(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 994 609**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/741 (2015.01)
A61K 31/715 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2021 PCT/EP2021/056471**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.09.2021 WO21185728**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2021 E 21710991 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2024 EP 4121073**

(54) Título: **Biocompuestos que comprenden probióticos, colágeno y polisacárido extracelular bacteriano y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

16.03.2020 EP 20382195

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2025

(73) Titular/es:

BIOSEARCH S.A. (100.00%)
Camino de Purchil 66
18004 Granada, ES

(72) Inventor/es:

OLIVARES MARTÍN, MÓNICA;
BAÑUELOS HORTIGÜELA, ÓSCAR;
DOMÍNGUEZ VERA, JOSÉ MANUEL;
GONZÁLEZ GARNICA, ANA;
DELGADO LÓPEZ, JOSÉ MANUEL;
SABIO RODRÍGUEZ, LAURA y
RAMÍREZ RODRÍGUEZ, GLORIA BELÉN

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

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

Biocompuestos que comprenden probióticos, colágeno y polisacárido extracelular bacteriano y usos de los mismos

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la terapéutica y, más particularmente, a la terapia de la vaginosis bacteriana utilizando composiciones probióticas que se proporcionan formando parte de un material biocompuesto biológico.

Antecedentes de la invención

La vaginosis bacteriana (VB) es la causa más frecuente de trastornos vaginales en mujeres en edad reproductiva. Los síntomas más comunes de esta infección son el flujo vaginal anormal denso, dolor, picazón y olor desagradable. Estudios independientes han validado que la condición de VB aumenta el riesgo de desarrollar otras patologías, tal como enfermedad inflamatoria pélvica e infecciones de transmisión sexual (ITS), incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además, la VB se ha asociado fuertemente con el nacimiento prematuro y las infecciones uterinas postparto.

Desde una perspectiva microbiológica, la VB se caracteriza por la alteración del equilibrio normal de la microbiota vaginal, y la condición patológica típicamente denominada "disbiosis vaginal". La microbiota nativa ayuda a crear una barrera protectora de la mucosa vaginal contra las infecciones. Sin embargo, la microbiota sana es sensible a varios factores, en particular, a un cambio en el pH de la mucosa, que puede desequilibrar las poblaciones microbianas, favoreciendo la aparición de microbios causantes de infecciones. Se cree que la salud de la microbiota vaginal se mantiene por organismos productores de ácido láctico, tales como los lactobacilos. Con un mínimo desequilibrio en el perfil de pH del fluido vaginal (por ejemplo, de pH 4 a 5 en un entorno saludable frente a no saludable) , estos lactobacilos se suprimen por el crecimiento excesivo de bacterias patógenas, tales como vaginalis y Mobiluncusno spp., que están presentes en poblaciones pequeñas cuando están sanas, dando como resultado VB en mujeres en edad reproductiva.

Desde un punto de vista químico, el entorno vaginal de una mujer sana está dominado por el ácido láctico, el principal metabolito de la familia Lactobacillus. Otros ácidos grasos de cadena corta (AGCC), tales como el ácido acético, propiónico y butírico, asociados con otras bacterias típicamente dañinas, están presentes en concentraciones casi 100 veces más bajas. El pH es, por lo tanto, regulado por el ácido láctico (pKa = 3,80), que se encuentra en el fluido vaginal sano en concentraciones del orden de 120 mM, lo que da lugar a valores de pH de alrededor de 4. Cuando se desarrolla la VB, la población decreciente de lactobacilos y el crecimiento excesivo de bacterias patógenas modifican el patrón de metabolitos: un aumento de AGCC y una disminución dramática del ácido láctico hasta concentraciones de aproximadamente 20 mM. En particular, el ácido acético, el componente principal de los AGCC, puede alcanzar concentraciones de aproximadamente 120 mM desde originalmente 2 mM, lo que da lugar a un aumento del pH hasta el valor de 5, ya que el pKa del ácido acético (4,86) es mayor que el del ácido láctico. Por lo tanto, el pH del fluido vaginal se mueve de 4 (sano) a 5 (VB), y empeora la condición de la enfermedad con el tiempo. El cambio de pH es, de hecho, un parámetro clave utilizado en el diagnóstico de VB. Por ejemplo, el método de Amsel diagnostica la VB cuando el fluido vaginal tiene un pH superior a 4,5.

