222979-223176
	GBA92003.1	GBA92006.1	GBA8916.1	GBA8813.1
<i>L. gasser</i> LF221	AY295674.1, 1-116	AY295674.1, 116-325	AY297947.1, 669-1096	AY297947.1, 1106-1303
	AAP55752.1	AAP55753.1	AAP56344.1	AAP56345.1
<i>L. gasser</i> UMB0099	PKKC01000003.1, 90087-90326	PKKC01000003.1, 89878-90087	PKKC01000001.1, 121544-121771	PKKC01000001.1, 121781-121978
	PKZ90469.1	PKZ90468.1	PKZ91008.1	PKZ91009.1
<i>L. paragasseri</i> JCM5343	AP018549.1, 1877502-1877741	AP018549.1, 1877741-1877950	AP018549.1, 602448-602675	AP018549.1, 602665-602862
	BBD49415.1	BBD49416.1	BBD48202.1	BBD48203.1
<i>L. paragasseri</i> JCM1130	BEXG01000005.1, 42645-42884	BEXG01000005.1, 42884-43093	BEXG01000001.1, 121438-121665	BEXG01000001.1, 121675-121872
	GBA83318.1	GBA83321.1	GBA79835.1	GBA79838.1
<i>L. gasser</i> 105-1	MK598475*	MK598475*	MK598476*	MK598476*

(continuación)

Cepa bacteriana	Péptido GasK7A α	Péptido GasK7A β	Péptido GasK7B α	Péptido GasK7B β
<i>L. gasseri</i> 151-2	MK598477*	MK598477*	MK598478*	MK598478*
<i>L. gasseri</i> LA327	LC389591.1, 162-401 BBE52938.1	LC389591.1, 401-610 BBE52939.1	LC389592.1, 5490-5717 BBE52947.1	LC389592.1, 5727-5924 BBE52948.1
<i>L. gasseri</i> 497_LGAS	NZ_JVEV01000010.1, 18351-18590 WP_049160225.1	NZ_JVEV01000010.1, 18142-18351 WP_049160222.1	NZ_JVEV01000006.1, 24402-24629 WP_049159833.1	NZ_JVEV01000006.1, 24639-24836 WP_003649213.1
<i>L. gasseri</i> LGs_Disk7	NZ_MJET01000024.1, 126524-128763 WP_049160225.1	NZ_MJET01000043.1, 98205-98432 WP_049159833.1	NZ_MJET01000043.1, 98205-98432 WP_049159833.1	NZ_MJET01000043.1, 97998-98195 WP_003649213.1
<i>L. gasseri</i> G7	KF724910.1, 31-240 AHE41136.1	KF724911.1, 1-105 AEFA1139.1	KF724911.1, 1-105 AEFA1139.1	KF724911.1, 115-312 AHE41136.1
<i>L. gasseri</i> SBT1035		AB029612.1, 1977-2204 BAA82353.1	AB029612.1, 1977-2204 BAA82353.1	AB029612.1, 2214-2411 BAA82354.1
<i>L. gasseri</i> LA158		AB710328.1, 5490-5717 SAMU9405.1	AB710328.1, 5490-5717 SAMU9405.1	AB710328.1, 5727-5924 BAM09406.1
<i>L. paragasseri</i> JV-V03		ACG002000001.1, 1018849-1019076 EFJ70596.1	ACG002000001.1, 1018849-1019076 EFJ70596.1	ACG002000001.1, 1018842-1018839 EFJ70595.1
<i>L. gasseri</i> EV1461		KR080485.1, 5475-5702 ALX37947.1	KR080485.1, 5475-5702 ALX37947.1	KR080485.1, 5712-5909 ALX37948.1
<i>L. gasseri</i> 987_LJOH		NZ_JUKW01000002.1, 64043-64270 WP_048684917.1	NZ_JUKW01000002.1, 64043-64270 WP_048684917.1	NZ_JUKW01000002.1, 63856-64033 WP_003649213.1

(continuación)

Cepa bacteriana	Péptido GasK7A α	Péptido GasK7A β	Péptido GasK7B α	Péptido GasK7B β
<i>L. gasseri</i> AL5			MUJA01000002.1, 137439-137666	MUJA01000002.1, 137676-137873
<i>L. acidophilus</i> NCTC13720			OOK86866.1	OOK86867.1
<i>L. gasseri</i> 7135	SRLR01000080.1, 15139-15378 TOW12671.1	SRLR01000080.1, 14830-15139 TOW12670.1		
<i>L. gasseri</i> UME0056	PNGR01000002.1, 42788-43027 PMC32163.1	PNGR01000002.1, 43027-43236 PMC32164.1		
<i>L. gasseri</i> AL3	MTZT01000002.1, 48178-48417 OOK96447.1	MTZT01000002.1, 48417-48626 OOK96448.1		
<i>L. crispatus</i> G4			KF724909.1, 33-242 AHE41134.1	
<i>L. gasseri</i> G3			KF724908.1, 18-227 AHE41132.1	
Rodent Strain.				
<i>L. taiwanensis</i> 111z	NGOM01000011.1, 206480-206719 OYS21308.1	NGOM01000011.1, 206271-206480 OYS21307.1		
<i>L. taiwanensis</i> 111w	NGON01000042.1, 206255-206494 OYS24304.1	NGON01000042.1, 206046-206255 OYS24303.1		
<i>L. taiwanensis</i> 111u	NGOO01000043.1, 250085-250324 OYS23267.1	NGOO01000043.1, 259876-260085 OYS23266.1		

(continuación)

Cepa de roedor				
<i>L. taiwanensis</i> 111e	NGOP01000022.1.260145-280384 OYS28411.1		NGCP01000022.1.259936-260145 OYS28410.1	
<i>L. taiwanensis</i> 111m	NGOQ01000033.1.260319-280558 OYS28529.1		NGOQ01000033.1.260110-280319 OYS28528.1	
<i>L. taiwanensis</i> 111k	NGGR01000022.1.35996-36235 OYS30469.1		NGGR01000022.1.36235-36444 OYS30470.1	
<i>L. taiwanensis</i> 103q	NGOW01000011.1. 206469-206728 OYS39005.1		NGOW01000011.1.206280-206469 OYS39004.1	
<i>L. taiwanensis</i> 103n	NGOX01000022.1.260031-260270 OYS42379.1		NGOX01000022.1.259822-260031 OYS42378.1	
<i>L. taiwanensis</i> 103j	NGOY01000043.1.42754-42893 OYS40407.1		NGOY01000043.1.42545-42754 OYS40406.1	
<i>L. taiwanensis</i> 103a	NGOZ01000011.1.260091-260330 OYS44979.1		NGOZ01000011.1.259882-260091 OYS44978.1	
<i>L. taiwanensis</i> 601c	NGOA01000043.1.23293-23490 OYR98712.1		NGOA01000043.1.23490-23699 OYR98713.1	
<i>L. taiwanensis</i> 601a	NGOC01000056.1.23296-23493 OYS02146.1		NGOC01000056.1.23493-23702 OYS02147.1	
<i>Bacillus</i> CH2-D42-30	RAZC01000031.1.43664-43843 RKJ23393.1		RAZC01000031.1.43643-44052 RKJ23394.1	
*Números de acceso que corresponden a secuencias de ADN de aislados clínicos de la colección de cepas de Osel, Inc.				

[0039] Ejemplos de bacteriocinas que tienen secuencias de ADN similares a *L. paragasseri* K7, que están codificadas por otras cepas bacterianas enumeradas en la Tabla 1, incluyen: gassericina E de *L. gasseri* EV1461 (N.º de acceso de GenBank KR080485; ID de proteínas ALX37947 y ALX3748; véase, Maldonado-Barragán, A. et al. (2016) BMC Microbiology 16:37); gassericina T de *L. gasseri* LA158 (AB710328, ID de proteínas BAM09405 y BAM09406; véase, Yasuta, N. et al., (2014) Milk Science 63:9-17; cepa *L. gasseri* LA158 está disponible públicamente en la Colección Japonesa de Microorganismos con el nombre de cepa JCM 11046) y *L. gasseri* SBT2055 (ABO29612, ID de proteínas BAA82353 y BAA82354; véase, Kawai, Y. et al. (2000) Biosci. Biotechnol. Biochem. 64:2201-2208); y *L. gasseri* LF221, que codifica las acidocinas LF221A (secuencia parcial) y LF221B (AY295874 y AY297947 para LF221A y LF221B, respectivamente; véase Majhenič et al., (2004) Applied Microbiology and Biotechnology, 63:705-714). *L. gasseri* LA327 (LC389591 y LC389592; ID de proteínas BBE52938.1 y BBE52939.1: homólogos de K7A; ID de proteínas BBE52947.1 y BBE52948.1: homólogos de K7B), y cepas de *L. gasseri* 105-1 (MK598475 y MK598476, sin IDs de proteína) y 151-2 (MK598477 y MK598478, sin IDs de proteína) codifican homólogos que son similares a las bacteriocinas Gask7A y Gask7B, mientras que *L. paragasseri* JV-V03 (ACGO02000001; ID de proteína EFJ70596: homólogo de K7B α ; ID de proteína EFJ70595: homólogo de K7B β) codifica homólogos de péptidos similares a la bacteriocina Gask7B.

[0040] Las cepas bacteriocinógenas adecuadas de *L. paragasseri*, *L. gasseri* y otras especies bacterianas (tales como, por ejemplo, las enumeradas en la Tabla 1) pueden detectarse y aislarse de fuentes naturales usando técnicas de cribado apropiadas que se conocen en la técnica. *L. paragasseri* K7 y *L. gasseri* LF221 bacteriocinógenas se aislaron originalmente de las heces de bebés humanos amamantados. Ambas cepas bacteriocinógenas de *L. paragasseri* K7 y *L. gasseri* LF221 están depositadas en la Colección Microbiana del Instituto de Ciencias Lácteas, Facultad de Biotecnología, Universidad de Ljubljana, Eslovenia. La cepa de *L. paragasseri* K7 también está depositada en la Colección Checa de Microorganismos (CCM) con el número de registro CCM 7710. (Véase, Matijašič et al., 1998. Isolation and Characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl Environ Microbiol* 49:606-612 Matijašič et al., 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby faeces. *Food Technol Biotechnol.* 37:93-100. Rogelj et al., 2006. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7: from isolation to application. *Biologia* 61(6):761-769; Peternel et al. 2010. Wide-Inhibitory Spectra Bacteriocins Produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2(4):233-240; Mavrič, et al. 2014. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* K7: Monitoring of gassericin K7 A and B genes' expression and isolation of active component. *Process Biochemistry* 49:1251-1259).

[0041] Las cepas bacteriocinógenas de *L. paragasseri*, *L. gasseri* y otras especies bacterianas útiles para la presente invención (por ejemplo, *L. paragasseri* K7, *L. gasseri* JG141, *L. gasseri* 505, *L. paragasseri* JCM5344 u otras enumeradas en la Tabla 1) se pueden propagar en medio líquido o sólido (por ejemplo, agar). Los medios bacterianos para el crecimiento de las cepas bacteriocinógenas útiles para la presente invención (por ejemplo, cepas de *L. (para)gasseri* y otras enumeradas en la Tabla 1) son conocidos y están disponibles comercialmente (por ejemplo, de Becton Dickinson (Difco), Franklin Lakes, Nueva Jersey o Merck, Darmstadt, Alemania) e incluyen, por ejemplo, de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y medio Rogosa. Las cepas bacteriocinógenas se cultivan preferentemente de forma anaeróbica o microaerófila y la temperatura del medio de cultivo puede ser cualquier temperatura adecuada para el crecimiento de las cepas bacteriocinógenas. Por ejemplo, las cepas bacteriocinógenas de *L. (para)gasseri* y otras especies bacterianas útiles para la presente invención (es decir, *L. paragasseri* K7) pueden propagarse en condiciones microaerófilas y generalmente se cultivan a aproximadamente 37 °C. Las condiciones de cultivo eficaces para cepas bacteriocinógenas útiles para la presente invención son bien conocidas en la técnica. Condiciones de cultivo específicas, medios de cultivo y procedimientos de cultivo de cepas bacteriocinógenas, particularmente *L. paragasseri* K7, se puede encontrar, por ejemplo, en Matijašič et al., 2000. *Lactobacillus* K7 - A New Candidate for a Probiotic Strain. *Food Technol. Biotechnol.* 38(2): 113-119; Rogelj et al., 2006. *Lactobacillus gasseri* LF221 y K7: from isolation to application. *Biologia* 61(6):761-769; Peternel et al. 2010. Wide-Inhibitory Spectra Bacteriocins Produced by *Lactobacillus gasseri* K7. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2(4):233-240; Mavrič, et al. 2014. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* K7: Monitoring of gassericin K7 A and B genes' expression and isolation of active component. *Process Biochemistry* 49:1251-1259).

[0042] El medio de cultivo se inocula con un cultivo en crecimiento activo de la cepa bacteriocinógena (por ejemplo, una cepa de *L. (para)gasseri*) en una cantidad suficiente para producir, después de un período de crecimiento razonable, actividad de bacteriocina adecuada que puede detectarse en el sobrenadante del cultivo. Un ejemplo no limitante de un período de crecimiento razonable de una cepa bacteriocinógena utilizada en el presente documento (por ejemplo, una cepa de *L. (para)gasseri*) es un tiempo de incubación de entre 6 y 24 horas. Las células se incuban hasta que la actividad de bacteriocina del caldo de cultivo MRS esté en el intervalo de aproximadamente 10² UB/ml a aproximadamente 10⁴ UB/ml. Una unidad de bacteriocina (BU, Bacteriocin Unit) es la cantidad de bacteriocina que causa una inhibición del crecimiento del 50 % de una cepa indicadora sensible en comparación con un control sin bacteriocina. La actividad de bacteriocina en el sobrenadante de un cultivo bacteriocinógeno (por ejemplo, el sobrenadante de un cultivo bacteriocinógeno de *L. (para)gasseri*) se mide mediante el procedimiento de dilución crítica en una placa de microtitulación, utilizando la cepa de *Lactobacillus iners* LactinV 09V1-c, ID del repositorio: BEI HM-702 (Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository, Manassas, VA) y/o *Lactobacillus sake* NCDO 2714 (National Collection of Dairy Organisms, Reading, Inglaterra) como cepas indicadoras, y un lector de placas de microtitulación, tal como se describe en Matijašič et al., 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Appl Environ Microbiol* 49:606-612 y Matijašič et al., 2000. *Lactobacillus* K7: A new candidate for a probiotic strain. *Food Technol. Biotechnol.* 38(2):113-119.

[0043] Una vez que se establece una actividad de bacteriocina adecuada en el sobrenadante del caldo de cultivo bacteriocinógeno, las células de la cepa bacteriocinógena se extraen del sobrenadante de bacteriocina mediante procedimientos de filtración de fibra hueca (por ejemplo, para escala mayor) o procedimientos de centrifugación (por ejemplo, para escala menor). Después de la separación del sobrenadante de las células bacterianas, las moléculas de bacteriocina (por ejemplo, Gask7A/Gask7B u homólogos de las mismas) dentro del sobrenadante libre de células se pueden extraer y concentrar juntas mediante medios y procedimientos adecuados conocidos en la técnica. Por ejemplo, las moléculas de bacteriocina K7 se pueden extraer juntas del sobrenadante bacteriano libre de células mediante filtración estéril del sobrenadante, absorbiendo el filtrado sobre una resina hidrófoba adecuada (por ejemplo, resina Amberlite® XAD-16, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), lavando la resina con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes adecuados (por ejemplo, etanol, acetona o cloroformo) y eluyendo las bacteriocinas K.7 de la resina usando un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes adecuados (por ejemplo, isopropanol, acetonitrilo, ácido trifluoroacético). Alternativamente, las bacteriocinas se pueden separar por precipitación del sobrenadante del cultivo bacteriano usando el procedimiento de "salting-out" con sulfato de amonio, donde se alcanza un porcentaje de saturación de sal deseado agregando lentamente sulfato de amonio al sobrenadante del cultivo libre de células que contiene bacteriocina. Después de incubar la suspensión salina en condiciones adecuadas, las bacteriocinas precipitadas mediante "salting-out" pueden recogerse mediante centrifugación, disolverse en un pequeño volumen de disolvente o tampón adecuado y purificarse adicionalmente.

[0044] Después de la extracción, el disolvente de la mezcla de bacteriocina-disolvente se puede evaporar para concentrar los péptidos de bacteriocina extraídos. La mezcla de bacteriocinas extraída y concentrada puede denominarse "semipurificada". En algunas realizaciones, las bacteriocinas semipurificadas se pueden incorporar directamente en la composición de bacteriocinas de la presente invención como una mezcla de cuatro péptidos (por ejemplo, péptidos Gask7A α y Gask7A β de bacteriocina Gask7A; y péptidos Gask7B α y Gask7B β de bacteriocina Gask7B). En otras realizaciones, las bacteriocinas semipurificadas se pueden purificar adicionalmente y separar en componentes peptídicos individuales, en los que cada péptido (por ejemplo, Gask7A α , Gask7A β , Gask7B α y Gask7B β) se aísla y se incorpora un péptido individual en la composición de bacteriocinas, o una combinación de los péptidos se incorpora en la composición de bacteriocinas. A continuación se describen procedimientos para separar y aislar las bacteriocinas y los péptidos de bacteriocina, así como una descripción detallada de las composiciones de bacteriocinas de la presente invención.

Péptidos de bacteriocinas de L. paragasseri K7 y homólogos de los mismos

[0045] El aislamiento y la purificación de la mezcla de bacteriocinas semipurificada en componentes peptídicos individuales normalmente implican procedimientos basados en cromatografía. Con base en el conocimiento de las características de la bacteriocina objetivo, tales como su tamaño estimado, carga neta de la molécula a un pH definido, afinidad de adsorción, polaridad e hidrofobicidad, etc., se pueden utilizar diferentes estrategias de separación. Las estrategias incluyen exclusión por tamaño, intercambio iónico, filtración en gel, interacción hidrófoba, cromatografía líquida de fase inversa, etc. Por ejemplo, se puede hacer pasar un extracto de bacteriocina semipurificado a través de una columna de separación por cromatografía de exclusión por tamaño y la mezcla se puede separar en fracciones de diferentes tamaños de moléculas de bacteriocina. La cromatografía de intercambio iónico, utilizando columnas de intercambio catiónico o aniónico, también se puede utilizar para separar los extractos de bacteriocina semipurificados en función de su carga eléctrica a un pH definido. Además de las columnas de cromatografía convencionales, hay disponibles comercialmente cartuchos de separación de proteínas basados en centrífugas y también se pueden utilizar para la purificación de bacteriocinas.

[0046] En algunas realizaciones, se usa cromatografía en columna de fase inversa para purificar los péptidos de bacteriocina, usando técnicas de cromatografía líquida de baja o alta presión. Por ejemplo, después de que los péptidos de bacteriocina Gask7A y Gask7B se absorban sobre o se extraigan de una resina hidrófoba como se describe anteriormente, el eluyente que contiene los péptidos de bacteriocina semipurificados (por ejemplo, bacteriocinas en una mezcla de disolvente de isopropanol/ácido trifluoroacético) se puede filtrar de forma estéril, diluir con un disolvente adecuado (por ejemplo, dilución 10 veces en una mezcla de ácido trifluoroacético/agua) y se carga en cualquier columna de fase inversa de matriz polimérica monotamaño adecuada disponible comercialmente (por ejemplo, GE Healthcare, Chicago, IL o Waters Corp., Milford, MA, etc.). Las bacteriocinas pueden eluirse por etapas o en gradiente con proporciones variables de disolvente de, por ejemplo, 2-propanol, agua y ácido trifluoroacético. Las fracciones que contienen la mayor actividad de bacteriocina se pueden purificar aún más con cromatografía de fase inversa de baja presión utilizando un gradiente de disolvente optimizado. El disolvente se puede eliminar de cada fracción mediante evaporación. Las fracciones secas pueden entonces resuspenderse en un tampón adecuado (por ejemplo, PBS o EtOH bajo) y someterse a prueba de actividad de bacteriocina mediante el ensayo de dilución crítica, como se describió anteriormente. Las fracciones obtenidas por elución con la mezcla de disolventes optimizada se pueden procesar a continuación para electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y pruebas adicionales de actividad de bacteriocina, confirmando así la separación de cada péptido de bacteriocina.