La VB se ha tratado tradicionalmente con antibióticos, especialmente metronidazol. Sin embargo, una serie de inconvenientes en las modalidades de tratamiento existentes necesitan el desarrollo de nuevas vías de terapia. En primer lugar, los tratamientos basados en antibióticos no evitan las recurrencias. En segundo lugar, el desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos debido al uso excesivo de antibióticos sigue siendo el mayor desafío al que se enfrenta la medicina moderna. Por lo tanto, se necesitan de manera crítica terapias a largo plazo más efectivas que reduzcan nuestra dependencia de los antibióticos.

En vista del ciclo bioquímico que tiene lugar durante la VB, es decir, la disminución de la concentración de ácido láctico que en última instancia facilita el crecimiento excesivo de patógenos, una de las posibles estrategias de tratamiento contra la VB puede ser aplicar directamente ácido láctico a la vagina infectada. Aunque este tratamiento puede reducir los síntomas, se espera que el uso frecuente y prolongado de esta terapia evite la reaparición de la VB. Enfoques más recientes han considerado el uso de probióticos de la familia de los Lactobacillus. Por ejemplo, el documento WO2014184643 describe composiciones que tienen actividad antibacteriana contra las bacterias que causan la vaginosis y que contienen probióticos de la familia de los Lactobacillus. Aunque prometedor, la eficiencia de este enfoque dependerá de los niveles de adhesión y proliferación del probiótico dentro de la microproliferación afectada por la VB y la terapia posterior, lo que da lugar a la recurrencia de la VB.

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han desarrollado una nueva estrategia para el tratamiento de la VB basada en el uso de una matriz biocompatible a base de colágeno que protege los probióticos y permite su localización y proliferación eficaces dentro de los fluidos vaginales afectados. En particular, los inventores han mostrado que los andamios de colágeno (col) son capaces de proteger dos probióticos productores de biopelículas del género lactobacilo, a saber, *L. fermentum* (*Lf*) y *L. acidophilus* (*La*), dando como resultado materiales híbridos, col-*Lf* y col-La, respectivamente, con propiedades curativas mejoradas contra las infecciones por VB. Ambos materiales corresponden a biocompuestos compuestos de colágeno, probiótico y EPS bacteriano (exopolisacáridos). col-*Lf* y col-*La* son capaces de restaurar el pH de un fluido de VB simulado afectado a una condición sana. La excelente estabilidad de estos probióticos atrapados en colágeno, combinada con una alta adhesión a la mucosa vaginal y la biocompatibilidad intrínseca de la matriz de colágeno, hacen que estos materiales sean muy prometedores para la terapia de VB sin antibióticos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Micrografías de SEM de fibras de colágeno ensambladas en PBS (pH 7,4) en ausencia (a-b) y presencia del probiótico *Lf* (c-d) y después incubadas en MRS para producir col-*Lf* (e-f). Las flechas indican el EPS.

Figura 2. Micrografías de SEM de fibras de colágeno en presencia del probiótico La. Diferentes aumentos: 26,60 kx (a) y 95,63 kx (b).

Figura 3: Espectros FTIR (a) y curvas TGA (b) de colágeno (Col) y col-*Lf*. El recuadro en (b) muestra las curvas TGA derivadas (curvas DTG) correspondientes. Ambas caracterizaciones confirman la incorporación efectiva de las bacterias en los andamios de colágeno. (c) Patrones de difracción de rayos X de col y col-*Lf*. *q* representa la amplitud del vector de dispersión, $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, siendo θ el ángulo de dispersión y λ la longitud de onda del haz de rayos X.

Figura 4. Imágenes confocales de col-*Lf* teñidas con los colorantes SYTO9 (verde) y yoduro de propidio (rojo). a) la sección yz revela que las bacterias penetraron y se integraron completamente en la matriz de colágeno, b) imagen 3D (318,20 × 318,20 × 38 μm^3) que muestra cómo las bacterias se alinean específicamente a lo largo de las fibras de colágeno (flecha). c) Una imagen de mayor aumento que muestra muy pocas bacterias muertas (rojas) (esta imagen es una proyección de intensidad máxima de 6 micrones de profundidad).

Figura 5. a) Evolución temporal del pH en medio MRS diluido 1/10 que contiene *Lf* o col-*Lf* después de almacenamiento durante dos, cuatro y ocho semanas a 4 °C. También se muestra la evolución del pH de muestras frescas. Los errores como desviaciones estándar para estos valores fueron inferiores a ± 0,2. b) Evolución temporal de la actividad reductora de POM en MRS diluido 1/10 que contiene *Lf* o col-*Lf* después de almacenamiento durante dos semanas, 1 mes o 2 meses a 4 °C. También se muestra la evolución de la actividad reductora de POM de muestras frescas. Las barras de error muestran desviaciones estándar.

Figura 6: a) Evolución temporal del pH en medio MRS diluido 1/10 que contiene *La* o col-*La* después de almacenamiento durante dos semanas, 1 mes o 2 meses a 4 °C. También se muestra la evolución del pH de muestras frescas. Los errores como desviaciones estándar para estas muestras son todos inferiores a ± 0,2. b) Evolución temporal de la actividad reductora de POM en MRS diluido 1/10 que contiene La o col-*La* después de almacenamiento durante dos semanas, 1 mes o 2 meses a 4 °C. También se muestra la evolución de la actividad reductora de POM de muestras frescas. Las barras de error muestran desviaciones estándar.

Figura 7. a) Representación esquemática de los experimentos de adhesión. b) Evaluación de la adhesión de *Lf* y col-*Lf* a mucina inmovilizada. La absorbancia a 590 nm se correlaciona con la cantidad de bacterias adheridas a la mucina. También se incluyen los valores de absorbancia de los controles (Mucina y Mucina + col). Los datos se expresan como promedio ± DE (n=3). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$.

Figura 8: a) Representación esquemática del experimento de evaluación de la adhesión. b) Evaluación de la adhesión de *La* y col-*La* a mucina inmovilizada. La absorbancia a 590 nm se correlaciona con la cantidad de bacterias adheridas a la mucina. También se incluyen los valores de absorbancia de los controles (Mucina y Mucina + col). Los datos se expresan como promedio ± DE (n=3). ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$.

Figura 9: Evaluación de la adhesión de *Lf* y col-Lf a mucina porcina inmovilizada. La absorbancia a 590 nm se correlaciona con la cantidad de bacterias adheridas a la mucina. También se incluyen los valores de absorbancia a 590 nm de los controles (Mucina y Mucina + col). Se muestran los resultados mientras se bloquea o no con BSA. Las barras de error muestran desviaciones estándar.

El asterisco indica una diferencia significativa (** es $p < 0,01$ y *** es $p < 0,005$) en la adhesión a la mucina.

Figura 10. Evolución del pH de col-*Lf* y col-*La*, *Lf* y *La* en un fluido de VB simulado (pH inicial 5,0). Los errores como desviaciones estándar fueron todos inferiores a ± 0,06.

Descripción detallada

Método de obtención de un biocompuesto.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para preparar un biomaterial que comprende colágeno, probióticos y exopolisacárido, en donde el método comprende:

i) poner en contacto una población de bacterias probióticas con monómeros de colágeno,

ii) incubar la mezcla obtenida en la etapa i) en condiciones adecuadas para la y

iii) mantener las fibras de colágeno que contienen bacterias probióticas atrapadas obtenidas en la etapa ii) en condiciones adecuadas para la formación de exopolisacárido (EPS) por los probióticos hasta que el contenido de EPS en el biomaterial con respecto al contenido de colágeno del biomaterial medido como el contenido de azúcar sea de al menos el 2% (p/p).

En una primera etapa, el método según la invención comprende poner en contacto una población de bacterias probióticas con monómeros de colágeno.

El término "población de bacterias probióticas" o "composición probiótica", como se usa en el presente documento, se refiere a un cultivo mono o mixto de microorganismos que cuando se proporcionan a un mamífero, por ejemplo un humano, afectan al huésped de manera beneficiosa. En algunas realizaciones, una composición probiótica de la invención contiene una única especie de bacteria. En otras realizaciones, la composición probiótica contiene dos o más especies de bacterias, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000 o más especies de bacterias. En una realización, la composición probiótica contiene no más de 20 especies de bacterias, por ejemplo, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 especie de bacteria. En realizaciones de ejemplo, la composición probiótica contiene 8 especies bacterianas. En otras realizaciones de ejemplo, la composición probiótica contiene 9 especies bacterianas. En otras realizaciones, la composición probiótica contiene o se administra junto con un prebiótico, como se describe en la presente memoria.

En una realización, la población de bacterias probióticas contiene al menos una cepa que es capaz de producir biopelícula.