[0047] Después de los procedimientos de purificación, el peso molecular y la secuencia de aminoácidos de los péptidos de bacteriocina se pueden confirmar con precisión usando procedimientos de análisis químicos estándar, tales como espectrometría de masas y/o espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Por ejemplo, se puede utilizar

un análisis espectrométrico de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción láser asistido por matriz (MALDI-TOF) para confirmar el peso molecular de los péptidos Gask7A α , Gask7A β , Gask7B α y Gask7B β purificados. Los expertos en la técnica conocen bien la determinación del peso molecular de los péptidos utilizando EM MALDI-TOF. Véase, por ejemplo, Mavrić, *et al.* 2014. Bacteriocins of *Lactobacillus gasseri* K7 - Monitoring of gassericin K7 A and B genes' expression and isolation of active component. *Process Biochemistry* 49:1251-1259. A continuación se muestran las secuencias de péptidos maduros para los péptidos Gask7A α , Gask7A β , Gask7B α y Gask7B β aislados:

SEQ ID NO: 1 = K7B α

RNNWAANIGGAGGATVAGWALGNAVCGPACGFVGAHYVPIAWAGVTAATGFGKIRK

SEQ ID NO: 2 = K7B β

NKWGNAVIGAATGATRGVSWCRGFGPWGMTACGLGAAIGGYLGYKSN

SEQ ID NO: 3 = K7A α

KNWSVAKCGGTIGTNIAGANRGARAGSFFGQPVSVGTGALIGASAGAIGGSVQCVGWLGGGR

SEQ ID NO: 4 = K7A β

NNVNWGSVAGSCGKGAVMEIYFGNPILGCANGAATSLVLQTASGIYKKNYQKKR

[0048] Para los fines de la presente invención, además de las identidades de secuencia de aminoácidos identificadas anteriormente, los péptidos de bacteriocina Gask7A α , Gask7A β , Gask7B α y Gask7B β también se definen por secuencias que tienen al menos un 80 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. Por tanto, los péptidos adecuados para su uso en una composición de bacteriocinas de la presente invención pueden ser cualquier homólogo de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: NO: 3, o SEQ ID NO: 4. En algunos aspectos, un péptido tiene del 80 % al 99 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. En algunos aspectos, un péptido tiene del 85 % al 99 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. En algunos aspectos, un péptido tiene un 85 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, o un 86 %, 86,5 %, 87 %, 87,5 %, 88 %, 88,5 %, 89 %, 89,5 %, 90 %, 90,5 %, 91 %, 91,5 %, 92 %, 92,5 %, 93 %, 93,5 %, 94 %, 94,5 %, 95 %, 95,5 %, 96 %, 96,5 %, 97 %, 97,5 %, 98 %, 98,5 % o 99 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. En algunos aspectos, un péptido tiene de 88 % a 98 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. En algunos aspectos, un péptido tiene del 90 % al 95 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. En algunos aspectos, un péptido útil tiene una identidad de secuencia del 90 % con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. En algunos aspectos, un péptido útil de la presente invención tiene un 92,5 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. En algunos aspectos, un péptido tiene un 95 % de identidad de secuencia con una de SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4. Según la invención reivindicada, un péptido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y un péptido que tiene del 90 % al 99 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4.

[0049] La Tabla 2 a continuación incluye una lista de cepas bacterianas de ejemplo de *L. paragasseri*, *L. gasseri* y otras especies bacterianas (presentadas previamente en la Tabla 1 y analizadas anteriormente), con la homología que se comparte entre las secuencias peptídicas codificadas por cada cepa bacteriocinógena y las secuencias peptídicas de bacteriocina Gask7.

Tabla 2. Cepas bacterianas de ejemplo que codifican homólogos a las secuencias de los péptidos de bacteriocina Gask7 y la homología de aminoácidos correspondiente de las mismas

	Cepa bacteriana	Homología de aminoácidos con los péptidos de bacteriocina K7			
		Péptido Gask7A α	Péptido Gask7A β	Péptido Gask7B α	Péptido Gask7B β
	<i>L. paragasseri</i> K7	64/64	53/53	57/57	48/48
1	<i>L. gasseri</i> 4M13	64/64	53/53	56/57	48/48
2	<i>L. gasseri</i> JG141	64/64	53/53	56/57	48/48
3	<i>L. gasseri</i> 505	64/64	53/53	56/57	48/48
4	<i>L. paragasseri</i> JCM534	64/64	53/53	56/57	48/48
5	<i>L. gasseri</i> LF221	37/37 (parcial)	53/53	56/57	47/48
6	<i>L. gasseri</i> UMB0099	63/64	52/53	56/57	48/48
7	<i>L. paragasseri</i> JCM5343	63/64	52/53	56/57	48/48
8	<i>L. paragasseri</i> JCM1130	63/64	52/53	56/57	48/48
9	<i>L. gasseri</i> 105-1	63/64	52/53	55/57	48/48
10	<i>L. gasseri</i> 151-2	63/64	52/53	55/57	48/48

ES 2 980 222 T3

11	<i>L. gasseri</i> LA327	63/64	51/53	56/57	48/48
12	<i>L. gasseri</i> 497_LGAS	63/64	51/53	56/57	48/48
13	<i>L. gasseri</i> LGs_Disk7	63/64	NS	56/57	48/48
14	<i>L. gasseri</i> G7	NS	53/53	34/34 (parcial)	48/48
15	<i>L. gasseri</i> SBT2055	NS	NS	56/57	48/48
16	<i>L. gasseri</i> LA158	NS	NS	56/57	48/48
17	<i>L. paragasseri</i> JV-V03	NS	NS	55/57	48/48
18	<i>L. gasseri</i> EV1461	NS	NS	55/57	48/48
19	<i>L.gassería</i> 987_LJOH	NS	NS	55/57	48/48
20	<i>L. gasseri</i> AL5	NS	NS	55/57	48/48
21	<i>L. acidophilus</i> NCTC13720	NS	NS	55/57	48/48
22	<i>L. gasseri</i> 7135	63/64	52/53	NS	NS
23	<i>L. gasseri</i> UMB0056	63/64	52/53	NS	NS
24	<i>L. gasseri</i> AL3	63/64	52/53	NS	NS
25	<i>L. crispatus</i> G4	NS	53/53	NS	NS
26	<i>L. gasseri</i> G3	NS	52/53	NS	NS
Cepas de roedores					
27	<i>L. taiwanensis</i> 111z	63/64	52/53	NS	NS
28	<i>L. taiwanensis</i> 111w	63/64	52/53	NS	NS
29	<i>L. taiwanensis</i> 111u	63/64	52/53	NS	NS
30	<i>L. taiwanensis</i> 111o	63/64	52/53	NS	NS
31	<i>L. taiwanensis</i> 111m	63/64	52/53	NS	NS
32	<i>L. taiwanensis</i> 111k	63/64	52/53	NS	NS
33	<i>L. taiwanensis</i> 103q	63/64	52/53	NS	NS
34	<i>L. taiwanensis</i> 103n	63/64	52/53	NS	NS
35	<i>L. taiwanensis</i> 103j	63/64	52/53	NS	NS
36	<i>L. taiwanensis</i> 103a	63/64	52/53	NS	NS
37	<i>L. taiwanensis</i> 601c	62/64	52/53	NS	NS
38	<i>L. taiwanensis</i> 601a	62/64	52/53	NS	NS
39	<i>Bacillus aerius</i> CH2-D42-30	44/64 (espacio)	52/53	NS	NS

NS = Sin secuencia

[0050] La Tabla 3 a continuación incluye alineamientos de secuencias de aminoácidos de los homólogos de péptidos producidos a partir de las cepas bacteriocinógenas de la Tabla 2 para cada uno de los cuatro Gask7A α (SEQ ID NO: 3), Gask7A β (SEQ ID NO: 4), Gask7B α (SEQ ID NO: 1) y péptidos Gask7B β (SEQ ID NO: 2). Para las alineaciones de secuencias de péptidos codificadas que se muestran a continuación en la Tabla 3, las cepas bacteriocinógenas productoras de homólogos se denominan mediante sus números correspondientes mostrados previamente en la Tabla 2. Por ejemplo, las cepas bacterianas 1, 2, 3 y 4 (es decir, 1-4) corresponden a *L. gasseri* 4M13, *L. gasseri* JG141, *L. gasseri* 505 y *L. paragasseri* JCM5344, respectivamente (ver Tabla 2). Estas alineaciones de secuencias de la Tabla 3 muestran sitios polimórficos particulares dentro de los péptidos Gask7A y Gask7B.

10

Tabla 3. Alineaciones de secuencia de aminoácidos de los homólogos de péptidos producidos a partir de cepas bacterianas para cada uno de los cuatro péptidos: *GasK7A α*, *GasK7A β*, *GasK7B α*, y *GasK7B β*

Homólogos de péptido <i>GasK7A α</i>		Secuencia de péptido codificado	Cepas
SEQ ID			
SEQ ID NO:3	KNWSVAKCGGTGTNIAIGAWRGARAGSFFGQPVSVGTGALIGASAGAIGSSVQCVWLAGGGR		K7 1-4
SEQ ID NO:5	KNWSVAKCGGTGTNIAIGAWRGARAGSFFGQPVSVGAGALIGASAGAIGSSVQCVWLAGGGR		6-13 22-24 27-36
SEQ ID NO:6	ENWSVAKCGGTGTNIAIGAWRGARAGSFFGQPVSVGAGALIGASAGAIGSSVQCVWLAGGGR		37 38
SEQ ID NO:7	SFFGQPVSVGTGALIGASAGAIGSSVQCVWLAGGGR		5
SEQ ID NO:8	KNWSVAKCGGTGTNIAIGAWRGAR ----- AGAIGSSVQCVWLAGGGR		39
Homólogos de péptido <i>GasK7A β</i>		Secuencia de péptido codificado	Cepas
SEQ ID			
SEQ ID NO:4	NNVNWGSVAGSCGKGVMEYFGNPIILGCANGAATSLVLOTASGIYKNYQKKR		K7 1-5 14 25
SEQ ID NO:9	NNVNWGSVAGSCGKGVMEYFGNPIILGCANGAATSLVLOTASGIYKNYQKKR		6-10 22-24 26 27-39
SEQ ID NO:10	NNVNWGSVAGSCGKGVMEYFGNPIILGCANGAATSLVLOTASGIYKNYQKKR		11 12
Homólogos de péptido <i>GasK7B α</i>		Secuencia de péptido codificado	Cepas
SEQ ID			
SEQ ID NO:1	RNNWAANIGGAGGATVAGWALGNVAVCGPACGFGAHHYVPIAWAGVTAATGGFGKIRK		K7 1-8 11-13 15-16
SEQ ID NO: 11	RNNWAANIGGAGGATVAGWALGNVAVCGPACGFGAHHYVPIAWAGVTAATGGFGKIRK		

(continuación)

Homólogos de péptido <i>Gask7B</i> α			
SEQ ID	Secuencia de péptido codificado		Cepas
SEQ ID NO:12	RNNWAANIGGGGGATVAGWALGNVAVCCPACGFFVBEHYVPIAWAGVTAATGGFGKIRK		9 10 17
SEQ ID NO:13	RNNLAANIGGGGGATVAGWALGNVAVCCPACGFFVGAHYVPIAWAGVTAATGGFGKIRK		18-21
SEQ ID NO:14	AVCGPACGFFVGAHYVPIAWAGVTAATGGFGKIRK		14
Homólogos de péptido <i>Gask7B</i> β			
SEQ ID	Secuencia de péptido codificado		Cepas
SEQ ID NO:2	NKWGNAVIGAATGATRGVSWCRGFGPWGNTACGLGAAIGGYLYKSN		K7 1-4 6-21
SEQ ID NO:15	NKWGNAVIGAATGATRGVSWCRGFGPWGNTACALGAAIGGYLYKSN		5

[0051] Los péptidos de bacteriocina de la presente invención se definen además por una combinación de su actividad bactericida y por su capacidad para unirse a anticuerpos policlonales o monoclonales generados contra la proteína prototipo de SEQ ID NO: 1-4. En las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces más que la base y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales generados contra el péptido K7B α , codificado en SEQ ID NO: 1, variantes de secuencia, o partes de la misma, pueden seleccionarse para obtener sólo aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con ese péptido y no con otras proteínas, excepto para variantes polimórficas de K7B α . Se pueden utilizar diversos formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de manera rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para una descripción de los formatos y condiciones de los inmunoensayos que pueden usarse para determinar inmunorreactividad específica). Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal o ruido de base y, más normalmente, más de 10 a 100 veces la base.

[0052] En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos, se pueden obtener mediante extracción y purificación de una fuente natural, tal como se describe en detalle anteriormente, o mediante cualquier medio alternativo conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, mediante expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el péptido (por ejemplo, en una célula o en un sistema de traducción libre de células); o sintetizando enzimática o químicamente el péptido. Además, se puede obtener un péptido de bacteriocina aislado escindiendo péptidos de longitud completa. Cuando el péptido es un fragmento de un péptido natural más grande, el péptido aislado es más corto y excluye el péptido natural de longitud completa del cual es un fragmento.

[0053] Por ejemplo, los péptidos aislados para usar en las composiciones y procedimientos de la presente invención se pueden preparar usando cualquier número de técnicas químicas de síntesis de polipéptidos bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la síntesis de péptidos en fase de solución para construir péptidos de tamaño moderado o, para la construcción química de péptidos, se puede emplear la síntesis en fase sólida. Atherton et al. (1981) *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 362:833-839. Los péptidos de bacteriocina aislados se pueden producir sintéticamente uniendo dos o más péptidos o polipéptidos mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos se pueden sintetizar químicamente usando equipos de laboratorio actualmente disponibles usando química Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) o Boc (terc-butiloxicarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California). Un experto en la técnica podrá entender fácilmente que un péptido correspondiente a una bacteriocina útil para la presente invención, por ejemplo, puede sintetizarse mediante reacciones químicas estándar.

[0054] Por ejemplo, la ligación enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permite unir fragmentos peptídicos relativamente cortos para producir fragmentos peptídicos más grandes o péptidos de bacteriocina. Véase, por ejemplo, Abrahmsen L et al., *Biochemistry*, 30:4151 (1991). También se pueden utilizar enzimas proteolíticas para acoplar aminoácidos para producir péptidos. Véase, por ejemplo, Kullmann (1987) *Enzymatic Peptide Synthesis*, CRC Press, Inc. Alternativamente, se puede utilizar la ligación química nativa de péptidos sintéticos para construir sintéticamente péptidos o polipéptidos grandes a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este procedimiento consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson et al. *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 266: 776-779 (1994)). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido-alfa-tioéster sintético desprotegido con otro segmento peptídico desprotegido que contiene un residuo Cys amino-terminal para dar un intermedio unido a tioéster como producto covalente inicial. Sin un cambio en las condiciones de reacción, este intermedio experimenta una reacción intramolecular rápida y espontánea para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de ligación. La aplicación de este procedimiento de ligadura química nativa a la síntesis total de una molécula peptídica se ilustra mediante la preparación de interleucina 8 humana (IL-8) (Baggiolini M et al. (1992) *FEBS Lett.* 307:97-101; Clark-Lewis I et al., *J. Biol. Chem.* 269:16075 (1994); Clark-Lewis I et al., *Biochemistry*, 30:3128 (1991); Rajarathnam K et al., *Biochemistry* 33: 6623-30 (1994)).

[0055] Alternativamente, los segmentos de péptidos desprotegidos se unen químicamente donde el enlace formado entre los segmentos de péptidos como resultado de la ligación química es un enlace no natural (no peptídico) (Schmolzer, M et al. *Science*, 256:221 (1992)). Esta técnica se ha utilizado para sintetizar análogos de dominios proteicos, así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton RC et al., *Techniques in Protein Chemistry IV*. Academic Press, Nueva York, págs. 257-267 (1992)).

[0056] En algunas realizaciones, el péptido aislado se puede obtener utilizando la maquinaria bioquímica de una célula o mediante aislamiento de una fuente biológica. Por tanto, se pueden emplear técnicas de ADN recombinante para la producción de los péptidos. Véase, por ejemplo, Hames et al. (1987) *Transcription and translation: A Practical Approach*, IRL Press. Ejemplos adicionales de técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, e instrucciones suficientes para dirigir a personas expertas a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3.^a ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, (Sambrook). Los péptidos también se pueden aislar utilizando técnicas estándar, tales como la cromatografía de afinidad.

Actividad bactericida selectiva de los péptidos de bacteriocina

5 [0057] La actividad bactericida de un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, se prueba determinando la concentración inhibidora mínima (CMI) para cada péptido o combinación de péptidos. Para los fines de la presente invención, los péptidos de bacteriocina se prueban para determinar la actividad bactericida selectiva contra *L. iners* usando ensayos *in vitro* para determinar la CMI comparativa de los péptidos de bacteriocina, o combinaciones de los mismos. La CMI comparativa de los péptidos de bacteriocina, o combinaciones de los mismos, se puede determinar monitorizando el crecimiento de una cepa indicadora en una placa de microtitulación de múltiples pocillos, tal como se describe anteriormente y en Matijašić *et al.*, 2000. *Lactobacillus* K7 - A New Candidate for a Probiotic Strain. *Food Technol. Biotechnol.* 38(2):113-119. En los ensayos de CMI se pueden utilizar mezclas de bacteriocinas semipurificadas, péptidos purificados o combinaciones de péptidos purificados.

15 [0058] En algunas realizaciones, los péptidos, o combinaciones de los mismos, que tienen actividad bactericida selectiva contra *L. iners* tendrán una CMI para *L. iners* que es al menos 2 veces menor que la CMI para el *Lactobacillus* sp. protector, *L. crispatus* (SJ-3C). Es decir, la concentración del péptido aislado, o la combinación de péptidos aislados, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos del mismo, que previene el crecimiento de *L. iners* es al menos 2 veces menor que la concentración de los péptidos o combinación de péptidos que previene el crecimiento de *L. crispatus*. En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tiene una CMI para *L. iners* que es al menos 2 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C), o al menos 3 veces menor que, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, o al menos 10 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C). En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tienen una CMI para *L. iners* que es aproximadamente 2 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C), o aproximadamente 3 veces menor que, o aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9 o aproximadamente 10 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C).

30 [0059] En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tienen una CMI para *L. iners* que es al menos 5 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C). En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tienen una CMI para *L. iners* que es aproximadamente 5 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C). En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tiene una CMI para *L. iners* que es al menos 10 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C). En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tiene una CMI para *L. iners* que es aproximadamente 10 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C). En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tiene una CMI para *L. iners* que es más de 10 veces menor que la CMI para *L. crispatus* (SJ-3C).

45 [0060] En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos tendrán una CMI frente a *L. iners* de entre aproximadamente 10 ng/ml y 600 ng/ml. En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tendrá una CMI contra *L. iners* de aproximadamente 10 ng/ml, o aproximadamente 15, 20, 25, 30, 60, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, o 600 ng/ml. En otras realizaciones, dicho al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tendrá una CMI contra *L. iners* de entre aproximadamente 15 ng/ml y aproximadamente 450 ng/ml, o entre aproximadamente 20 ng/ml y aproximadamente 300 ng/ml, o entre aproximadamente 25 ng/ml y aproximadamente 200 ng/ml. En algunas realizaciones, dicho al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tendrá una CMI frente a *L. iners* de entre aproximadamente 25 ng/ml y 150 ng/ml. En otras realizaciones, dicho al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, tendrá una CMI frente a *L. iners* de aproximadamente 25 ng/ml.

65 [0061] En algunas realizaciones, el péptido de bacteriocina que se puede incorporar en la composición de bacteriocinas de la presente invención es un péptido de SEQ ID NO: 1, o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, el péptido que se puede incorporar a la composición de bacteriocinas es un péptido de SEQ ID NO: 2, o un homólogo del mismo. En otras realizaciones, el péptido que se puede incorporar a la composición de bacteriocinas es un péptido de SEQ ID NO: 3, o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, el péptido que se puede incorporar a la

composición de bacteriocinas es un péptido de SEQ ID NO: 4, o un homólogo del mismo.

[0062] En algunas realizaciones, una combinación de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, exhibirá actividad bactericida sinérgica, en la que la CMI de una combinación de péptidos adecuada será menor que la CMI de péptidos individuales. En otras palabras, la actividad bactericida selectiva contra *L. iners* de una combinación de péptidos adecuada puede ser mayor que la actividad bactericida selectiva contra *L. iners* de un péptido individual. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, incorporar mezclas sinérgicas de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, dentro de las composiciones de bacteriocina de la presente invención puede prevenir el desarrollo de resistencia en el organismo a *L. iners* objetivo .

[0063] En algunas realizaciones , una combinación adecuada de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, tendrá una CMI contra *L. iners* de entre aproximadamente 0,01 ng/ml y 100 ng/ml. En algunas realizaciones, una combinación adecuada de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, tendrá una CMI contra *L. iners* de aproximadamente 0,01 ng/ml, o aproximadamente 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 ng/ml. En otras realizaciones, una combinación adecuada de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, tendrá una CMI contra *L. iners* de entre aproximadamente 0,025 ng/ml y 80 ng/ml, aproximadamente 0,05 ng/ml y 75 ng/ml, aproximadamente 0,075 ng/ml y 60 ng/ml, aproximadamente 0,1 ng/ml y 50 ng/ml, aproximadamente 0,25 ng/ml y 30 ng/ml, aproximadamente 0,5 ng/ml y 25 ng/ml, aproximadamente 0,75 ng/ml y 20 ng/ml, aproximadamente 1 ng/ml y 18 ng/ml, o aproximadamente 1,5 ng/ml y aproximadamente 15 ng/ml, o aproximadamente 3 ng/ml y aproximadamente 10 ng/ml. En algunas realizaciones, una combinación adecuada de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, tendrá una CMI contra *L. iners* de entre aproximadamente 0,1 ng/ml y 5 ng/ml. En otras realizaciones, una combinación adecuada de los péptidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, tendrá una CMI contra *L. iners* de aproximadamente 1,5 ng/ml.

[0064] En algunas realizaciones, la sinergia entre dos o más péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, se puede determinar usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad sinérgica podría determinarse utilizando el índice de concentración inhibidora fraccionaria (FIC) mediante un procedimiento de microdilución en caldo (véase la solicitud de patente de Estados Unidos US2015/0072920 A1; Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. 2007. Edición Kindle Richard Schwalbe (Editor), Lynn Steele-Moore (Editor), Avery C. Goodwin (Editor) CRC Press, Nueva York, EE. UU.). Según este procedimiento, una combinación que tiene un índice FIC < 0,5 se considera sinérgica, una combinación que tiene $0,5 < \text{índice FIC} \leq 1$ se considera sinérgica moderada, una combinación que tiene $1,0 < \text{índice FIC} \leq 4,0$ se considera indiferente y una combinación que tiene un índice FIC > 4 se considera antagonista. En algunas realizaciones, la combinación de péptidos puede tener un efecto sinérgico moderado o alto según se determina mediante el procedimiento FIC. En algunas realizaciones, la combinación de péptidos se puede combinar a valores inferiores a sus CMI. En algunas realizaciones, la combinación de péptidos que tiene un efecto sinérgico permite el uso de una concentración más baja de cada péptido de bacteriocina.

[0065] En algunas realizaciones, la combinación de péptidos de bacteriocina que se pueden incorporar en la composición de bacteriocinas de la presente invención incluye un péptido de SEQ ID NO: 1, o un homólogo del mismo, y un péptido de SEQ ID NO: 2, o un homólogo del mismo. En algunas realizaciones, la combinación de péptidos de bacteriocina que se pueden incorporar en la composición de bacteriocinas de la presente invención incluye un péptido de SEQ ID NO: 1, o un homólogo del mismo, y un péptido de SEQ ID NO: 4, o un homólogo del mismo. En otras realizaciones, la combinación de péptidos de bacteriocina que se pueden incorporar en la composición de bacteriocinas de la presente invención incluye un péptido de SEQ ID NO: 2, o un homólogo del mismo, y un péptido de SEQ ID NO: 3, o un homólogo del mismo. En otras realizaciones, la combinación de péptidos de bacteriocina que se pueden incorporar en la composición de bacteriocinas de la presente invención incluye un péptido de SEQ ID NO: 3, o un homólogo del mismo, y un péptido de SEQ ID NO: 4, o un homólogo del mismo. En otras realizaciones, la combinación de péptidos de bacteriocina que se pueden incorporar en la composición de bacteriocinas de la presente invención incluye un péptido de SEQ ID NO: 1, un péptido de SEQ ID NO: 2, un péptido de SEQ ID NO: 3 y un péptido de SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos.

Formulaciones intravaginales de composiciones de bacteriocinas

[0066] La cantidad de dicho al menos un péptido de bacteriocina aislado, o una combinación de péptidos aislados, de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos, o mezcla de péptidos (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 4) presente en las composiciones de bacteriocinas de la presente invención estará en una cantidad suficiente para que la composición en su conjunto exhiba propiedades bactericidas. La cantidad de dicho al menos un péptido o combinación de péptidos a incluir en las composiciones de bacteriocinas será una CMI o porcentaje (% p/p) que sea lo suficientemente grande como para tener en cuenta las interacciones potenciales entre los excipientes farmacéuticamente aceptables, la unión a proteínas *in vivo*, y posible degradación metabólica *in vivo*, al mismo tiempo que exhibe actividad bactericida selectiva contra *L. iners*. Por tanto, la CMI *in vitro* de los péptidos y combinaciones de péptidos que tienen actividad bactericida

selectiva contra *L. iners* descrita anteriormente no será la misma para aplicaciones *in vivo*. Para aplicaciones *in vivo*, la cantidad de bacteriocina o mezcla de péptidos dentro de la composición de bacteriocinas será una concentración inhibitoria mínima que está entre aproximadamente 10 veces y aproximadamente 10.000 veces mayor que la CMI *in vitro*. En algunas realizaciones, la cantidad de bacteriocina o mezcla de péptidos dentro de la composición de bacteriocinas para aplicaciones *in vivo* será una CMI que es una concentración aproximadamente 10 veces mayor que la CMI *in vitro*, o aproximadamente 50 veces, 75 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 3000 veces, 4000 veces, 5000 veces, 6000 veces, 7000 veces, 8000 veces, 9000 veces o aproximadamente 10.000 veces mayor que la CMI *in vitro*. En algunas realizaciones, la cantidad de bacteriocina o mezcla de péptidos dentro de la composición de bacteriocinas para aplicaciones *in vivo* será una CMI que está entre aproximadamente 15 veces mayor y 9000 veces mayor la concentración que la CMI *in vitro*, o de aproximadamente 30 veces a aproximadamente 8000 veces mayor, o de aproximadamente 60 veces a aproximadamente 6000 veces mayor, o de aproximadamente 100 veces a aproximadamente 5000 veces mayor, o de aproximadamente 200 veces a aproximadamente 1000 veces mayor, o de aproximadamente 250 veces mayor a aproximadamente 500 veces mayor de concentración que la CMI *in vitro*.

[0067] En algunas realizaciones, la cantidad de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos, presentes en la composición de bacteriocinas es una CMI, o unidad de dosificación, de entre aproximadamente 1 µg/ml y 50 mg/ml. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente 1 µg/ml de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos, o aproximadamente 5 µg/ml, 6 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 9 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml o aproximadamente 50 mg/ml de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 4,5 mg/ml de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, o de aproximadamente 3 µg/ml a aproximadamente 35 mg/ml de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o de 5 µg/ml a aproximadamente 25 mg/ml de al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o de 10 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml, o de 50 µg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, o de 75 µg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de 0,1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml, o de 1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente 30 mg/ml de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente 10 mg/ml de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente 1 mg/ml de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos.

[0068] En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 5 % de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente 0,0001 % de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos, o aproximadamente 0,0005, 0,0006, 0,0007, 0,0008, 0,0009, 0,001, 0,0015, 0,0025, 0,003, 0,004, 0,005, 0,0075, 0,01, 0,05, 1, 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 % de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 4,5 % de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y homólogos de los mismos, o de aproximadamente 0,0003 % a aproximadamente 3,5 % de al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o de 0,0005 % a aproximadamente 2,5 % de al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o del 0,001 % a aproximadamente el 2 % de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o del 0,005 % a aproximadamente el 1,5 % de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o del 0,0075 % a aproximadamente el 1,0 % de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o del 0,01 % a aproximadamente el 0,5 % de al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos, o del 0,1 % a aproximadamente el 0,3 % de dicho al menos un péptido de bacteriocina o mezcla de péptidos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente el 3 % de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente el 1 % de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 2 ID NO: 4, y homólogos de los mismos. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende aproximadamente el 0,1 % de al menos un péptido de bacteriocina, o combinación de

péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 , SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos.

5 [0069] Para que la composición de bacteriocinas de la presente invención alcance la actividad bactericida deseable in vivo, es decir, actúe directamente sobre las superficies no mucosas de la vulva o sobre las superficies mucosas de la cavidad vaginal, la dosis unitaria del péptido de bacteriocina, o dosis unitaria de mezcla de péptidos, se incorpora con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, el término "dosis unitaria" o "dosis unidad" o "unidad" se refiere a una unidad físicamente discreta que contiene una cantidad predeterminada de principio activo (es decir, la CMI o cantidad de péptido de bacteriocina, o mezcla de péptidos) calculada para producir un efecto terapéutico deseado. La dosis unitaria o la dosis unidad o la unidad pueden estar en forma de geles, cremas, pomadas, cápsulas, supositorios, etc., a los que se hace referencia en el presente documento como una "forma de dosificación unitaria". Cualquier excipiente utilizado en formulaciones que tengan una dosis unitaria de péptido de bacteriocina de la presente invención, o una dosis unitaria de mezcla de péptidos, debe estar aprobado para uso humano y ser aceptable para su uso en la vagina. Es posible que los excipientes aprobados para uso oral no estén aprobados y/o no sean adecuados para aplicaciones intravaginales. Los excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en las composiciones de bacteriocina de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica de formulaciones farmacéuticas y los ejemplos se describen en REMINGTON'S Pharmaceutical Sciences, 19ª edición, AR Gennaro, ed., (1995).

20 [0070] La elección de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados dependerá de la naturaleza exacta de la formulación intravaginal tópica y de la forma de dosificación deseada, por ejemplo, si la composición de bacteriocinas se va a formular, por ejemplo, en geles, cremas, pomadas, cápsulas o supositorios. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención es una formulación de preparación semisólida estéril o casi estéril adecuada para aplicaciones intravaginales tópicas en el tracto vaginal, tal como una crema, pomada, gel o emulsión. Se pueden usar diversas clases de excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados en las formulaciones intravaginales y son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Garg et al. (2001), Compendium of Pharmaceutical Excipients for Vaginal Formulations, Pharm. Tech. 25: 14-24. Por ejemplo, los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitarse a los mismos, bases hidrogenocarbonadas o bases oleaginosas, bases de absorción, bases eliminables en agua y bases solubles en agua (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed. (2000)). En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable no es irritante, no mancha, es estable, no depende del pH y es compatible con la mezcla de bacteriocinas/péptidos. En algunas realizaciones, el excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser, pero sin limitarse a los mismos, un agente endurecedor, un aceite, un disolvente, un emulsionante, un humectante, un agente tampón, una carga, un emoliente, un estabilizador o combinaciones de los mismos.

35 [0071] El término "agente endurecedor" se refiere a una sustancia, o mezcla de sustancias, añadida para hacer que una composición de crema vaginal sea más viscosa a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, un agente endurecedor es cualquier sustancia que promueva la formación de una formulación que tenga una consistencia semisólida. El agente endurecedor puede ser hidrófilo (por ejemplo, Carbolpol®, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato, polietilenglicol). En algunas realizaciones, el agente endurecedor tiene un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) bajo. En algunas realizaciones, el valor de HLB es inferior a 7. En algunas realizaciones, el valor de HLB es inferior a 5. En algunas realizaciones, el valor de HLB es aproximadamente 4. Los ejemplos de agentes endurecedores adecuados incluyen, pero sin limitarse a los mismos, aceites vegetales hidrogenados, alcohol cetílico, cera de ésteres cetílicos, cera microcristalina, parafina, alcohol estearílico, alcohol laurílico, alcohol miristal, alcohol cetosteárico, cera blanca, cera amarilla, cera de abejas, cera de candelilla, cera de algodón, cera de carnauba, cera de bayas de laurel, salvado de arroz y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, el agente endurecedor es una mezcla de cera de ésteres cetílicos, alcohol cetílico y cera de abejas.

50 [0072] El término "aceite" se refiere a cualquier líquido hidrófobo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, un aceite es un éster de glicerol (1,2,3-propanotriol) y ácidos grasos. Generalmente, cada una de las cadenas de hidrocarburos de ácidos grasos contiene más de 8 carbonos. En algunas realizaciones, cada cadena de hidrocarburos contiene de aproximadamente 12 a aproximadamente 36 átomos de carbono. En algunas realizaciones, las cadenas de hidrocarburos pueden contener una variedad de grupos funcionales. En algunas realizaciones, la cadena de hidrocarburos está ramificada. En algunas realizaciones, las cadenas de hidrocarburos son insaturadas o poliinsaturadas. En algunas realizaciones, las cadenas de hidrocarburos están saturadas. El grado de saturación puede afectar el estado físico, por ejemplo la viscosidad, del aceite. En algunas realizaciones, el aceite puede ser, pero sin limitarse a los mismos, aceites vegetales, de nueces y de semillas (por ejemplo, aceite de almendras, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de jojoba, aceite de linaza, aceite de semilla de uva, aceite de colza, aceite de mostaza, aceite de oliva, aceite de palma y de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de crambe, aceite de germen de trigo y manteca de cacao), aceites de hidrocarburos y petróleo (por ejemplo, vaselina, aceite mineral y parafina líquida). En algunas realizaciones, el término "aceite" se refiere a ácidos grasos superiores (por ejemplo, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido behénico, ácido oleico, ácido 12-hidroxiesteárico, ácido undecilénico, talloil, ácido graso de lanolina, ácido isoesteárico, ácido linoleico y ácido linoléico) y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el aceite no es un éster de glicerol, por ejemplo, aceite mineral y aceite de silicona.

- 5 [0073] El término "disolvente" se refiere a un tipo de excipiente farmacéuticamente aceptable que es capaz de disolver o dispersar uno o más de los péptidos de bacteriocina y/o excipientes adicionales de la composición de bacteriocinas. El disolvente puede ser acuoso o no acuoso. En algunas realizaciones, el disolvente es hidrófilo y es del 10 % al 75 % en peso, o del 20 % al 60 % en peso, de la composición total. En algunas realizaciones, el disolvente es lipófilo y representa del 20 % al 60 % en peso, o del 25 % al 50 % en peso, de la composición total. En algunas realizaciones, el disolvente es agua, un poliol (por ejemplo, glicerol) o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el disolvente es un aceite tal como se describe anteriormente.
- 10 [0074] El término "emulsionante" se refiere a un tipo de excipiente farmacéuticamente aceptable que promueve la formación y estabilización de una emulsión o suspensión. En algunas realizaciones, el emulsionante incluye, pero sin limitarse a los mismos, lauril sulfato de sodio, monoestearato de propilenglicol, estearato de metilo, monoestearato de glicerilo y combinaciones de los mismos.
- 15 [0075] El término "humectante" se refiere a un tipo de excipiente farmacéuticamente aceptable que promueve la retención de humedad en la composición de bacteriocinas de la presente invención. En algunas realizaciones, el humectante incluye, pero sin limitarse a los mismos, polietilenglicol, propilenglicol, glicerina, poliol, derivados de poliol y combinaciones de los mismos.
- 20 [0076] El término "agente tampón" se refiere a un tipo de excipiente farmacéuticamente aceptable capaz de neutralizar tanto ácidos como bases y mantener así el pH deseado de la composición de bacteriocinas de la presente invención. En algunas realizaciones, el agente tampón afecta las propiedades emulsionantes. Por ejemplo, se pueden proporcionar diferentes agentes tampón para aumentar o disminuir la emulsificación del uno o más péptidos de bacteriocina y/o excipientes adicionales de la composición de bacteriocinas. En algunas realizaciones, el tampón
25 puede ser, pero sin limitarse a los mismos, tampones Tris (Tris EDTA (TE), acetato de Tris (TAE), fosfato de Tris (TPE), tris glicina), tampones de fosfato (por ejemplo, fosfato de sodio, fosfato de potasio), tampones de bicarbonato, tampones de acetato (por ejemplo, acetato de sodio), tampones de amonio, tampones de citrato y derivados y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, se usa un tampón de ácido orgánico. En algunas realizaciones, se puede usar un tampón acetato, un tampón fosfato o un tampón citrato. En algunas realizaciones, se
30 puede utilizar un tampón zwitteriónico. En algunas realizaciones, el agente tampón es un tampón fosfato (por ejemplo, fosfato sódico dibásico).
- [0077] El pH de la composición de bacteriocinas de la invención puede ser fisiológicamente compatible y/o suficiente para mantener la estabilidad de la composición. En algunas realizaciones, la composición de la presente invención
35 puede tener un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 9,0. En algunas realizaciones, la composición de la presente invención puede tener un pH de aproximadamente 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 o 9,0. En algunas realizaciones, la composición de la presente invención puede tener un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 6,0 a aproximadamente
40 8,0 o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, la composición de la presente invención puede tener un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0.
- [0078] Tal como se define en el presente documento, un "emoliente" es un tipo de excipiente farmacéuticamente aceptable que hidrata y aumenta la flexibilidad de la superficie vaginal a la que se aplica la formulación intravaginal de la composición de bacteriocina. En algunas realizaciones, el emoliente puede ser, pero sin limitarse a los mismos,
45 lanolina, miristato de isopropilo, palmitato, alcohol oleílico, cera de abejas, aceite mineral, aceite de silicona o combinaciones de los mismos.
- [0079] Tal como se define en el presente documento, una "carga" es un tipo de excipiente farmacéuticamente aceptable usado para dar volumen a la formulación intravaginal sin reaccionar químicamente con los péptidos de bacteriocina y/o excipientes adicionales de la composición de bacteriocinas de la presente invención. Los expertos en la técnica conocen las cargas, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20^a ed. (2000).

Composiciones de bacteriocinas combinadas conjuntamente

- 55 [0080] Las composiciones de bacteriocinas de la presente invención también pueden contener un antibiótico para formar una composición de bacteriocinas combinadas conjuntamente, en la que el péptido, o combinación de péptidos, inhibe selectivamente *L. iners* y el antibiótico de la composición de bacteriocinas inhibe diversas especies no *Lactobacillus* (es decir, organismos asociados a la VB). En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención puede incluir cualquier antibiótico adecuado, tal como, por ejemplo, clindamicina, metronidazol,
60 secnidazol, tinidazol o VivaGel® (SPL-7013, o astodrímico sódico), además del péptido, o combinación de péptidos y excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención puede incluir un antibiótico seleccionado entre clindamicina, metronidazol, secnidazol y astodrímico sódico, además del péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención puede incluir clindamicina o
65 astodrímico sódico como antibiótico, además del péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención puede

incluir clindamicina como antibiótico, además del péptido de bacteriocina, o combinación de péptidos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0081] En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende opcionalmente de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 % de un antibiótico adecuado. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende opcionalmente aproximadamente 0,01 % de un antibiótico adecuado, o aproximadamente 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 % de antibiótico. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención comprende opcionalmente de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 4 % de un antibiótico adecuado, o de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3 % de un antibiótico adecuado, o de 0,5 % a aproximadamente 3 % de un antibiótico adecuado, o del 1 % a aproximadamente el 2 % de un antibiótico adecuado. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas de la presente invención opcionalmente comprende aproximadamente el 2 % de un antibiótico adecuado.