El término "biopelícula", como se usa en la presente memoria, se refiere a una matriz extracelular en la que los microorganismos se dispersan y/o forman colonias. La biopelícula está hecha típicamente de polisacáridos y otras macromoléculas. Las cepas capaces de producir biopelículas que se pueden usar en la presente invención se pueden identificar usando un ensayo como se describe en el ejemplo 1, en donde la cepa se cultiva dentro de un andamio de colágeno en un andamio de medio compatible y se determina el aumento en el contenido de azúcar. Como se explica a continuación, las cepas que son capaces de formar biopelículas se definen como aquellas que dan lugar a un contenido de azúcar en el material final de al menos el 2,5% (p/p), al menos el 3%, al menos el 3,5%, al menos el 4%, al menos el 4,5%, al menos el 5%, al menos el 5,5%, al menos el 6%, al menos el 6,5%, al menos el 7%, al menos el 7,5%, al menos 8%, al menos 8,5%, al menos 9%, al menos 9,5%, al menos 10%, al menos 11%, al menos 12%, al menos 13%, al menos 14%, al menos 15%, al menos 16%, al menos 17%, al menos 18%, al menos 19%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 50% o más, dándose los valores en p/p con respecto al contenido de colágeno en el biocompuesto. Se entenderá que las cepas capaces de producir biopelículas también pueden identificarse usando SEM detectando la formación de una red en el biomaterial que corresponde al EPS.

Los géneros bacterianos preferidos para usarse como composiciones probióticas en el método de la invención incluyen *Lactobacillus* y *Bifidobacterium.*

El término "bacteria del ácido láctico" o "BAL", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier bacteria capaz de producir, como el producto final metabólico principal de la fermentación de hidratos de carbono, ácido láctico o al menos uno de sus derivados (incluyendo, pero sin limitarse a, ácido acético o ácido propiónico): por lo tanto, el término pretende incluir bacterias de ácido propiónico (BAP), que producen ácido propiónico como producto de fermentación de hidratos de carbono. Ejemplos ilustrativos no limitativos de bacterias del ácido láctico son bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* y *Streptococcus* así como los géneros del orden *Lactobacillales Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella.* Típicamente, la bacteria de ácido láctico se selecciona de la especie *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefiri, Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus rhamnosus, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus sakei, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum, Lactobacillus farciminis, Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbreuckii, Lactobacillus plantarum,*

Lactobacillus paraplantarum, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus gasseri, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus jensenii.*

En una realización preferida, la bacteria de ácido láctico es una bacteria del género Lactobacillus. El término "Lactobacillus", como se usa en la presente memoria, se refiere a un género que se describe en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el ID de taxonomía 1578. En una realización particular, la bacteria de ácido láctico se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus fermemtun, Lactobacillus gasseri, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus bulgaricus.* En una realización más preferida, la bacteria de ácido láctico es *Lactobacillus fermentum.* El término "*Lactobacillus fermentum*" o "L. *fermentum*" se refiere a una especie del género Lactobacillus que se describe en la base de datos del NCBI con el ID de taxonomía 1613.

Las cepas de ejemplo de L. gasseri incluyen las depositadas como teniendo el número de acceso de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC por American Type Culture Collection) (ATCC Nº) 33323, ATCC Nº 19992, ATCC Nº 4484, ATCC Nº 4479, ATCC Nº 4481, ATCC Nº 4483, ATCC Nº 4480, ATCC Nº 4962, ATCC Nº 9857, ATCC Nº 4963, ATCC Nº 29601, ATCC Nº 33323. Una cepa de ejemplo de L. gasseri es L. gasseri JPS. Lactobacillus casei es una especie del género Lactobacillus ampliamente utilizada para la fermentación de productos lácteos. Las cepas de ejemplo de L. casei incluyen una cepa que tiene el número de acceso de la ATCC PTA-3945, que también puede denominarse L. casei KE01 o L. casei KE99. L. casei PTA-3945 se describe en la patente de EE. UU. Nº 6.797.266. Cepas de ejemplo adicionales incluyen ATCC Nº 393, ATCC Nº 334, ATCC Nº 4007, ATCC Nº 39539, ATCC Nº 27139, ATCC Nº 4940, ATCC Nº 39392, ATCC Nº 4913, ATCC Nº 4646, ATCC Nº 15008, ATCC Nº 334D-5, ATCC Nº PTA-2662, ATCC Nº 55825, ATCC Nº 55826, ATCC Nº 55841, ATCC Nº PTA-5149, ATCC Nº 7469, ATCC Nº 25598, ATCC Nº 27216, ATCC Nº 25599, ATCC Nº 25302, ATCC Nº 11582, ATCC Nº 11982, ATCC Nº 39595, ATCC Nº 25180, ATCC Nº 11578, ATCC Nº 9595, ATCC Nº 14435, ATCC Nº 12116, ATCC Nº 25303, ATCC Nº 13075, ATCC Nº 29599, ATCC Nº 27092, ATCC Nº 11981, ATCC Nº 27773, ATCC Nº 8530, ATCC Nº 49178, ATCC Nº 335, ATCC Nº 14957, ATCC Nº 7469a, ATCC Nº HB-12558, ATCC Nº HB-12560, ATCC Nº HB-12559, ATCC Nº 15820, ATCC Nº 27792, ATCC Nº 25937, ATCC Nº 27092-B1, ATCC Nº 87074. Lactobacillus acidophilus es una especie del género Lactobacillus que se encuentra de forma natural en el tracto gastrointestinal de humanos y animales y es una parte de la flora vaginal normal. Algunas cepas de Lactobacillus acidophilus se utilizan en la producción láctea. Cepas de Lactobacillus acidophilus ejemplares son ATCC Nº 4356, ATCC Nº 3154, ATCC Nº 53544, ATCC Nº 53544, ATCC Nº 43121, ATCC Nº PTA-4482, ATCC Nº 4796, ATCC Nº 53546, ATCC Nº 4355, ATCC Nº 9224, ATCC Nº 4357, ATCC Nº 832, ATCC Nº 4357D-5, ATCC Nº PTA-6751, ATCC Nº 6820.

En una realización preferida, el probiótico es *L. fermentum* y/o *L. acidophilus.* En una realización aún más particular, el probiótico que forma parte de la composición probiótica es *L. fermentum* CECT5716, *L. acidophilus* CECT903 o una combinación de ambos.

L. fermentum CECT5716 es una cepa aislada de la leche materna humana que se ha divulgado en la solicitud PCT publicada como WO2004003235.

L. acidophilus CECT903 es una cepa aislada de humanos y que está disponible libremente en la Colección Española de Cultivos Tipo (https://www.cect.org/vstrn.php?lan=es&cect=903).

Como se proporciona en la presente memoria, las composiciones terapéuticas comprenden, o como alternativa, modulan, la colonización y/o el injerto de las siguientes entidades bacterianas de ejemplo: *Lactobacillus gasseri, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus reuteri, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, L. crispatus, L. jensenii* y,. *B. breve*, *B. longum, B. bifidum, B. dentium.*

El término "bacteria del género Bifidobacterium" o "bifidobacterium", como se usa en la presente memoria, se refiere a un género de bacterias que se describe en la base de datos de NCBI con el ID de taxonomía 1678. Ejemplos ilustrativos no limitativos de Bifidobacterias adecuadas son las especies *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidium*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium breve, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium catenulatum, Bifidobacterium pseudocatenulatum, Bifidobacterium adolescenteis*, y *Bifidobacterium angulatum.* En una realización particular, la bacteria del género Bifidobacterium se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve, Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantum* y *Bifidobacterium animalis.*

En una realización, la composición probiótica comprende una única especie probiótica. En otra realización, cuando la composición probiótica comprende más de una especie probiótica, la composición probiótica no comprende la cepa de bacterias seleccionada del grupo que comprende la cepa *Lactobacillus plantarum* LMG P-21021-LP01, la cepa *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020 -LP02, la cepa *Lactobacillus fermentum* DSM 26955 (LF15) o la cepa *Lactobacillus fermentum* DSM 26956 (LF16).

El término colágeno, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un biopolímero autoensamblable producido haciendo reaccionar colágeno monomérico en una solución ligeramente iónica de pH neutro.