IV. PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO

[0082] Cualquier referencia a la presente invención que proporciona un procedimiento de tratamiento debe interpretarse como una referencia a composiciones para uso en dicho procedimiento.

Diagnóstico de pacientes con microbiota diversa asociada con VB

[0083] Se pueden detectar y diagnosticar microbiotas diversas asociadas con VB usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Las microbiotas diversas asociadas con la VB puede ser sintomática o asintomática. Los síntomas pueden incluir olor vaginal anormal, aumento del flujo vaginal y malestar vaginal debido a picazón y/o dolor. En algunos casos, la microbiota diversa sintomática asociada con la VB puede depender de las comunidades bacterianas dominantes de la microbiota vaginal de la paciente. Por ejemplo, el olor vaginal anormal atribuido a la VB puede estar asociado con una microbiota diversa dominada por las siguientes especies que no son *Lactobacillus*: *Gardnerella vaginalis*, *Leptotrichia amnionii*, *Eggerthella*, *Dialister micaerophilus*, *Parvimonas micro*, *Prevotella buccalis*, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Porphyromonas. asaccharolytica* y VBAB1. En otros casos, un aumento en el flujo vaginal y/o flujo vaginal descolorido atribuido a la VB puede estar asociado con una microbiota diversa dominada por las siguientes especies que no son *Lactobacillus*: *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnioni*, *Eggerthella*, *Parvimonas micra* y *Prevotella timonensis*. (Véase, Srinivasan et al., 2012. Bacterial Communities in Women with Bacterial Vaginosis: High Resolution Phylogenetic Analyses Reveal Relationships of Microbiota to Clinical Criteria PLoS One 7(6), número de artículo: e37818).

[0084] Los médicos pueden detectar y diagnosticar la microbiota diversa asociada con la VB, ya sea sintomática o asintomática. Se detecta clínicamente una microbiota diversa asociada con VB en la paciente femenina utilizando los criterios de Amsel (Amsel, R. et al. 1983. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. Am. J. Med. 74: 14-22), o microbiológicamente utilizando el sistema de puntuación de Nugent (Nugent, R. et al. 1991. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. J.Clin. Microbiol. 29(2):297-301). El diagnóstico clínico de Amsel de VB debe satisfacer al menos 3 de los 4 criterios de Amsel: secreción vaginal fina y homogénea de color gris, olor (prueba de olor positivo al agregar KOH al fluido genital), > 20 % de células clave (células epiteliales vaginales tachonadas de cocobacilos adherentes observado microscópicamente) y pH >4,5.

[0085] La microbiota diversa asociada con la VB se puede detectar microbiológicamente examinando frotis vaginales teñidos con Gram (sistema de puntuación de Nugent) para determinar la concentración relativa de lactobacilos (bacterias Gram positivas) y bacilos y cocos Gram negativos y Gram variables (es decir, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Peptostreptococci*) y bacilos gran negativos curvados (es decir, *Mobiluncus*) característicos de la microbiota diversa asociada con la VB. La puntuación de Nugent puede variar de 0 a 10. Una puntuación de 0 a 3 se considera el rango normal y es indicativa de que la mucosa vaginal tiene preponderancia de *Lactobacillus* spp. y cantidades relativamente bajas de bacterias que típicamente están asociadas con la VB. Una puntuación de 4 a 6 se considera una "puntuación de Nugent intermedia" y se asocia con una microbiota y una mucosa vaginal más diversas, que a menudo contienen una cantidad significativa de *L. iners*. La VB se define como una puntuación de Nugent de 7 a 10 con una microbiota diversa y pocos *Lactobacillus* protectores, si es que hay alguno. *Lactobacillus iners* es generalmente el único *Lactobacillus* que se encuentra en VB. Por tanto, una puntuación de Nugent de al menos 4 (es decir, una puntuación de Nugent mayor o igual a 4, o una puntuación de Nugent de 4 a 10) se asocia con una microbiota diversa que no está dominada por *Lactobacillus* spp protector. Los procedimientos de detección y diagnóstico para microbiota diversa sintomática asociada con VB son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de EE.UU. n° 8.329.447. Véase también, Srinivasan et al., 2012. Bacterial Communities in Women with Bacterial Vaginosis: High Resolution Phylogenetic Analyses Reveal Relationships of Microbiota to Clinical Criteria PLoS One 7(6), número de artículo: e37818; Haahr, T. et al. Hum. Reprod. 31 abril 2016 (4): 795-803; Datcu, R. et al. BMC Infectious Diseases 2013, 13:480; <https://www.cdc.gov/std/tg2015/bv.htm>.

[0086] En algunos casos, se pueden usar procedimientos de reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa (qPCR) para diagnosticar a una mujer con microbiota diversa asociada con VB midiendo varios organismos indicadores con alta prevalencia de VB y predictivos de VB (es decir, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*). Por ejemplo, un

médico puede realizar pruebas a una mujer para detectar microbiotas diversas asociadas con la VB mediante qPCR para identificar y cuantificar bacterias específicas del microbioma vaginal. El médico puede extraer el ADN bacteriano de los hisopos vaginales obtenidos durante el examen con espéculo. El ADN bacteriano se extrae usando una columna de centrifugación, tal como, por ejemplo, el kit FastDNA™ SPIN for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EE. UU.) con aproximadamente 200 µl de medio de transporte ESwab™, seguido de la elución del ADN en aproximadamente 100 µl de agua libre de ADNasa. A continuación, se realiza la qPCR en aproximadamente 50 µl de volumen de reacción total con aproximadamente 5 µl de ADN molde o aproximadamente 50 ng de ADN genómico (ADNg). Una microbiota vaginal anormal se define cuando *G. vaginalis* y/o *A. vaginae* están presentes en concentraciones superiores a las concentraciones umbral definidas mediante el análisis de la curva ROC utilizando la puntuación Nugent para VB de 7 a 10 como estándar de oro. Los niveles umbral para *G. vaginalis* y *A. vaginae* se establecieron en $5,7 \times 10^7$ y $5,7 \times 10^6$ copias del gen de ARNr 16S/ml, respectivamente. Las muestras recolectadas de una mujer con una carga bacteriana que está por encima de los puntos de corte (es decir, según lo define ROC) se consideran positivas para organismos asociados a la VB y las muestras con una carga bacteriana por debajo de los puntos de corte se consideran negativo para organismos asociados a VB. Ver, Haahr, T. et al. Hum. Reprod. 31 de abril de 2016 (4): 795-803 y Datcu, R. et al. BMC Infectious Diseases 2013, 13:480.

[0087] La mucosa vaginal de una mujer diagnosticada con una microbiota diversa asociada con VB, por definición, carece de una cantidad suficiente de *Lactobacillus* spp. (es decir, *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂). Debido a que *L. iners*, menos protector, es el único *Lactobacillus* spp. vaginal que pueden coexistir con organismos asociados a la VB, una microbiota de la mucosa vaginal (es decir, un nicho vaginal) poblada con organismos asociados a la VB también puede contener *L. iners*. Por lo tanto, para los fines de la presente invención, se puede entender que una mucosa vaginal poblada con niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ puede ser colonizada por cantidades significativas de *L. iners*, o cantidades significativas de organismos asociados a VB o, en algunos casos, cantidades significativas de organismos asociados a VB y cantidades observables de *L. iners*.

[0088] Los niveles de *Lactobacillus* vaginales que habitualmente producen H₂O₂ en una paciente (por ejemplo, *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri*) pueden determinarse mediante qPCR. El médico puede obtener hisopos del fórnix posterior durante el examen con espéculo para identificar y cuantificar especies específicas de *Lactobacillus* del microbioma vaginal que están asociados con la producción de H₂O₂. Por tanto, los procedimientos de qPCR descritos anteriormente se pueden usar para medir *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri* para estimar los niveles de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ en una paciente.

[0089] Alternativamente, el nivel de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ en una paciente se puede determinar usando el procedimiento de cultivo o el procedimiento de detección directa. El procedimiento de cultivo implica medir la producción de H₂O₂ mediante la semicuantificación de la intensidad de un pigmento azul formado cuando se inocula *Lactobacillus* en medio de tetrametilbencidina (TMB) y se incuba en condiciones anaeróbicas. Por ejemplo, la muestra extraída con hisopo de una paciente se procesa y se incuba en una placa de agar TMB durante aproximadamente 48 horas en condiciones anaeróbicas a 37 °C. A continuación, la placa de agar se expone al aire ambiente. La exposición al aire ambiente hace que el H₂O₂ producido por *Lactobacillus* reaccione con la peroxidasa de rábano picante en el agar para oxidar el TMB, lo que hace que las colonias de *Lactobacillus* se vuelvan azules con el tiempo. Ver, Antonio et al. The Journal of Infectious Diseases 1999; 180:1950-1956.

[0090] Las lecturas de la placa de agar se realizan 30 minutos después de la exposición al aire ambiente. Ver, Rabe y Hillier, Optimization of media for detection of H₂O₂ production by *Lactobacillus* species. J.Clin. Microbiol. 2003, 41(7): 3260-3264. El nivel de H₂O₂ producido se determina identificando la intensidad de la coloración azul según la siguiente escala semicuantitativa: (-) = falta de coloración de la colonia; (+/-) = coloración azul mínima de las colonias; (+) = coloración azul pequeña y limitada de las colonias; (+ +) = coloración azul grande pero incompleta de las colonias; y (+ + +) = coloración azul claramente visible y completa de las colonias. Ver, Strus, M. et al. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. Infect Dis Obstet Gynecol. Junio de 2005; 13 (2): 69-75. Una lectura de placa de (-), (+/-) o (+) después de 24 horas de exposición al aire se asocia con mucosa vaginal colonizada por niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂. Una lectura en placa de (+ +) o (+ + +) después de 24 horas de exposición al aire se asocia con mucosa vaginal colonizada por una cantidad suficiente de *Lactobacillus* spp protector.

[0091] El procedimiento de detección directa se puede utilizar para detectar *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ en la paciente usando tiras reactivas de peróxido disponibles comercialmente para la producción de H₂O₂ (por ejemplo, disponibles en EM Sciences o Merck). Se procesa una muestra tomada con hisopo de una paciente, se siembra en placas de agar MRS y se cultiva durante hasta 48 horas en condiciones anaeróbicas a 37 °C. A continuación, la placa de cultivo se expone al aire y la tira reactiva se coloca directamente encima de una colonia bacteriana. Se observa si la tira reactiva cambia de color. Si la tira reactiva se vuelve azul, hay *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂; si la tira reactiva no cambia de color, no hay *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂.

[0092] A una mujer diagnosticada con niveles bajos de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ y una microbiota diversa asociada con VB (es decir, la mucosa vaginal está colonizada por *L. iners* y diversas especies que no son *Lactobacillus* y subpoblada por *Lactobacillus* protectores productores de H₂O₂) utilizando cualquiera de los procedimientos de diagnóstico descritos anteriormente se le administrarán composiciones de bacteriocina y/o

antibióticos y/o composiciones bacterianas vivas tal como se describe a continuación.

Administración de composiciones de bacteriocinas

5 [0093] A una mujer diagnosticada con niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 (es decir, una puntuación de Nugent mayor o igual a 4) se le puede administrar por vía intravaginal una composición de bacteriocinas de la presente invención en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de *L. iners* y para promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ endógenos. En algunas realizaciones, disminuir los niveles de *L. iners* de la mucosa vaginal permite el crecimiento de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ endógenos. La composición de bacteriocinas se puede administrar en cualquier cantidad adecuada y durante cualquier duración adecuada para disminuir los niveles de *L. iners* y para promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ endógenos.

15 [0094] Tal como se describió anteriormente, las mujeres con niveles bajos de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ y cantidades significativas de *L. iners* y/o una cantidad significativa de organismos asociados a la VB (es decir, puntuación de Nugent de al menos 4) tienen VB, o tienen una mayor susceptibilidad a la VB en comparación con mujeres con niveles poblacionales relativamente altos de *Lactobacillus* spp. que producen H₂O₂. Además de ser más susceptibles a la VB, las mujeres que tienen niveles bajos de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ y cantidades significativas de *L. iners* y/o cantidades significativa de organismos asociados a la VB (es decir, puntuación de Nugent de al menos 4) tienen una mayor susceptibilidad a complicaciones ginecológicas y obstétricas asociadas a la VB, tales como P1D, transmisión de patógenos, tasas más altas de abortos espontáneos y parto prematuro (PP) y menores tasas de éxito al someterse a un tratamiento de fecundación *in vitro*. Por consiguiente, tratar a una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 con las composiciones de bacteriocinas descritas en el presente documento conduce a niveles reducidos de *L. iners* y promueve el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno, tratando o previniendo así la VB y las complicaciones ginecológicas y obstétricas asociadas.

30 [0095] Por lo tanto, las composiciones de bacteriocinas de la presente invención son útiles para la prevención o el tratamiento de la VB y las complicaciones ginecológicas y obstétricas asociadas, tales como P1D, transmisión de patógenos, aborto espontáneo, PP y fracasos en la FIV. Por tanto, en el presente documento se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir un trastorno ginecológico u obstétrico en una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 (es decir, una puntuación de Nugent mayor que o igual a 4), comprendiendo el procedimiento administrar por vía intravaginal a la paciente una composición de bacteriocinas de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y al menos un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, en donde: dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, tiene actividad bactericida selectiva contra *L. iners*; y dicho al menos un péptido aislado se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y un péptido aislado que tiene un 90 % de identidad de secuencia con uno de SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4, y en donde al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, se administra en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de *L. iners* y promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno, tratando o previniendo así el trastorno ginecológico u obstétrico. En algunas realizaciones, el trastorno es VB. En algunas realizaciones, el trastorno es PP. En algunas realizaciones, el trastorno es un fracaso en la FIV.

45 [0096] En algunas realizaciones, las composiciones de bacteriocinas de la presente invención se usan para tratar o prevenir la VB en una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4, en la que la composición se administra en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de *L. iners* y promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno, tratando o previniendo así la VB en la paciente. En algunas realizaciones, las composiciones de bacteriocinas de la presente invención se usan para prevenir el PP en una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 en donde la composición se administra en una cantidad suficiente para disminuir niveles de *L. iners* y promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno, previniendo así el PP en la paciente. En algunas realizaciones, las composiciones de bacteriocinas de la presente invención se usan para prevenir el fracaso de la IFV en una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 en la que la composición se administra en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de *L. iners* y promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno, evitando así el fracaso de la FIV en la paciente.

60 [0097] Tal como se describió en detalle anteriormente, las composiciones de bacteriocinas adecuadas para la administración intravaginal comprenden al menos un péptido de bacteriocina aislado, o una combinación de péptidos, seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y homólogos de los mismos, en una cantidad suficiente para que la composición en su conjunto muestre propiedades bactericidas *in vivo*. Tales composiciones de bacteriocinas se pueden administrar por vía intravaginal para disminuir los niveles de *L. iners* y promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginales endógenos productores de H₂O₂. En algunas realizaciones, las composiciones de bacteriocinas se administran por vía intravaginal en una dosis unitaria para disminuir los niveles de *L. iners* y para promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginales endógenos productores de H₂O₂.

65

[0098] La composición de bacteriocinas puede estar en cualquier formulación adecuada para administración intravaginal y, más específicamente, administración intravaginal tópica. Por ejemplo, la composición de bacteriocinas que tiene al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y al menos una dosis unitaria del péptido o combinación de péptidos, como se describe en el presente documento, puede administrarse como un gel, crema o como un supositorio óvulo vaginal. En algunas realizaciones, la composición de bacteriocinas se puede administrar 1 o 2 veces por día. En algunas realizaciones de la invención, la composición de bacteriocinas se puede administrar durante entre 2 y 7 días. En otras realizaciones, la composición de bacteriocinas se puede administrar durante 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días. En algunas otras realizaciones, la composición de bacteriocinas se puede administrar durante entre 2 y 7 días, o 3 y 6 días, o 4 y 5 días, o 4 y 7 días. En realizaciones particulares, la composición de bacteriocinas se puede administrar durante entre 2 y 7 días. En otra realización, la composición de bacteriocinas se puede administrar durante 7 días. En otra realización, la composición de bacteriocinas se puede administrar durante 5 días.

Administración de antibióticos

[0099] A una mujer diagnosticada con niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 (es decir, una puntuación de Nugent mayor o igual a 4) se le puede administrar al menos un antibiótico activo contra organismos asociados a VB en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de organismos asociados a VB (es decir, diversas especies que no son *Lactobacillus*), además de administrar intravaginalmente la composición de bacteriocinas como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, disminuir los niveles de *L. iners* y los niveles de diversas especies que no son *Lactobacillus* de la mucosa vaginal permite el crecimiento de *Lactobacillus* vaginales endógenos productores de H₂O₂. El antibiótico se puede administrar en cualquier cantidad adecuada y durante cualquier duración adecuada para reducir la cantidad de organismos asociados a VB. Los antibióticos adecuados para disminuir los niveles de organismos asociados a VB (es decir, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Leptotrichia amnionii*, *Eggerthella* y organismos dentro del Orden *Clostridiales*) son bien conocidos en la técnica. Dichos antibióticos incluyen, pero no se limitan a los mismos, clindamicina, metronidazol, secnidazol, tinidazol y VivaGel® (SPL-7013 o astodrímico sódico). Los antibióticos se pueden administrar individualmente o como terapia combinada. En algunas realizaciones, la administración de VivaGel® (SPL-7013, o astodrímico sódico), puede reducir tanto la cantidad de organismos asociados a VB como la cantidad de *L. iners*.

[0100] El antibiótico se puede administrar antes, simultáneamente o después de la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas. En algunas realizaciones, el antibiótico se administra antes de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas (es decir, el régimen de tratamiento con antibióticos se completa completamente antes de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas). En tales realizaciones, las diversas especies que no son *Lactobacillus* (es decir, organismos asociados a VB) que pueblan la vagina serán inhibidos primero por el antibiótico administrado, seguido por la inhibición de las especies de *Lactobacillus* menos protectoras, *L. iners*, debido a la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas. En otras realizaciones, el antibiótico se administra después de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas (es decir, el régimen de tratamiento intravaginal de la composición de bacteriocinas se completa completamente antes de administrar el antibiótico). En tales realizaciones, las especies de *L. iners* que pueblan la mucosa vaginal se inhiben mediante la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas, seguido de la inhibición de diversas especies que no son *Lactobacillus* (es decir, organismos asociados a la VB) que pueblan la vagina mediante la administración del antibiótico.

[0101] En algunas realizaciones, el antibiótico se puede administrar simultáneamente con la composición de bacteriocinas. La administración simultánea de dos agentes (es decir, un antibiótico y una composición de bacteriocinas) se refiere a la administración en la que el período de tiempo durante el cual se administra el primer agente se superpone o coincide con el período de tiempo durante el cual se administra el segundo agente. Además, para los fines de la presente invención, dos agentes que se administran simultáneamente se refiere a la administración simultánea de dos formulaciones separadas. Por ejemplo, un primer y un segundo agente se administran simultáneamente si el primer agente se administra una vez por semana durante cuatro semanas y el segundo agente se administra dos veces por semana durante las primeras tres de esas cuatro semanas. Asimismo, por ejemplo, un primer y un segundo agente se administran simultáneamente si el primer y el segundo agente se administran cada uno el mismo día una vez por semana durante cuatro semanas. Para mayor claridad, las composiciones de bacteriocinas combinadas de forma conjunta de la presente invención (es decir, composiciones de bacteriocinas que contienen un péptido, o una combinación de péptidos, que inhiben selectivamente *L. iners* y un antibiótico que inhibe diversas especies que no son de *Lactobacillus*) no es lo mismo que la administración simultánea de un antibiótico y una composición de bacteriocinas.

[0102] El régimen de tratamiento con antibióticos variará dependiendo del antibiótico particular que se esté administrando. El antibiótico para disminuir los niveles de organismos asociados a la VB en una mujer puede presentarse en cualquier forma adecuada para su administración. Por ejemplo, el antibiótico se puede administrar por vía tópica (como gel o crema), o como comprimido, cápsula o supositorio oral o vaginal. En algunas realizaciones, el antibiótico se administra como un comprimido oral o un gel tópico. En algunas realizaciones, el antibiótico se administra en forma de comprimido oral. En algunas realizaciones, el antibiótico se administra como un gel tópico.

[0103] En algunas realizaciones, el antibiótico se puede administrar 1 o 2 veces por día. En algunas realizaciones de la presente invención, el antibiótico se puede administrar durante entre 2 y 7 días. En otras realizaciones, el antibiótico se puede administrar durante 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días. En algunas otras realizaciones, el antibiótico se puede administrar durante entre 2 y 7 días, o 3 y 6 días, o 4 y 5 días, o 4 y 7 días. En realizaciones particulares, el antibiótico se puede administrar durante entre 2 y 7 días. En otra realización, el antibiótico se puede administrar durante 7 días. En otra realización, el antibiótico se puede administrar durante 5 días.

[0104] El antibiótico se puede administrar en cualquier dosis adecuada eficaz para disminuir los niveles de organismos asociados a VB en una mujer. En algunas realizaciones, el tratamiento con antibióticos se administra como un comprimido oral o como un supositorio óvulo intravaginal. La dosis del comprimido oral o del antibiótico en óvulo puede ser de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10.000 mg, o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2.000 mg, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.000 mg, o de aproximadamente 25 mg a aproximadamente 750 mg, o de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg. En algunas realizaciones, la dosis del comprimido oral u óvulo de antibiótico puede ser de aproximadamente 1 mg, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1200 mg. En algunas realizaciones, la dosis del comprimido oral u óvulo de antibiótico puede estar entre aproximadamente 50 mg y 300 mg.

[0105] En algunas realizaciones, la dosis de antibiótico del comprimido oral u óvulo puede ser de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal por paciente, o de 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, o 1000 mg/kg de peso corporal por paciente. En otras realizaciones, la dosis de antibiótico del comprimido u óvulo oral puede ser de aproximadamente 0,1 a 1000 mg/kg de peso corporal por paciente, o de aproximadamente 0,5 a 750, o de aproximadamente 1 a 500, o de aproximadamente 5 a 250, o de aproximadamente 10 a 100, o de aproximadamente 25 a 50 mg/kg de peso corporal por paciente. En aun otra realización, la dosis de antibiótico del comprimido u óvulo oral puede estar entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal por paciente, o entre aproximadamente 5 y 15 mg/kg de peso corporal por paciente, o entre aproximadamente 8 y aproximadamente 12 mg/kg de peso corporal por paciente, o de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por paciente.

[0106] En algunas realizaciones, el tratamiento con antibióticos se administra como un gel tópico en una dosis de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2 % de la formulación de gel total, o de aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 1,75 %, o de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 1,25 %, o de aproximadamente 0,75 % a aproximadamente 1 %. Las dosis adecuadas para el gel tópico de antibiótico incluyen aproximadamente 0,1 %, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o 2 %. En algunas realizaciones, la dosis del gel tópico de antibiótico es de aproximadamente el 0,75 %. En otras realizaciones, la dosis del gel tópico de antibiótico es de aproximadamente el 1,0 %.

Administración de *Lactobacilos Productores de H₂O₂*

[0107] En algunos casos, las pacientes que han recibido tratamiento para una microbiota diversa asociada con VB (es decir, administración intravaginal de composiciones de bacteriocinas con o sin la administración de antibióticos) todavía pueden tener niveles bajos de *Lactobacillus vaginal* productor de H₂O₂. En tales casos, la paciente carece de una cantidad suficiente de *Lactobacillus vaginal* endógeno viable que produzca H₂O₂ para recolonizar la mucosa vaginal, aunque las poblaciones de *L. iners* de la mucosa vaginal se han reducido mediante la administración de la composición de bacteriocinas, o tanto las poblaciones de *L. iners* como diversas especies que no son *Lactobacillus* de la mucosa vaginal se han reducido mediante la administración de la composición de bacteriocinas y la administración de un antibiótico. Por lo tanto, se puede administrar una composición bacteriana viva como un régimen de tratamiento adicional para aumentar los niveles de *Lactobacillus vaginal* productor de H₂O₂ en una mujer.

[0108] En algunas realizaciones, a una mujer diagnosticada con niveles bajos de *Lactobacillus vaginal* productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4 (es decir, una puntuación de Nugent mayor o igual a 4) se le puede administrar una composición bacteriana viva que comprende *Lactobacillus vaginal* productor de H₂O₂ en una cantidad suficiente para promover el crecimiento de *Lactobacillus vaginal* productor de H₂O₂ administrado, además de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas como se describió anteriormente. En algunas realizaciones, se puede administrar una composición bacteriana viva que comprende *Lactobacillus vaginal* productor de H₂O₂, además de administrar un antibiótico y administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas como se describió anteriormente.

[0109] La composición bacteriana viva se puede administrar en cualquier cantidad adecuada y durante cualquier duración adecuada para promover el crecimiento de *Lactobacillus vaginal* productor de H₂O₂ administrado. Las composiciones bacterianas vivas adecuadas para administración contienen al menos una cepa de *Lactobacillus vaginal* vivo productor de H₂O₂, tal como, por ejemplo, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, o una especie de *Lactobacillus* que tiene una homología de secuencia del 95 % con la secuencia del gen ARNr 16S de cualquiera de las especies identificadas. Las cepas de lactobacilos particularmente preferidas son cepas que tienen todas las características identificativas de la cepa CTV-5 de *Lactobacillus crispatus* o la cepa SJ-3C de *Lactobacillus crispatus*. Los procedimientos para obtener y preparar composiciones bacterianas vivas que comprenden cepas vivas de *Lactobacillus* vaginales productores de H₂O₂ se describen en detalle en las Solicitudes de patente de Estados Unidos Nos. 62/529,733 y 62/529,756.

[0110] La composición bacteriana viva se puede administrar antes, simultáneamente o después de la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas descrita anteriormente. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas (es decir, el régimen de tratamiento de la composición de bacteriocinas intravaginal se completa completamente antes de administrar la composición bacteriana viva). En tales realizaciones, las especies de *L. iners* que pueblan la mucosa vaginal son inhibidas mediante la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas, seguido de la promoción del crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ administrado mediante la administración de la composición bacteriana viva. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra simultáneamente con la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas.

[0111] En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se puede administrar antes, simultáneamente con o después de administrar un antibiótico y de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas, tal como se describe en detalle anteriormente. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas y después de administrar el antibiótico (es decir, el régimen de tratamiento intravaginal de la composición de bacteriocinas y el régimen de tratamiento con antibióticos se completan completamente antes de administrar la composición bacteriana viva). En tales realizaciones, las especies *L. iners* y diversas especies que no son *Lactobacillus* que pueblan la mucosa vaginal son inhibidas mediante la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas y el antibiótico, respectivamente, seguido de la promoción del crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ administrado mediante la administración de la composición bacteriana viva. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra simultáneamente con la administración intravaginal de la composición de bacteriocinas. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra simultáneamente con el antibiótico y después de administrar por vía intravaginal la composición de bacteriocinas.

[0112] La composición bacteriana viva se puede administrar 1 o 2 veces por día. En algunas realizaciones, la administración de la composición bacteriana viva es durante los últimos días del régimen de administración intravaginal de la composición de bacteriocinas (es decir, de 2 a 4 días antes de completar el régimen de administración intravaginal de la composición de bacteriocinas). En algunas realizaciones, la administración de la composición bacteriana viva es durante los últimos días del régimen de administración de un antibiótico (es decir, de 2 a 4 días antes de completar el régimen de administración de un antibiótico). En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de que la composición de bacteriocinas se haya administrado por vía intravaginal durante 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de que se haya administrado un antibiótico durante 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de que la composición de bacteriocinas se haya administrado por vía intravaginal durante aproximadamente 7 días. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de que se haya administrado un antibiótico durante aproximadamente 7 días. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de que la composición de bacteriocinas se haya administrado por vía intravaginal durante al menos 5 días. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se administra después de que se haya administrado un antibiótico durante al menos 5 días.

[0113] La composición bacteriana viva se administra a entre 10⁸ UFC y 10¹¹ UFC por dosis, o entre 10⁸ UFC y 10¹⁰ UFC por dosis. En otras realizaciones, la composición bacteriana viva se administra a una dosis de al menos 10⁹ UFC por día. La composición bacteriana viva se administra en dosis de entre aproximadamente 100 mg y 600 mg, o de aproximadamente 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 550 mg. En otras realizaciones, la composición bacteriana viva se puede administrar en dosis de entre aproximadamente 150 mg y 450 mg, o entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 400 mg, o entre aproximadamente 150 mg y aproximadamente 350 mg. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se puede administrar en dosis de entre aproximadamente 150 mg y 250 mg. En una realización particular, la composición bacteriana viva se puede administrar en una dosis de aproximadamente 200 mg. En algunas realizaciones, la composición bacteriana viva se puede administrar como una composición en polvo seco.

V. EJEMPLOS

[0114] Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Ejemplo 1. Identificación y caracterización de bacteriocinas.

[0115] Este ejemplo detalla la estrategia general para obtener y caracterizar las bacteriocinas útiles en las composiciones de bacteriocinas de la presente invención, que implica cultivo bacteriano, extracción y purificación de bacteriocinas, ensayos de actividad de bacteriocinas e identidad y caracterización de bacteriocinas. El procedimiento aquí descrito para el cultivo de *L. paragasseri* K7 y la purificación de sus bacteriocinas (Gask7A y Gask7B), es aplicable para cualquier microorganismo adecuado para su uso con la presente invención.

(i) *Cepas bacterianas, medios de crecimiento y condiciones de crecimiento.*

[0116] La cepa K7 de *Lactobacillus paragasseri* se obtuvo de la Universidad de Ljubljana bajo pedido. Se aislaron cepas adicionales de *Lactobacillus*, en las que se analizó su actividad antimicrobiana, de voluntarias sanas y se depositaron en una colección de cepas interna. Las especies analizadas para determinar su actividad incluyeron *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. (para)gasseri*. La cepa indicadora, *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 y las bacterias habitualmente asociadas con la disbiosis vaginal (o BY) se obtuvieron de colecciones de cepas públicas (por ejemplo, ATCC, CCUG y BEI/NIH) y de una colección de cepas interna. Todas las cepas de *Lactobacillus*, excepto *L. iners* y *Enterococcus faecalis* se cultivaron en medio Man Rogosa Sharp (MRS) (caldo o agar, Difco) a 37 °C bajo 5 % de CO₂. *L. iners* se cultivó en placas de agar Columbia (Hardy diagnostics) o en caldo NYC III (ATCC 1685) a 37 °C en atmósfera anaeróbica (Gas pack). *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Fingoldia* y *Prevotella* se cultivaron anaeróticamente a 37 °C en placas de agar chocolate (Hardy diagnostics) o en caldo NYC III. *Streptococcus agalactiae* (grupo B) ATCC 13813, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus* se cultivaron en condiciones microaerófilas en medios de infusión cerebro-corazón (BHI) (caldo y agar) a 37 °C. *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 se cultivó en MRS a 30°C. Todas las cepas se mantuvieron como reservas congeladas a -80 °C en sus respectivos medios de cultivo con glicerol al 15-20 % (v/v).

(ii) *Ensayos de bacteriocinas.*

[0117] La actividad de bacteriocinas en sobrenadantes de cultivos libres de células (CFCS) de cultivos de una noche (16 horas a 37 °C) de las diferentes cepas de *Lactobacillus* se ensayó usando un ensayo de dilución crítica, tal como se describió anteriormente (Holo *et al* 1991; Matijašić *et al* , 1998) utilizando *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 y/o *L. iners* HM-702 como cepas indicadoras. En general, cada pocillo de una placa de 96 pocillos contenía 200 µl de medio de crecimiento, bacteriocina en diluciones dobles y el organismo indicador (dilución de 10³ veces de un cultivo de una noche). Los cultivos en placas de 96 pocillos se incubaron durante la noche (16-24 horas) a temperaturas y atmósfera apropiadas, seguido de medir la inhibición de la cepa indicadora espectrofotométricamente a 600 nm utilizando un lector de placas Cytation (BioTek). La actividad de bacteriocina para sobrenadantes de cultivos libres de células (CFCS) de *L. paragasseri* K7, utilizando *L. iners* HM-702 como cepa indicadora, oscilaron entre aproximadamente 512 y 1024 UB/ml. Una unidad de bacteriocina (UB) se definió como la cantidad de bacteriocina que inhibía el crecimiento de la cepa indicadora en un 50 %, en comparación con la densidad óptica del control (solo medio de crecimiento). Las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) para las bacteriocinas purificadas se determinaron utilizando el mismo ensayo de dilución crítica.

(iii) *Cribado de cepas de Lactobacillus para detectar actividad antimicrobiana.*

[0118] Las cepas de *Lactobacillus* de origen humano (vaginal y fecal) pertenecientes a las especies *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. (para)gasseri* fueron examinadas para detectar actividad antibacteriana que antagoniza especies bacterianas comúnmente asociadas con un microbioma vaginal disbiótico. Las cepas indicadoras inicialmente ensayadas pertenecen a las especies *Gardnerella vaginalis* (CCUG 44006, clado 1), *Atopobium vaginae* (CCUG 44116) y *Lactobacillus iners* HM-702. *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 se incluyó en el cribado debido a su sensibilidad a bacteriocinas de diferentes clases. Tres de las cepas de *L. crispatus* mostraron actividad contra *L. sakei* subsp. *sakei* en el ensayo de dilución crítica. Ninguna de las cepas de *L. jensenii* mostraron actividad contra *L. sakei* subsp. *sakei* en el ensayo de dilución crítica. De las tres cepas de *L. crispatus* que muestran actividad contra *L. sakei* subsp. *sakei*, ninguna de ellas mostró inhibiciones de las cepas asociadas a VB.

[0119] Después de que los CFCS de 78 cepas de *Lactobacillus* se examinaran frente a *L. iners*, incluidas 29 cepas de *L. crispatus*, 27 de *L. (para)gasseri* y 22 de *L. jensenii*, solo se descubrieron tres aislados (4 %) con actividad detectable contra *L. iners* HM-702. Entre ellas se encontraban dos cepas vaginales, *L. gasseri* 105-1 y *L. paragasseri* JV- V03 y *L. paragasseri* K7 de origen intestinal (fecal). La actividad de *L. paragasseri* K7 (5120 unidades de bacteriocina/ml, UB/ml) contra *L. iners* fue significativamente mayor que la producida por *L. gasseri* 105-1 (160 UB/ml) o *L. paragasseri* JV- V03 (40 UB/ml) a pesar de que los sobrenadantes se derivaron de cultivos de densidad celular y pH comparables. Se determinaron los espectros inhibidores para el sobrenadante de *L. paragasseri* K7 frente a un panel más grande de patógenos vaginales importantes (Tabla 4). El sobrenadante de K7 inhibió el 100 % de las cepas de *L. iners* analizadas (11) y mostró una inhibición débil del 17 % de las cepas de *Gardnerella vaginalis* (N = 12). Además, el sobrenadante del cultivo K7 inhibió *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813, el 100 % de *Enterococcus faecalis* (11), 2 de 3 *Staphylococcus aureus* y *Fingoldia* spp. No se observó inhibición para *Listeria monocytogenes* (6) o *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305.

[0120] También se analizó el sobrenadante concentrado de *L. paragasseri* K7 (fracción Amberlite XAD-16) frente a un panel de las 3 especies vaginales de *Lactobacillus* más importantes (Tabla 5). Si bien CFCS de *L. paragasseri* K7 inhibió las 11 cepas de *L. iners* analizadas (ver arriba), no inhibió la mayoría de las cepas de especies de *Lactobacillus* vaginales protectoras (Figura 1). De las 26 cepas de *L. (para)gasseri* analizadas, cinco cepas (19 %) fueron inhibidas por el CFCS de K7 en el ensayo de dilución crítica, mientras que cinco de 22 cepas de *L. jensenii* (23 %) y tres de 29 cepas de *L. crispatus* (10 %) fueron sensibles. Estos resultados indicaron que la actividad antimicrobiana producida por *L. paragasseri* K7 inhibía selectivamente a *L. iners*, aportando al mismo tiempo la mayoría de las cepas de *Lactobacillus* vaginales beneficiosas.

Tabla 4. Espectro inhibidor de sobrenadante de cultivo libre de células de *L. paragasseri* K7 frente a diferentes patógenos en un ensayo de CMI

Especie bacteriana	Cepa	Fuente ^a	Sensibilidad ^b
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	15521	ATCC	+++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-126	BEI	+
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-131	BEI	++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-701	BEI	+
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-702	BEI	+++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-703	BEI	++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-704	BEI	++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-705	BEI	++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-706	BEI	++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-707	BEI	++
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-708	BEI	++
<i>Lactobacillus iners</i>	55195	ATCC	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	15305	ATCC	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	ATCC	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	51651	ATCC	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	ATCC	+
<i>Staphylococcus agalactiae</i>	13813	ATCC	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	19155	ATCC	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NR-13234	BEI	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NR-13237	BEI	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	HM-1048	BEI	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NR-4098	BEI	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	NR-110	BEI	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	101-1	Osel	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31884	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31970	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31971	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31972	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31973	BEI	++
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31975	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31979	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	NR-31990	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	HM-200	BEI	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	HM-201	BEI	+
<i>Gardnerella vaginalis</i>	#9 (clado 3) ³	Osel	+
<i>Gardnerella vaginalis</i>	#2 (clado 4)	Osel	+
<i>Gardnerella vaginalis</i>	44005 (clado 4)	CCUG	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	44006 (clado 1)	CCUG	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	HM-1108 (clado 1)	BEI	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	HM-1109 (clado 1)	BEI	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	HM-1115 (clado 2)	BEI	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	HM-1112 (clado 2)	BEI	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	HM-133 (clado 1)	BEI	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	HM-1110 (clado 2)	BEI	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	HM-1105 (clado 4)	BEI	-
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14018	ATCC	-
<i>Atopobium vaginae</i>	44116	CCUG	-
<i>Fingoldia</i> spp.		Osel	+
<i>Preveotella</i> spp.		Osel	-

^a ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo; BEI: Repositorio de recursos de investigación sobre biodefensa e infecciones emergentes (NIH); CCUG: Colección de Cultivos de la Universidad de Gotemburgo; Osel: aislados clínicos de la colección de cepas de Osel. ^b -: < 20 UB/ml; + : 20-100 UB/ml; ++: 101-500 UB/ml; +++: > 500 UB/ml. ^c Los clados de *Gardnerella vaginalis* se determinaron tal como se describe en Balashov, S. et al. *J Med Microbiol.* **2014**, 63, 162-75.

5 **Tabla 5.** Espectro inhibidor de bacteriocinas parcialmente purificadas de *L. paragasseri* K7 frente a *Lactobacillus*

ES 2 980 222 T3

vaginales beneficiosos en un ensayo de CMI

Especie bacteriana	Cepa	Fuente ^a	Sensibilidad ^b
<i>Lactobacillus crispatus</i>	CTV-05	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	MV-1A	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	MV-4A	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	MV-7A	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	MV-9B	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	MV-12A	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	178-1	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	125-2	Osel	++
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SJ-3C	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SJ-2B	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SJ-12D	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SJ-10F	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SJ-1G	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	SJ-6F	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	228-1	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	231	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	182-1 A	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	187-3B	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	210-4	Osel	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	219-1	Osel	++
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-103	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-370	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-419	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-420	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-421	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-423	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-375	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	HM-373	BEI	-
<i>Lactobacillus crispatus</i>	60	ATCC	++
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1153	Osel	++
<i>Lactobacillus jensenii</i>	MV-9A	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	MV-6A	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	MV-5A	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SV-13B	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SV-12B	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SV-10C	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SV-15A	Osel	+++
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SV-6C	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SJ-16D	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SJ-5D	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	7A	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SJ-19A	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	MV-27C	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	236-1	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	237-1A	Osel	++
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SJ-11A	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	SJ-15A	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	211-2	Osel	++
<i>Lactobacillus jensenii</i>	221-2B	Osel	++
<i>Lactobacillus jensenii</i>	232-1B	Osel	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	235	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	105-1	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	151-2	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	MV-10B	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	MV-10A	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SV-16A	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SV-16B	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	31-3	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	175-1	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	182-LB	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	9-1	Osel	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	167-1A	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	144-1	Osel	+

<i>Lactobacillus gasseri</i>	167-1B	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	37-4	Osel	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SJ-9E	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SV-19B	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	SV-8A	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1151	Osel	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	HM-398	BEI	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	HM-1278	BEI	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	HM-404	BEI	++
<i>Lactobacillus gasseri</i>	HM-409	BEI	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	HM-407	BEI	-
<i>Lactobacillus gasseri</i>	HM-410	BEI	-
<i>Lactobacillus paragasseri</i>	HM-104 (JV-V03)	BEI	+
<i>Lactobacillus iners</i>	HM-702	BEI	+++

^a -: < 40 UB/ml; +: 40-100 UB/ml; ++: 101-500 UB/ml; +++ : > 500 UB/ml

(iv) Experimentos de cocultivo con *L. iners* y *L. paragasseri* K7.