La solución predominantemente monomérica es adecuadamente acuosa o no acuosa, dependiendo del monómero. En realizaciones preferidas, el pH de la solución está controlado, en realizaciones preferidas específicas, la solución es una solución acuosa, y el pH está tamponado, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 7,2 a aproximadamente 7,6. Cualquier tampón capaz de mantener el pH dentro de este intervalo es adecuado; un tampón preferido es un tampón fosfato. La solución predominantemente monomérica puede incluir uno o más aditivos además de los monómeros. Los aditivos se pueden elegir para funciones tales como promover la polimerización, combinarse con los monómeros para formar un copolímero, o proporcionar un recubrimiento sobre las estructuras del polímero. En realizaciones en las que el polímero es colágeno, un aditivo preferido es uno o más glucosaminoglicanos seleccionados del grupo que consiste en hialuronano, sulfato de condroitina, sulfato de dermatán, sulfato de queratina o proteoglicanos seleccionados del grupo que incluye decorina, lumicano, biglicano, queratocán, sindicano y mezclas de los mismos. Se pueden elegir aditivos para modificar las propiedades físicas de la solución de monómero. Por ejemplo, se puede añadir glicerol para ajustar la viscosidad de la solución de monómero. En otras realizaciones, se puede añadir un tensioactivo para mejorar la humectación del sustrato.

La construcción de colágeno puede ser un gel de colágeno no orientado, una plantilla de colágeno derivada de tejido o una plantilla artificial nanoestructurada. Típicamente, la construcción de colágeno comprende un colágeno seleccionado del grupo que consiste en colágeno de tipo I, colágeno de tipo N y mezclas de los mismos, realizaciones preferidas, la construcción de colágeno comprende colágeno de tipo I. En otras realizaciones, la construcción de colágeno comprende una mezcla de colágeno de tipo I y colágeno de tipo N. Preferiblemente, la construcción comprende más colágeno de tipo I que colágeno de tipo N, en una realización preferida, la construcción comprende una mezcla de aproximadamente cuatro partes de colágeno de tipo I a aproximadamente una parte de colágeno de tipo N, en algunas realizaciones, la construcción de colágeno también puede incluir un colágeno que se selecciona del grupo que consiste en colágeno de tipo II, colágeno de tipo III, colágeno de tipo XI, colágeno de tipo IV y mezclas de los mismos. Las fibrillas de colágeno autoensambladas pueden ser homotípicas o heterotípicas. En una realización, el colágeno es colágeno de tipo I.

Los bloques de construcción de la matriz de fibrillas de colágeno utilizados para construir las composiciones de colágeno descritas en la presente memoria se pueden obtener de varias fuentes que incluyen, por ejemplo, piel porcina. Los tejidos adecuados útiles como material fuente que contiene colágeno para aislar colágeno o componentes de colágeno para elaborar las composiciones de colágeno descritas en la presente memoria son submucosa de vertebrados de sangre caliente o cualquier otro tejido que contenga matriz extracelular. Métodos adecuados para preparar submucosa se describen en las patentes de EE. UU. Nos. 4.902.508; 5.281.422. Y en la patente de EE. UU. Nº 5.275.826. Los tejidos que contienen material de matriz extracelular distinto del tejido submucoso pueden utilizarse para obtener colágeno de acuerdo con aún otras realizaciones divulgadas en la presente memoria. Los expertos en la técnica conocerán métodos para preparar tejido a partir de otro material de matriz extracelular para su uso en la obtención de colágeno purificado o componentes de matriz extracelular parcialmente purificados. Por ejemplo, patente de EE. UU. Nº 5.163.955 (tejido pericárdico); Patente de EE. UU. Nº 5.554.389 (submucosa de la vejiga); Nº 099.567 (submucosa gástrica); 6.576.265 (generalmente tejido de matriz extracelular); 6.793.939 (tejido de la membrana basal del hígado); 919, 121 (tejido basal del hígado); y WO 2001/45765 (generalmente tejido de matriz extracelular). En otras diversas realizaciones, el material fuente que contiene colágeno se puede seleccionar del grupo que consiste en tejido placentario, tejido ovárico, tejido uterino, tejido de la cola animal, tejido cutáneo, tejido óseo, tendinoso y cartilaginoso. En algunas realizaciones, el colágeno se selecciona de colágeno de piel porcina, colágeno bovino y colágeno humano; sin embargo, cualquier tejido que contenga matriz extracelular adecuado es colágeno purificado o extracelular parcialmente purificado de acuerdo con las presentes enseñanzas. Se entenderá y apreciará en la presente memoria que se puede utilizar como material fuente que contiene colágeno para aislar componentes de la matriz. En una realización, el colágeno es colágeno de tipo I aislado de tendones equinos.