5 [0121] Debido a que *L. paragasseri* K7 fue la cepa de *Lactobacillus* que mostró la mayor actividad inhibidora
 10 contra *L. iners* HM-702, según lo determinado a partir de las pruebas de detección de actividad antimicrobiana
 15 descritas anteriormente, *L. paragasseri* K7 se cocultivó con *L. iners* para realizar más pruebas de actividad. *L.*
paragasseri K7 (~5 x 10³ UFC/ml) se coinoculó con *L. iners* HM-702 (~1 x 10⁶ UFC/ml) en 5 ml de caldo (1:1 (v/v) de
 MRS y NYC III ATCC 1685). Como controles, *L. iners* HM-702 y *L. paragasseri* K7 se cultivaron solos con medios
 acondicionados (pH 3,8, mismo volumen que el inóculo). Los cultivos inoculados se incubaron a 37 °C en un frasco
 anaeróbico durante 24 horas, y se sembraron diluciones seriadas de los cultivos por triplicado en placas de agar (MRS
 para *L. paragasseri* K7, agar Columbia para *L. iners* HM-702). Tanto *L. paragasseri* K7 como *L. iners* HM-702
 crecieron en agar Columbia, pero las especies se distinguieron fácilmente debido al tamaño y morfología de las
 colonias formadas. El crecimiento de *L. iners* HM-702 y *L. paragasseri* K7 se midió mediante recuento en placa en
 MRS y agar sangre. Tal como se muestra en la Figura 2, el crecimiento de *L. iners* fue inhibido cuando se cocultivó
 con *L. paragasseri* K7. La cantidad de *L. iners* HM-702 en el experimento de cocultivo no se pudo cuantificar con
 precisión en el punto de tiempo de 24 horas debido al crecimiento excesivo de *L. paragasseri* K7 en las placas de agar
 sangre, pero se determinó que estaba por debajo de 2x10⁶ UFC/ml (Figura 2).

(v) Modo de acción de la actividad antimicrobiana.

20 [0122] Dado que un inhibidor de *L. iners* nunca había sido descrito antes, la actividad se caracterizó además de la
 siguiente manera. Se diluyeron cultivos de una noche de *L. iners* HM-702 en medio de crecimiento NYC III fresco hasta
 una concentración de aproximadamente 10⁴-10⁵ UFC/ml. Se añadió una fracción de bacteriocina semipurificada
 (eluato de Amberlite XAD-16 en 2-propanol y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % (v/v) y el cultivo se incubó
 25 anaeróticamente a 37 °C. Se incluyó un control con 2-propanol y TFA sin bacteriocina. Se probaron tres
 concentraciones diferentes de bacteriocina (40, 100 y 1000 UB/ml) y se determinó el número de bacterias viables
 mediante dilución y siembra en placas de sangre Columbia (Hardy) a intervalos de tiempo apropiados. Cada dilución
 se sembró por triplicado. Las figuras 3 y 4 muestran los resultados de la actividad de inhibición de *L. iners*.

30 [0123] La actividad contra *L. iners* se recuperó en las fracciones de filtrado y retenido de columnas de centrifugación
 con límites de peso molecular de 100, 30, 10 y 3 kDa, lo que indica que el inhibidor era una proteína o péptido pequeño
 que se une a otras moléculas más grandes en el medio acondicionado. La actividad podía concentrarse mediante
 precipitación con sulfato de amonio o mediante absorción en Amberlite XAD, y la actividad podía eluirse de la resina
 de Amberlite con isopropanol, lo que sugiere que el inhibidor era una proteína/péptido hidrófobo. Tal como se muestra
 35 en la figura 3, las bacteriocinas K7 semipurificadas destruyeron *L. iners* HM-702 a 40 UB/ml en 24 horas, lo que indica
 que la actividad del inhibidor era bactericida, en lugar de bacteriostática. Las bacteriocinas K7 semipurificadas también
 destruyeron a *L. iners* HM-702 a 100 UB/ml y 1000 UB/ml en 24 horas, e inhibieron aún más el
 crecimiento de *L. iners* durante 24 horas adicionales, tal como se muestra en la Figura 4.

40 [0124] Los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana también indicaron que el factor inhibidor presente en
 el medio acondicionado con células (pH 3,8) no se perdió tras la neutralización del medio (pH 7, NaOH). Se ajustó un
 control de medio de crecimiento (MRS) a pH 3,8 utilizando ácido láctico y su inhibición de *L. iners* HM-702
 (concentración inicial de 1 x 10⁵ UFC/ml) se comparó con la del sobrenadante del cultivo de *A. paragasseri* K7 en el
 ensayo de dilución crítica. Después de 24 horas de incubación anaeróbica a 37 °C, las lecturas de densidad óptica de
 45 las muestras de sobrenadante de K7 mostraron una inhibición del indicador 128 veces mayor que la del medio de
 crecimiento de control con pH bajo. Además, el inhibidor (bacteriocinas GasK7) era sensible a la tripsina y la proteinasa
 K, lo que era otro indicio de que el inhibidor era una proteína o un péptido. Sin embargo, debido a que la actividad no
 era sensible al calor, se determinó que el inhibidor no era una proteína grande. Estas características son consistentes
 con las de una bacteriocina: péptidos hidrófobos pequeños que, en la mayoría de los casos, forman poros en las
 50 membranas de las células diana.

(vi) Purificación de bacteriocinas.

[0125] Una vez confirmada y caracterizada la actividad de la bacteriocina contra *L. iners*, las bacteriocinas de *L. paragasseri* K7 se purificaron para su posterior análisis y caracterización. Las bacteriocinas se purificaron a partir de 500 ml de sobrenadante de cultivo libre de células de *L. paragasseri* K7 cultivado en caldo MRS (Difco) durante 18 horas a 37 °C. Las células se extrajeron mediante centrifugación (8.000 xg, 30 minutos a 4 °C), se filtraron de forma estéril (filtro de 0,2 µm) y se añadieron a 30 g de Amberlite XAD-16 (Sigma). La suspensión se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente (100 rpm, plataforma agitadora), se decantó para separar el sobrenadante de la resina y se lavó con etanol al 40 % (500 ml, 1 hora a temperatura ambiente). La actividad antimicrobiana se eluyó añadiendo 150 ml de 2-propanol con 0,1 % (v/v) de TFA después de agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. El eluato de Amberlite XAD-16 se filtró de forma estéril (filtro de 0,2 µm), se diluyó 10 veces en H₂O con 0,1 % (v/v) de TFA y se cargó en una columna de fase inversa (Resource RPC, 1 ml, GE Healthcare) conectada a un sistema de purificación de proteínas Äkta (GE Healthcare). Las bacteriocinas se eluyeron de la columna con un gradiente lineal de 2-propanol en agua (40-60 %, con 0,1 % de TFA). Las fracciones con actividad antimicrobiana se volvieron a procesar en RPC con gradientes ajustados de 2-propanol hasta que se obtuvieron proteínas puras según lo indicado por SDS-PAGE. Los pesos moleculares de las bacteriocinas purificadas se determinaron utilizando un espectrómetro de masas Bruker Autoflex (TOF). Este procedimiento de purificación de 2 etapas dio como resultado >90 % de pureza de una población de proteínas pequeñas con >90 % de recuperación de actividad. Tal como se muestra en las Figuras 5A y 5B, las fracciones 24 y 25 del cromatograma RPC correspondieron a Gask7B α purificada, tal como indica la SDS-PAGE correspondiente.

[0126] Las concentraciones de las bacteriocinas Gask7 purificadas se determinaron a partir de geles SDS-PAGE, comparando la intensidad de las bandas de proteínas con las bandas de un patrón de concentraciones conocidas (determinadas a 280 nm, Nanodrop). Se utilizó el analizador de gel digital Azure c300 para capturar las imágenes de gel SDS-PAGE y se utilizó el software Azure Spot para la cuantificación (Azure Biosystems, CA). La actividad de bacteriocina de las bacteriocinas Gask7 purificadas se probó directamente en los geles SDS-PAGE (NuPage, 4-12 % bis-Tris, Life Technologies). Se lavó un gel no teñido con bacteriocina purificada en agua estéril (100 ml) durante 2 horas antes de transferirlo a una placa de agar BHI. Se vertió una capa indicadora de 5 ml de agar blando NYC III (0,7 % de agar) que contenía ~ 1 x 10⁶ ufc/ml de *L. iners* HM-702 o *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 sobre el gel. La placa de agar se incubó anaeróticamente a 37 °C durante 24 horas y se examinó en busca de zonas de inhibición del crecimiento. La Figura 6 muestra el tamaño, la pureza y la actividad de los tres péptidos purificados de *L. paragasseri* K7 (K7A α, K7B α y K7B β) desarrollados en gel de SDS-PAGE reductor. Los tres péptidos se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y se determinaron las masas moleculares.

[0127] La actividad inhibidora máxima coincidió con varias bandas de proteínas pequeñas de ~5 kDa que se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se muestra en la Figura 6. La mayor actividad anti-*L. iners* residía en una proteína con una masa de 5512, correspondiente al componente α de *L. paragasseri* K7B (figura 7). Un pico menor de actividad correspondió al componente K7B β con una masa de 4762 (Figura 8). El componente K7B β parecía ser el péptido complementario de la bacteriocina K7B, mientras que el componente K7B α era el péptido activo de la bacteriocina. Una proteína correspondiente al componente K7A α de la bacteriocina K7A con una masa de 6091 (Figura 9) también fue identificada. El componente K7A β, con una masa molecular esperada de 5523 Da, no fue identificado ni purificado a partir del sobrenadante de K7 en este estudio.

[0128] Cada uno de los tres péptidos purificados del sobrenadante de *L. paragasseri* K7 fue activo contra *L. triers* HM-702 y *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521. En general, *L. iners* era aproximadamente 10 veces menos sensible a los péptidos que *L. sakei* subsp. *sakei*. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitoras (CMI) para los tres péptidos, individualmente y en diferentes combinaciones, frente a las dos cepas indicadoras, tal como se muestra en la Tabla 6. Gask7B α fue el péptido más potente y destruyó *L. iners* con una CMI de 25 ng/ml (5 nM). El péptido Gask7B β fue considerablemente menos activo que Gask7B α contra ambas cepas, con una CMI > 100 ng/ml para *L. iners*. La combinación de los péptidos Gask7B α y Gask7B β juntos en una proporción de aproximadamente 1:1 (p/p) aumentó la actividad >10 veces contra *L. iners*, reduciendo la CMI a menos de 2 ng/ml (~400 pM para cada péptido), mostrando así la actividad sinérgica representada por los dos péptidos de la bacteriocina K7B (Tabla 6). El péptido Gask7A α también mostró actividad contra *L. iners* (CMI 75 ng/ml, 12 nM), aunque menos potente que la actividad de K7B α. Se observó un modesto aumento en la actividad cuando Gask7A α se combinó con Gask7B β (CMI 50 ng/ml), mientras que la combinación de los péptidos Gask7A α y Gask7B α dio como resultado una actividad similar a Gask7B α solo (CMI 25 ng/ml).

Tabla 6. CMIs de bacteriocinas purificadas, solas y combinadas, frente a *L. iners* HM-702 y *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 determinadas en el ensayo de dilución crítica. La proporción de péptidos fue de aproximadamente 1:1 (p/p), a menos que se indique lo contrario.

Péptido o péptidos de bacteriocinas	<i>L. iners</i> HM-702	<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> ATCC 15521
	CMI (ng/ml)	CMI (ng/ml)
Gask7A α	75	9,4

GasK7A β *	> 4000	> 4000
GasK7A α + GasK7A β *	ND ^a	2,3 ^b
GasK7B α	25	1,6
GasK7B β	> 100	2
GasK7B α + GasK7B β	1,6	0,3
GasK7A α + GasK7B β	50	3,1
GasK7A α + GasK7A α	25	3,1
GasK7A α + GasK7B α + GasK7B β	2,1	0,1

*Expresado y aislado de *E. coli* Shuffle. ^a No determinado. ^b GasK7A β de *E. coli* utilizado a 135 ng/ml.

[0129] Para recapitular, entre las cepas de *Lactobacillus* vaginales, se encontró que las bacteriocinas K7 eran selectivas para las cepas de *L. iners*. Todas las cepas de *L. iners* analizadas (N = 11) fueron sensibles al medio acondicionado de *L. paragasseri* K7 y a las bacteriocinas semipurificadas. Los resultados de los ensayos de dilución crítica mostraron que, en comparación con *L. iners*, las cepas vaginales de *L. (para)gasseri* (N = 26), *L. crispatus* (N = 29) y *L. jensenii* (N = 22) fueron menos sensible a las bacteriocinas GasK7. De las cepas de *L. jensenii*, el 78 % eran insensibles a la bacteriocina, en comparación con el 90 % de las cepas de *L. crispatus* y el 81 % de las cepas de *L. (para)gasseri*. *L. crispatus* CTV-05 utilizado en LACTIN-V fue insensible a las bacteriocinas K7 en el sobrenadante de cultivo libre de células.

(vii) Expresión heteróloga de los péptidos GasK7B α y K7A β en *E. coli*.

[0130] La secuencia del genoma de *L. paragasseri* K7 está disponible públicamente en el Joint Genome Institute (genoma IMG n.º 2561511119) y GenBank (ASRG02000000). Las secuencias de ADN para los genes de bacteriocina del péptido GasK7A β (ASRG02000001, región 43880-44089) y el péptido GasK7B α (ASRG02000002, región 112159-112386), sin los péptidos señal de secreción de doble glicina, se clonaron en dirección 3' y en marco con la proteína de unión a maltosa (MBP) utilizando el vector de expresión pMAL-c5X para la expresión citoplasmática (New England Biolabs). Los cebadores utilizados para la amplificación de los genes de bacteriocina son K7B alpha_MAL_F: K7B alpha_F 5'-agaaataattgggctgctaata-3' y K7B alpha_MAL_Sbfl_R 5'-ttttaag cctgcagg attccctacttct-3', K7A_beta_F: 5'-acaacgtaattgggtag-3' y _beta_Sbfl_R: 5'ttactatccatattccctgcaggtagtctcttt-3'.

[0131] La PCR se llevó a cabo en reacciones de volumen de 50 μ l usando la mezcla de reacción Accuprime Pfx 10x, cebadores a 500 nM, 1 % (v/v) de ADN polimerasa Pfx (Thermo Fisher) y 50 ng de ADN genómico (ADNg) de *L. paragasseri* K7. La temperatura de hibridación fue de 53 °C durante 20 segundos, seguida de un alargamiento a 68 °C durante 30 segundos. Los plásmidos se construyeron según lo recomendado por el fabricante, se verificaron mediante secuenciación de ADN (MCLAB, Ca, EE. UU.) y se transformaron en cepas deficientes en proteasa *E. coli* ER2523 y *E. coli* Shuffle para la expresión (New England Biolabs, MA). De forma resumida, se cultivaron células de *E. coli* con los plásmidos correctos en caldo Luria Bertani (LB) + ampicilina 100 μ g/ml + glucosa al 0,2 % (p/v) hasta que la densidad óptica alcanzó 0,5 (600 nm). Las proteínas de fusión se indujeron con IPTG 0,3 mM durante 2 horas a 37 °C y 250 rpm y se recuperaron de las fracciones citoplasmáticas o periplásmicas, tal como lo describe el fabricante.

[0132] A continuación, las proteínas de fusión se purificaron en una columna de amilosa (MBP Hi-Trap, GE Healthcare) usando un sistema de purificación de proteínas Äkta Prime Plus (GE Healthcare). La columna se equilibró con Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM y EDTA 1 mM (tampón A), la muestra de proteína se diluyó en el mismo tampón y se cargó en la columna. Las proteínas de fusión MBP-bacteriocina se eluyeron en maltosa 10 mM en tampón A (tampón B). Las proteínas de fusión purificadas se escindieron durante la noche a temperatura ambiente en tampón B con Factor Xa (1 % p/p) y las bacteriocinas se purificaron mediante cromatografía de fase inversa, tal como se describió anteriormente. La actividad de las bacteriocinas expresadas en *E. coli* se probó en el ensayo de dilución crítica contra *L. iners* HM-702 y *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521. Los tamaños de las bacteriocinas se verificaron mediante SDS-PAGE.

[0133] El péptido de bacteriocina GasK7A β no se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de *L. paragasseri* K7 usando los procedimientos descritos aquí o publicados por Bogovic Matijašić para la acidocina LF221 A (similar a GasK7A β). Para determinar si el péptido GasK7A β podía contribuir potencialmente a la inhibición general de *L. iners* por K7, el péptido se expresó como una proteína de fusión en *E. coli* Shuffle, una cepa diseñada para promover la formación de puentes disulfuro en el citoplasma. La bacteriocina madura, sin su péptido líder de doble glicina previsto, se clonó en dirección 3' y en marco con la proteína de unión a maltosa en el vector pMAL-c5x para la expresión citoplasmática y se produjo una proteína de fusión del tamaño esperado (48 kDa) después de la inducción con IPTG (no se muestra). La proteína de fusión se purificó y el péptido GasK7A β se obtuvo mediante escisión de la proteína de fusión con Factor Xa. El péptido recombinante GasK7A β no fue activo contra la cepa indicadora de *L. sakei* subsp. *sakei* sensible por sí sola (CMI > 4000 ng/ml). Sin embargo, cuando se probó el péptido GasK7A β en combinación con el péptido GasK7A α purificado de CFCS de *L. paragasseri* K7, aumentó la actividad inhibidora contra *L. sakei* subsp. *sakei* en >300 % en comparación con GasK7A α solo, lo que muestra claramente que GasK7A β era biológicamente activo y actuaba de forma sinérgica con GasK7A α . El péptido GasK7B α también se expresó con éxito como una fusión con MBP en *E. coli* con una actividad comparable al péptido aislado de K7 (no mostrado).

Ejemplo 2. Uso combinado de las bacteriocinas K7 y antibiótico

[0134] Se probó la eficacia del uso combinado de las bacteriocinas K7 y metronidazol contra *L. iners* y *G. vaginalis* *in vitro*. Se obtuvieron cultivos de *L. iners* HM-702 y *G. vaginalis* HM-133, cocultivos de *L. iners* + *G. vaginalis*, y *L. crispatus* SJ-3C tal como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. Se diluyeron cultivos de una noche de *L. iners*, *G. vaginalis* y *L. crispatus* en medios de crecimiento frescos hasta concentraciones de aproximadamente 10⁵ UFC/ml para analizarse contra bacteriocina K7 (del Ejemplo 1), metronidazol (Sigma-Aldrich, EE. UU.) y bacteriocina K7 + metronidazol (combinados). A cada cultivo de *L. iners*, *G. vaginalis*, cocultivo de *L. iners* + *G. vaginalis*, y *L. crispatus* se le añadió bacteriocina K7 semipurificada (80 UB/ml, cuantificada usando *L. iners* como indicador), metronidazol (42 µg/ml), o la combinación de bacteriocina K7 + metronidazol, y se incubaron anaeróticamente a 37 °C durante 48 horas. Como controles, *L. iners*, *G. vaginalis*, el conjunto *L. iners* + *G. vaginalis*, y *L. crispatus* también se incubaron solos con medios acondicionados durante 48 horas. La inhibición de *L. iners*, *G. vaginalis*, el cocultivo de *L. iners* + *G. vaginalis* y *L. crispatus* se midió espectrofotométricamente a 600 nm utilizando un lector de placas Cytation 3 (BioTek) después de 24 horas y después de 48 horas.

[0135] Tal como se muestra en la Figura 10, *L. iners* es sensible a la bacteriocina K7 sola y a la combinación de bacteriocina K7 + metronidazol, pero no es sensible al metronidazol solo. Por el contrario, *G. vaginalis* es sensible al metronidazol solo y a la combinación de bacteriocina K7 + metronidazol, pero no es sensible a la bacteriocina K7 (Figura 10). El cocultivo de *L. iners* + *G. vaginalis* es inhibido únicamente por la combinación de bacteriocina K7 + metronidazol. Los resultados ilustrados por la Figura 10 indican que *L. crispatus* SJ-3C es una cepa de *Lactobacillus* vaginal viva productora de H₂O₂ adecuada para la terapia de reemplazo debido al hecho de que *L. crispatus* SJ-3C no fue inhibido significativamente por la bacteriocina K7, el metronidazol o la combinación de bacteriocina K7+ metronidazol.

Ejemplo 3. Preparación de la composición de bacteriocinas

[0136] Este ejemplo detalla la estrategia general para preparar la composición de bacteriocinas en forma de gel como un producto médico para aplicaciones intravaginales. Si bien el siguiente ejemplo describe la preparación de la composición de bacteriocinas a una escala relativamente grande, se puede entender que los procedimientos descritos a continuación son aplicables a cualquier escala de producción. Además, el procedimiento aquí descrito es aplicable a cualquier microorganismo y cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para aplicación intravaginal.

[0137] La combinación de péptidos Gask7b α, Gask7B β, Gask7A α y Gask7A β purificados (péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, u homólogos de los mismos) se incorpora a una formulación adecuada para aplicaciones intravaginales en la cantidad adecuada para hacer que la composición en su conjunto sea bactericidamente activa *in vivo*.

[0138] Se preparará una formulación basada en gel para aplicaciones intravaginales con 0,1 % de péptidos Gask7 (es decir, que tiene una CMI *in vivo* para *L. iners* de 1,0 mg/ml) añadiendo primero una cantidad suficiente de metilparabeno (aproximadamente 40-50 g) a un tanque con camisa de acero inoxidable de 100 litros equipado con cuchillas dobles contrarrotativas con raspadores laterales y un mezclador de alto cizallamiento que contiene agua purificada precalentada (aproximadamente 40-50 kg a 70-80 °C) mientras se mezcla (cuchillas/rascadores laterales a aproximadamente 12 RPM, mezclador de alto cizallamiento en alto) y a una temperatura mantenida (70-80°C). La mezcla continuará hasta que se disuelva el metilparabeno.

[0139] A continuación, manteniendo la temperatura y mezclando de forma continua e ininterrumpida, se añadirá una cantidad suficiente de propilparabeno (aproximadamente 7,0-17 g) y se disolverá completamente antes de añadir ededato disódico en una cantidad suficiente (aproximadamente 25-35 g). Una vez que el ededato disódico se disuelva completamente, se agregará al tanque hidroxipropilmetilcelulosa (o Carbopol® 974P, o una combinación de hidroxipropilmetilcelulosa y Carbopol® 947P) en una cantidad suficiente (aproximadamente 1,0-3,0 kg) y se mezclará de forma continua hasta que esté completamente dispersada. Se agregará una cantidad suficiente de propilenglicol (aproximadamente 1,0-2,5 kg) y se continuará mezclando hasta que se disuelva por completo. Mientras se mezcla, se añadirá una cantidad suficiente de péptidos Gask7 (aproximadamente 0,2-1,0 kg) y se continuará mezclando hasta que los péptidos Gask7 se disuelvan por completo. Se medirá que el pH esté entre aproximadamente 5,0 (abajo) y aproximadamente 6,0 (arriba).

[0140] Mientras se mezcla, se añadirá una cantidad suficiente de agua purificada (aproximadamente 0,1-1,0 kg) y se mezclará durante aproximadamente 15 minutos. Se apagará el mezclador de alto cizallamiento y la mezcla se enfriará hasta aproximadamente 24 °C durante aproximadamente 4,5 h. El gel de bacteriocina resultante que contiene 0,1 % de péptidos Gask7 se almacenará en un tanque de 50 galones y a continuación se envasará en tubos de 7,0 g. Las muestras de varios tubos del lote tendrán un pH de aproximadamente 5,3.

65

Ejemplo 4. Uso de la composición de bacteriocinas para tratar pacientes que tienen microbiota diversa asociada con VB

[0141] Este ejemplo detalla un régimen de tratamiento *in vivo* para una paciente a la que se le ha diagnosticado niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una microbiota diversa asociada con VB. El procedimiento de tratamiento aquí descrito demuestra que la composición de bacteriocinas de la presente invención, administrada a la paciente en forma de crema/gel/óvulo, puede inhibir *L. iners*, creando un nicho ecológico en la paciente para la recolonización de *Lactobacillus* protectores productores de H₂O₂.

[0142] Una paciente de 25 años sufre síntomas asociados con VB, tales como olor "a pescado" y secreción vaginal anormal, y malestar por picazón, ardor y dolor. Se detecta una microbiota diversa asociada con la VB en la paciente según los criterios clínicos de Amsel (flujo vaginal fino y gris homogéneo, olor (prueba de olfato positivo), >20 % de células clave y pH > 4,5), al satisfacer ≥ 3 criterios satisfechos, y confirmado microbiológicamente mediante el sistema de puntuación de Nugent (puntuación de Nugent de 7 a 10). El médico también confirma que la mucosa vaginal de la paciente está colonizada por niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ utilizando el procedimiento de cultivo en placa de agar TMB-plus, con una lectura de placa negativa después de 30 minutos de exposición al aire (coloración azul mínima de colonias).

[0143] Debido a que a la paciente se le diagnostica una puntuación de Nugent positiva para VB, la paciente recibirá tratamiento simultáneo para *L. iners* y un tratamiento con antibióticos para los organismos asociados a VB. Primero, la paciente se trata por vía intravaginal con 5 gramos de la composición de gel de bacteriocina al 0,1 % del Ejemplo 3 una vez al día durante 5 días para inhibir y/o destruir *L. iners*. Junto con el tratamiento con composición de bacteriocinas, la paciente también recibirá tratamiento con metronidazol tópico al 0,75 % (MetroGel®) una vez al día durante 5 días.

[0144] Después de completar los regímenes de tratamiento con la composición de bacteriocinas y antibióticos, el médico examinará a la paciente para confirmar que la mucosa vaginal de la paciente ha sido recolonizada con *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno. El médico emplea el procedimiento de cultivo en placa de agar TMB-plus, lo que nuevamente da como resultado una lectura de placa negativa después de 30 minutos de exposición al aire, lo que indica niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ en la mucosa vaginal de la paciente. La paciente comienza el tratamiento utilizando una formulación de fármaco en polvo seco de *Lactobacillus crispatus* CTV-05 (es decir, LACTIN-V). El polvo LACTIN-V se administra por vía vaginal con un aplicador precargado. Cada aplicador precargado contiene una dosis de 200 mg de LACTIN-V a 2×10⁹ UFC/aplicador. La paciente recibe una dosis de LACTIN-V diariamente durante 5 días consecutivos.

REIVINDICACIONES

1. Composición de bacteriocinas que comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y al menos un péptido aislado, o una combinación de péptidos aislados, en la que:
- 5 (i) dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, tiene actividad bactericida selectiva contra *L. iners*;
- (ii) dicho al menos un péptido aislado se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y un péptido aislado que tiene del 90 % al 99 % de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4; y
- 10 (iii) la composición de bacteriocinas es una formulación adecuada para aplicaciones intravaginales, y en la que dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, está presente en una cantidad suficiente para exhibir propiedades bactericidas de la composición de bacteriocinas.
2. Composición de bacteriocinas, según la reivindicación 1, en la que:
- 15 (i) el péptido aislado es SEQ ID NO: 1;
- (ii) el péptido aislado es SEQ ID NO: 2;
- (iii) el péptido aislado es SEQ ID NO: 3;
- (iv) el péptido aislado es SEQ ID NO: 4;
- (v) la combinación de péptidos comprende los péptidos aislados SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2;
- 20 (vi) la combinación de péptidos comprende los péptidos aislados SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; o
- (vii) la combinación de péptidos comprende los péptidos aislados SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
3. Composición de bacteriocinas, según la reivindicación 1 o 2, en la que:
- 25 (i) la formulación es un gel, crema, pomada, espuma, película, cápsula, comprimido, polvo, pesario, inserto o supositorio adecuado para aplicaciones intravaginales tópicas; y/o
- (ii) la cantidad de péptido, o combinación de péptidos, está entre el 0,001 % (p/p) y el 3 % (p/p).
4. Composición de bacteriocinas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además al menos un antibiótico activo contra organismos asociados a la vaginosis bacteriana, opcionalmente en la que dicho al menos un antibiótico se selecciona del grupo que consiste en clindamicina, metronidazol, secnidazol, tinidazol, y astodrímero sódico.
- 30 5. Composición de bacteriocinas para usar en un procedimiento para tratar a una paciente que tiene niveles bajos de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ y una puntuación de Nugent de al menos 4, en la que dicha composición de bacteriocinas es una composición de bacteriocinas tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores;
- 35 y en la que dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, se va a administrar por vía intravaginal en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de *L. iners* y para promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ endógeno.
- 40 6. Composición de bacteriocinas para usar, según la reivindicación 5, en la que dicho procedimiento comprende además administrar a la paciente al menos un antibiótico activo contra organismos asociados a la vaginosis bacteriana (VB), en la que el antibiótico se administra en una cantidad suficiente para disminuir los niveles de organismos asociados a VB.
- 45 7. Composición de bacteriocinas para usar, según la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que dicho procedimiento comprende además administrar a la paciente una composición bacteriana viva que comprende *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂, en la que la composición bacteriana viva se administra en una cantidad suficiente para promover el crecimiento de *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ administrado.
- 50 8. Composición de bacteriocinas para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que la composición de bacteriocinas es una formulación adecuada para aplicaciones intravaginales tópicas, en la que la formulación es un gel, crema, pomada, espuma, película, cápsula, comprimido, polvo, pesario, inserto o supositorio.
- 55 9. Composición de bacteriocinas para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que:
- (i) el péptido aislado es SEQ ID NO: 1;
- (ii) el péptido aislado es SEQ ID NO: 2;
- (iii) el péptido aislado es SEQ ID NO: 3;
- 60 (iv) el péptido aislado es SEQ ID NO: 4;
- (v) la combinación de péptidos comprende los péptidos aislados SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2;
- (vi) la combinación de péptidos comprende los péptidos aislados SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; o
- (vii) la combinación de péptidos comprende los péptidos aislados SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 65 10. Composición de bacteriocinas para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que la cantidad de

dicho al menos un péptido, o combinación de péptidos aislados, está entre el 0,001 % (p/p) y el 3 % (p/p).

11. Composición de bacteriocinas para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que dicho procedimiento comprende además administrar a la paciente al menos un antibiótico y en la que:

- 5 (i) dicho al menos un antibiótico se selecciona del grupo que consiste en clindamicina, metronidazol, secnidazol, tinidazol y astodrímico sódico;
- (ii) la cantidad de antibiótico está entre 30 mg y 2000 mg por dosis diaria;
- (iii) el antibiótico se administra a la paciente una vez al día durante hasta 7 días; y/o
- 10 (iv) la cantidad de antibiótico se administra de manera simultánea con la cantidad de al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados.

12. Composición de bacteriocinas para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en la que dicho procedimiento comprende además administrar por vía intravaginal a la paciente una composición bacteriana viva que comprende *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ seleccionado del grupo que consiste en *L. crispatus*, *L. jensenii*,
15 *L. gasseri* y combinaciones de los mismos.

13. Composición de bacteriocinas para usar, según la reivindicación 12, en la que el *Lactobacillus* vaginal productor de H₂O₂ es *L. crispatus* CTV-05.

20 14. Composición de bacteriocinas para usar, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en la que la cantidad de dicho al menos un péptido aislado, o combinación de péptidos aislados, es:

- (i) una cantidad suficiente para prevenir o tratar la vaginosis bacteriana (VB) en la paciente;
- (ii) una cantidad suficiente para prevenir el parto prematuro (PP) en la paciente; o
- 25 (iii) una cantidad suficiente para prevenir el fracaso de la fecundación *in vitro* (FIV) en la paciente.

Fig. 1

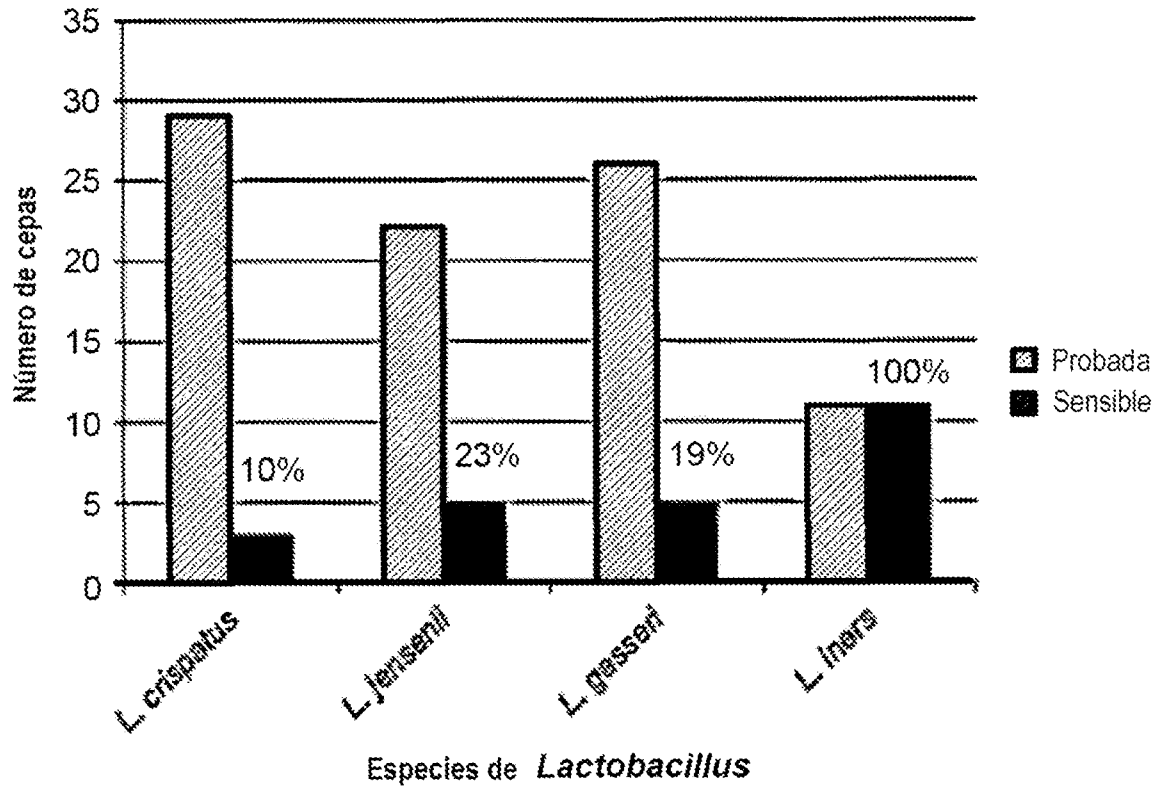


Fig. 2

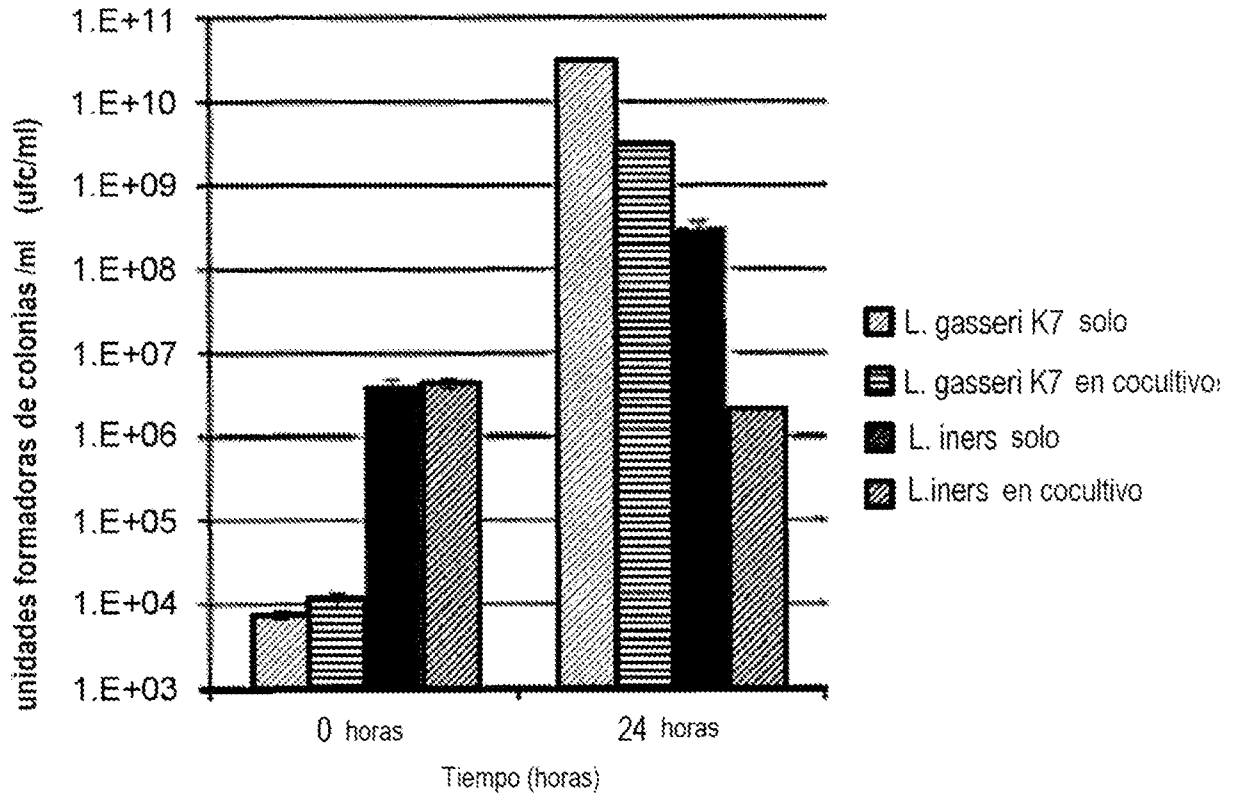


Fig. 3

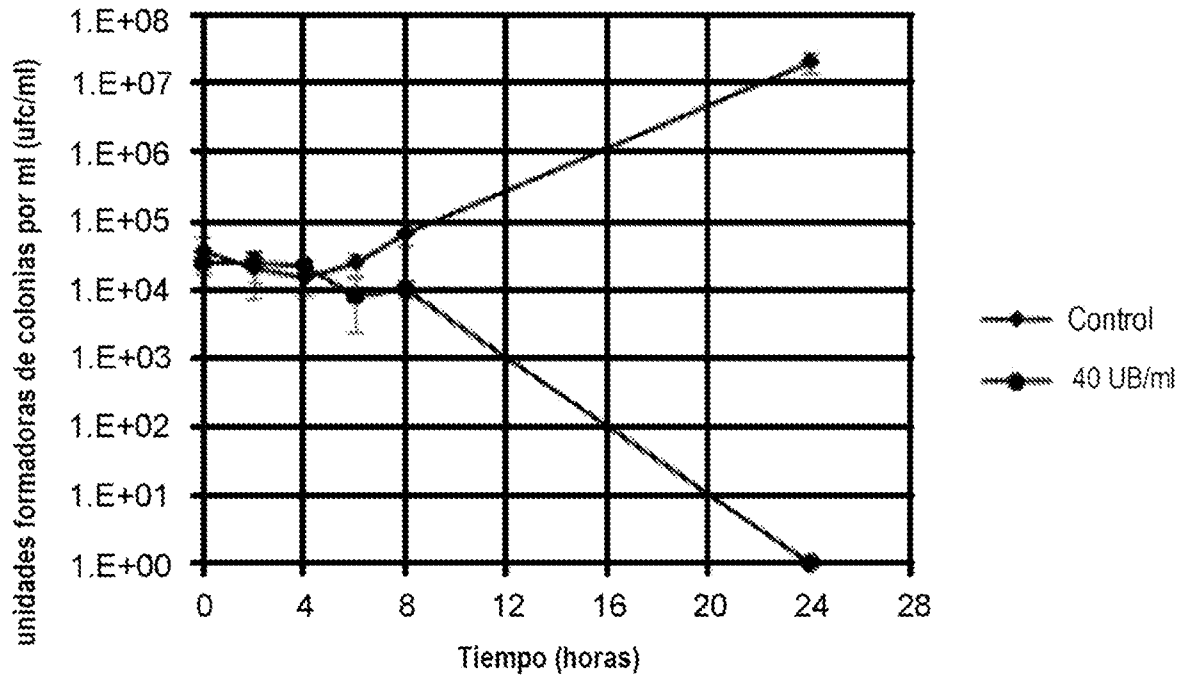


Fig. 4

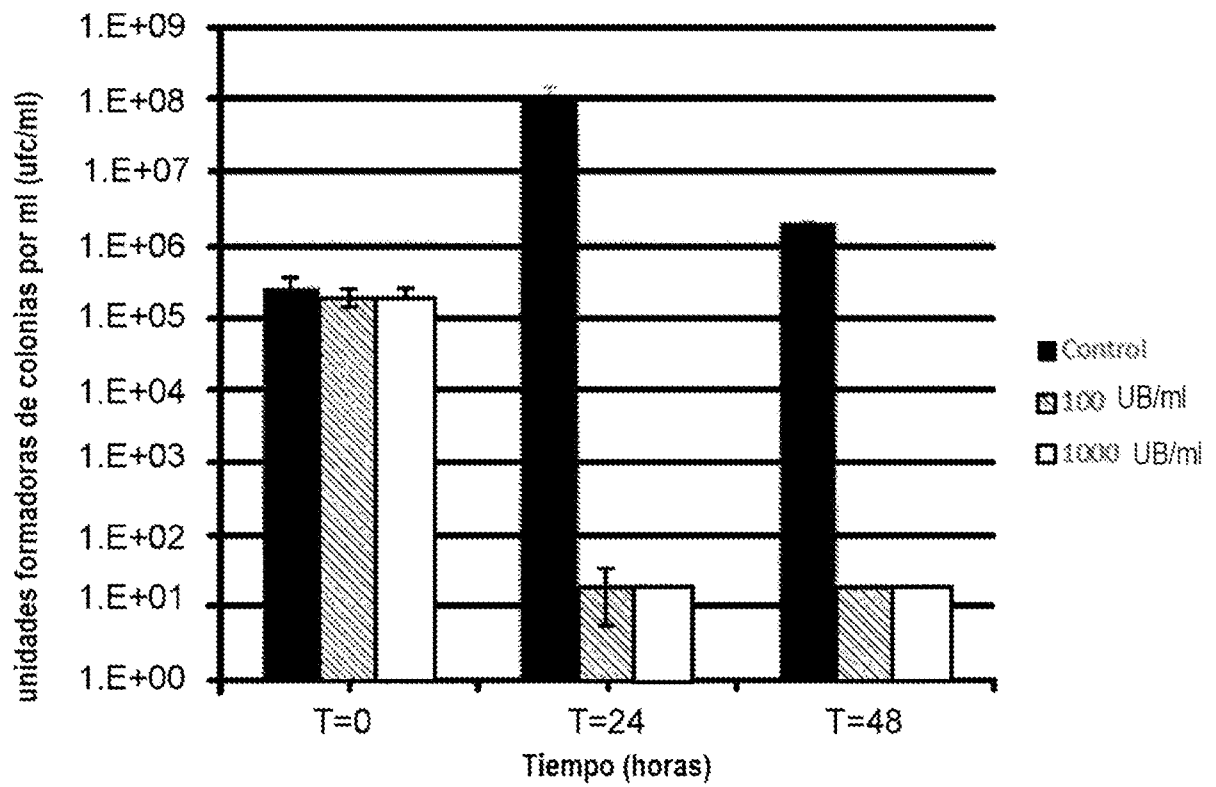


Fig. 5A

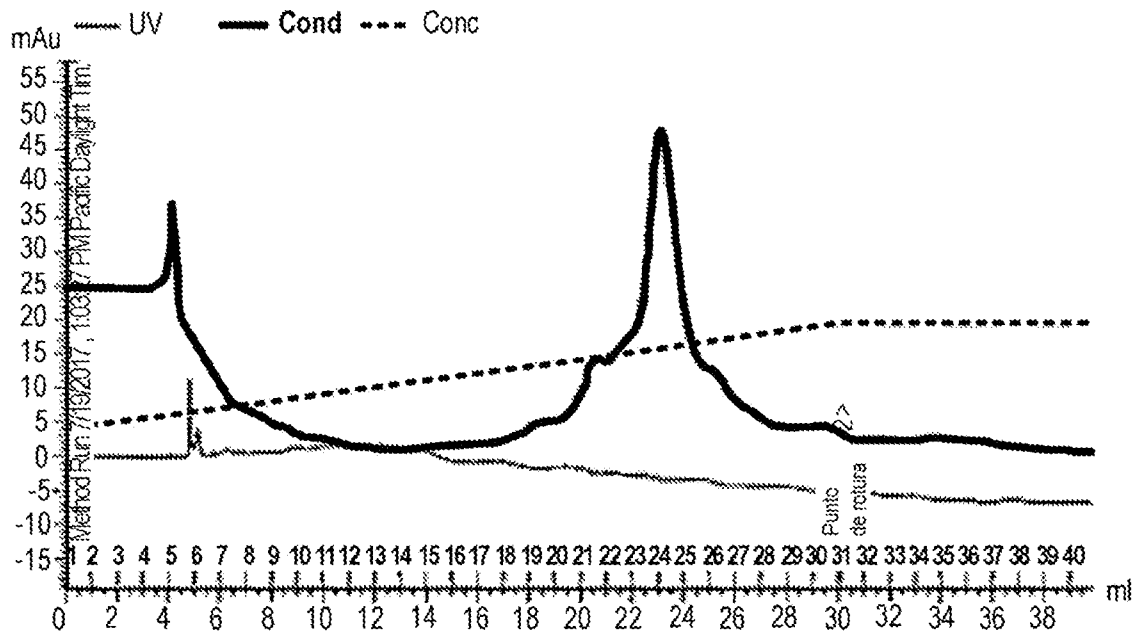


Fig. 5B

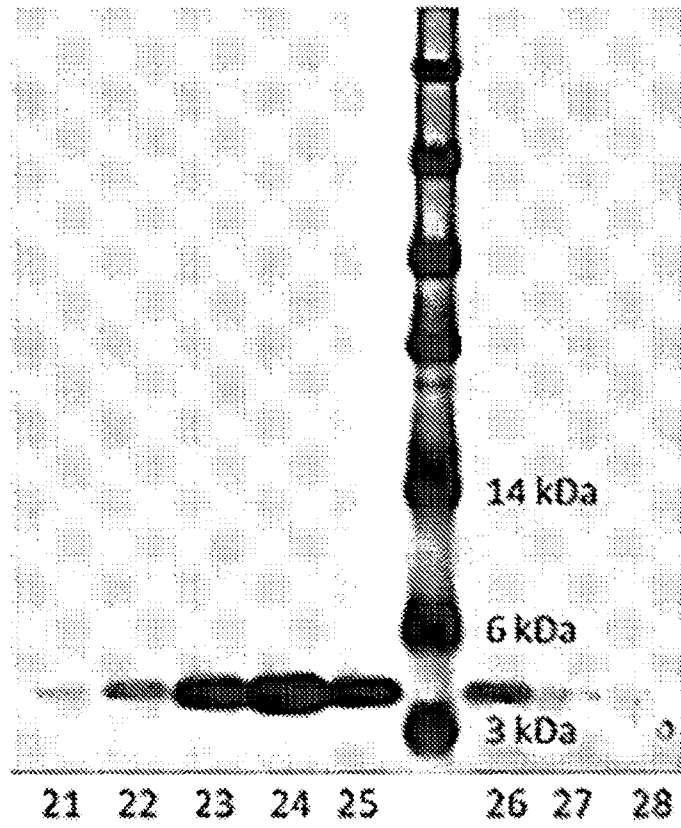


Fig. 6

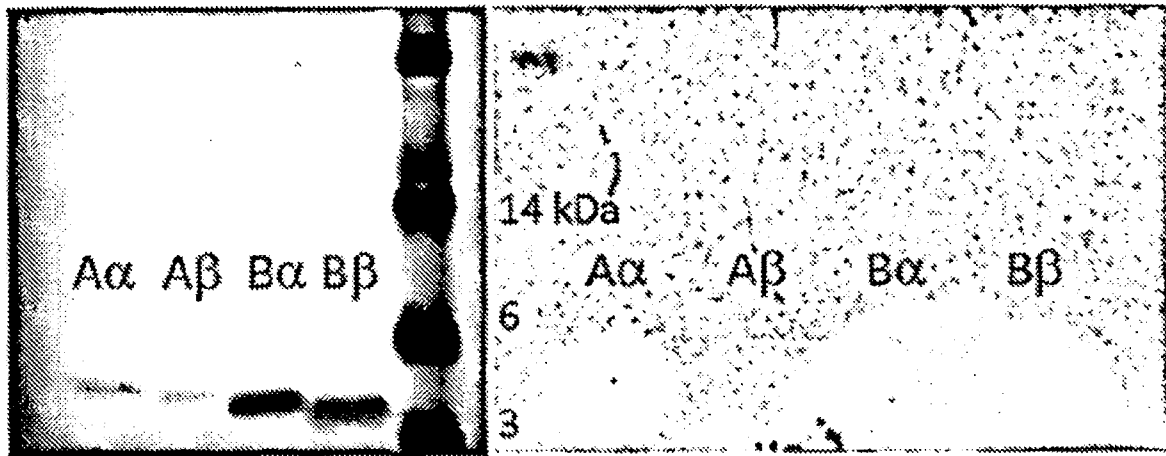


Fig. 7

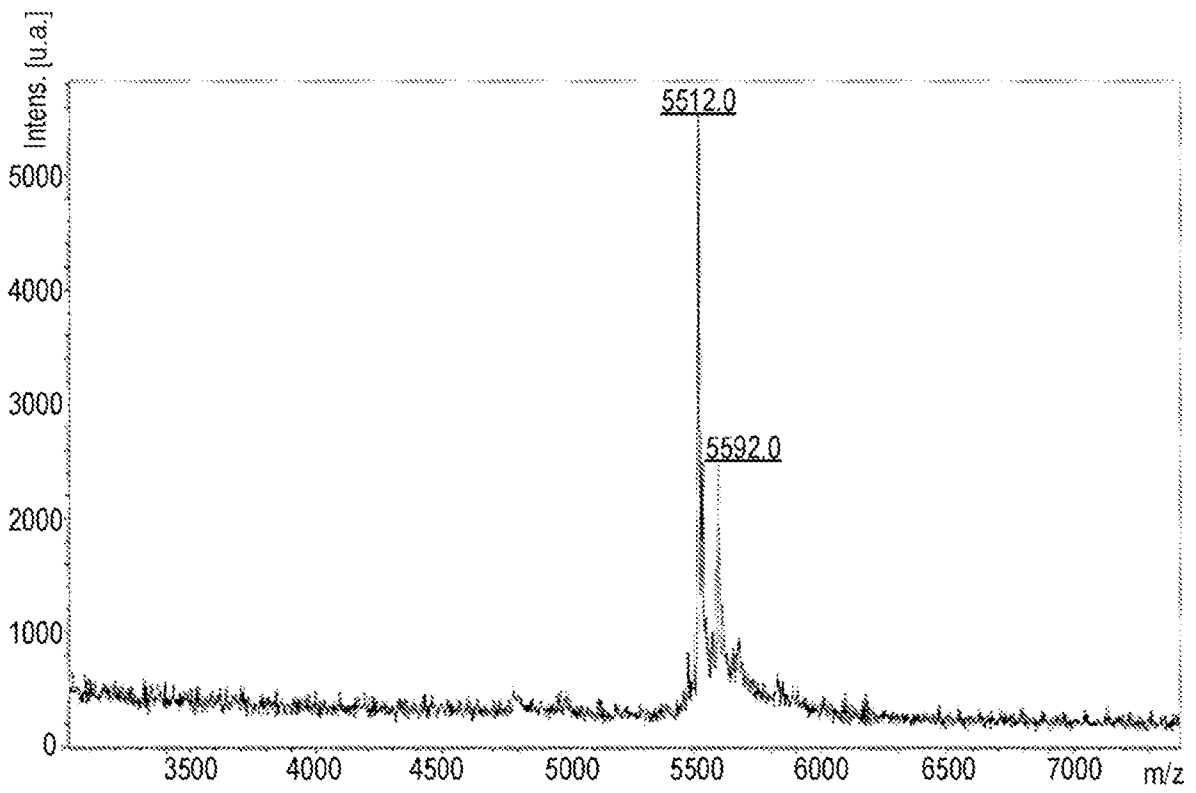


Fig. 8

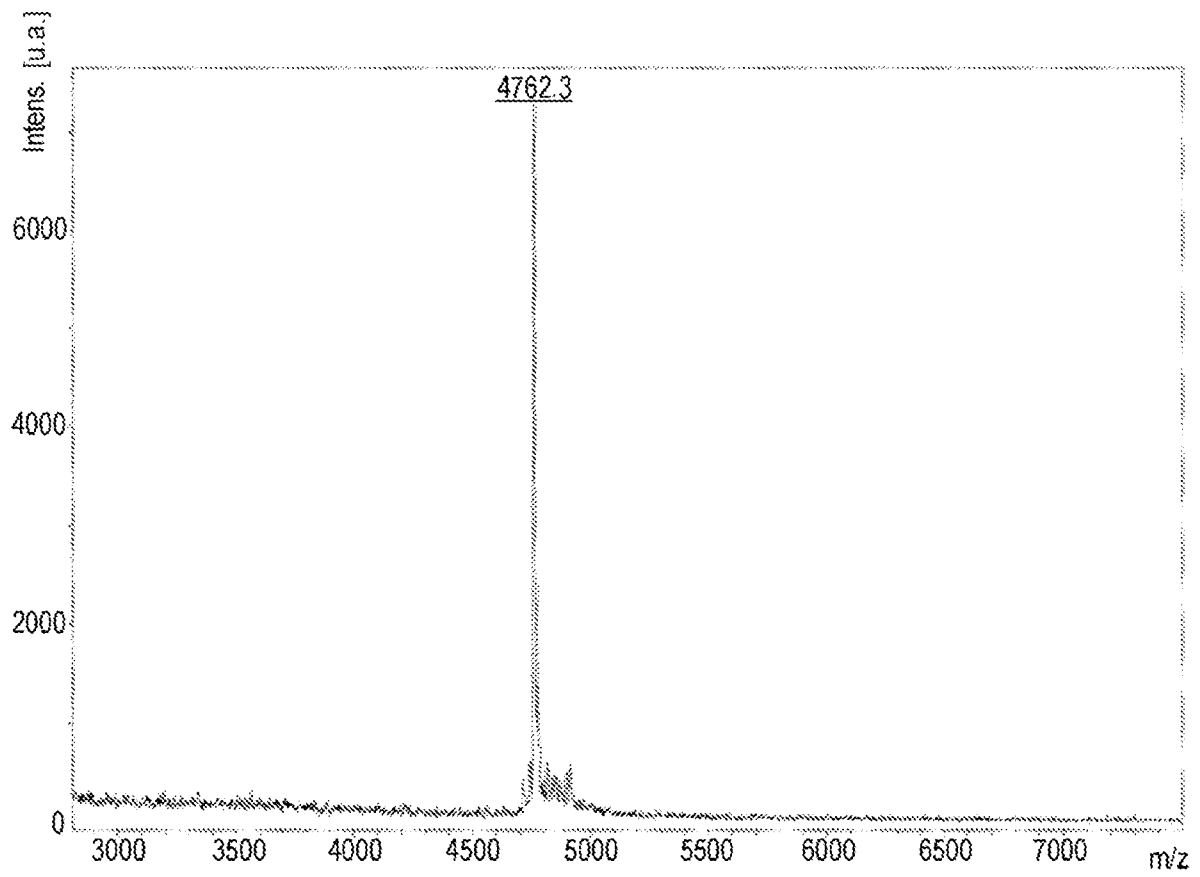


Fig. 9

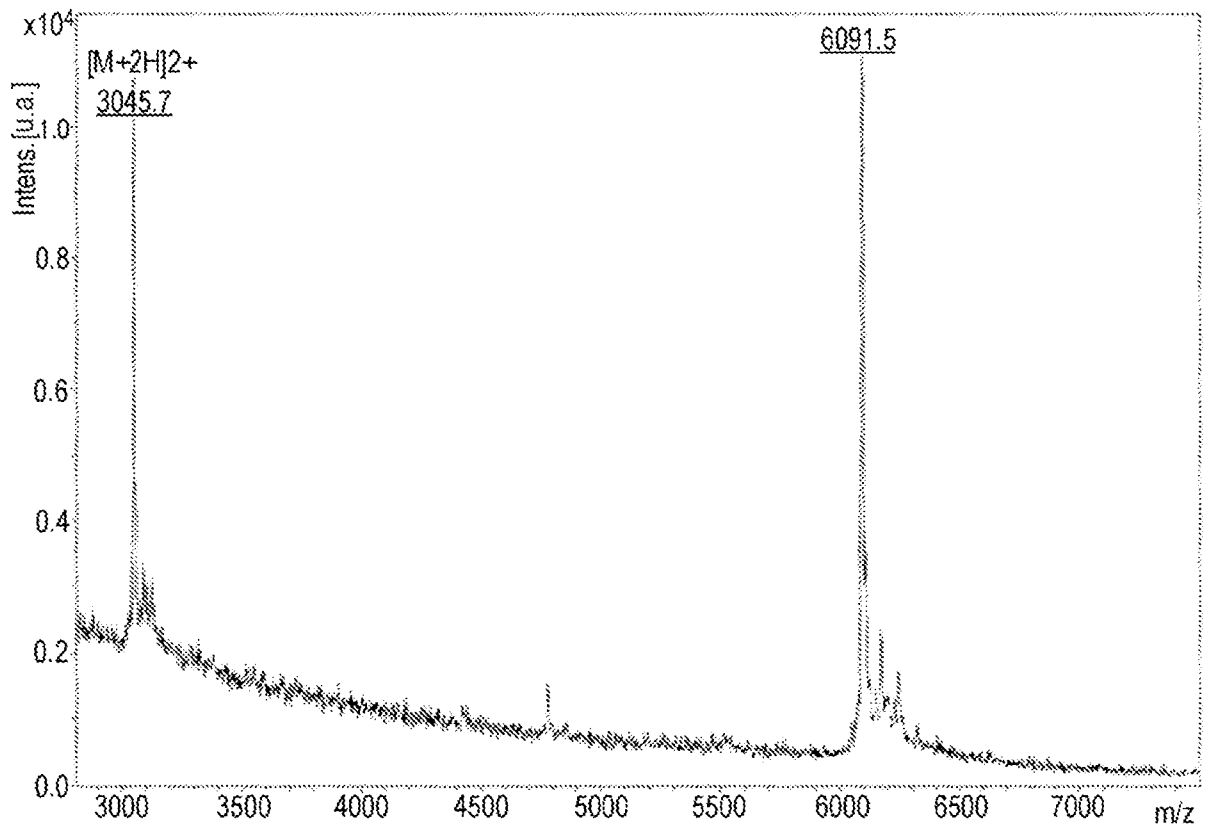


Fig. 10