Como se mencionó anteriormente, un bloque de construcción utilizado para preparar una matriz de fibrillas de colágeno es colágeno oligomérico. La presencia de colágeno oligomérico permite el autoensamblaje de bloques de construcción en la matriz de fibrillas de colágeno, aumenta la velocidad de ensamblaje, la composición de colágeno con una microestructura de fibrillas clara y una excelente integridad mecánica (por ejemplo, rigidez).

En algunas realizaciones, el bloque de construcción para la matriz de fibrillas de colágeno también incluye diversas proporciones de moléculas de colágeno solubles no oligoméricas. En una realización, el bloque de construcción comprende uno o ambos de telocolágeno y/o atelocolágeno. En determinadas realizaciones, el bloque de construcción comprende colágeno oligomérico y atelocolágeno. En otras realizaciones, el bloque de construcción comprende colágeno oligomérico y telocolágeno. En aún otras realizaciones, el bloque de construcción comprende colágeno oligomérico, telocolágeno, y atelocolágeno. La cantidad de colágeno oligomérico, telocolágeno, atelocolágeno y/u otras moléculas de colágeno solubles no oligoméricas puede

resultar de fibrillas de colágeno sintéticas resultantes de, por ejemplo, rigidez, resistencia, transporte de fluidos y masas, proteólisis y/o compatibilidad. Puede formularse en solución antes del inicio de la polimerización para ajustar una o más propiedades de la matriz. Se apreciará que la proporción predeterminada de moléculas de colágeno solubles oligoméricas a no oligoméricas para uso con un agente activo particular puede ser diferente de la adecuada para uso con un agente activo diferente.

La concentración de colágeno se puede expresar en masa/volumen o masa/masa. El contenido de colágeno se puede medir mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, ensayos colorimétricos calibrados tales como análisis de aminoácidos para rojo Sirio e hidroxiprolina. La viscosidad de una formulación de polímero de colágeno se ve afectada por varios factores que incluyen, pero sin limitarse a, solución o dispersión/suspensión, concentración, composición molecular, tamaño molecular, temperatura y condiciones operativas. Las mediciones de viscosidad se pueden obtener mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, viscosímetros o reómetros.

La concentración de colágeno soluble presente en la composición en la etapa (i) de la invención puede variar. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En aún otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. En otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,3 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml. En aún otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,4 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml. En aún otras realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,6 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,7 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,8 mg/ml a aproximadamente 6 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 0,9 mg/ml a aproximadamente 4 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 1,1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 1,2 mg/ml a aproximadamente 1,8 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 1,3 mg/ml a aproximadamente 1,7 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 1,4 mg/ml a aproximadamente 1,6 mg/ml. En algunas realizaciones, el colágeno está presente en una concentración de aproximadamente 1,5 mg/ml.

El pH de la solución de colágeno monomérico utilizada en la etapa (i) no es particularmente limitante siempre que sea lo suficientemente ácida como para evitar que el colágeno se asocie espontáneamente en fibrillas antes de la etapa (ii) o antes de ponerse en contacto con el probiótico. En una realización, el pH de la solución de colágeno monomérico es de aproximadamente 1 a 4. En una realización, el pH de la solución de colágeno monomérico es de aproximadamente 1,5 a 3,5. En una realización, el pH de la solución de colágeno monomérico es de aproximadamente 2 a 3. En una realización, el pH de la solución de colágeno monomérico es de aproximadamente 2,4 a 2,8. En una realización, el pH de la solución de colágeno monomérico es de aproximadamente 3 a 4. En una realización, el pH de la solución de colágeno monomérico es de aproximadamente 3,0.

En las realizaciones descritas en la presente memoria, la matriz de fibrillas de colágeno sintético puede tener un contenido de oligómero que se cuantifica por el peso molecular promedio del polímero (PMM). Como se describe en la presente memoria, la modulación de PMM depende de la cinética de polimerización de la matriz, la microestructura de las fibrillas, las propiedades moleculares y la estructura de las fibrillas, tal como la ramificación interfibrilar, el tamaño de poro y la integridad mecánica (por ejemplo, rigidez de la matriz). En otra realización, el contenido de oligómero de la composición de la prematriz cuantificado por el peso molecular promedio del polímero está correlacionado positivamente con la firmeza de la matriz.

En algunas realizaciones, el colágeno soluble no oligomérico incluido en la composición utilizada en la etapa (i) es colágeno reducido. Como se usa en la presente memoria, "colágeno reducido" significa colágeno que se ha reducido in vitro para eliminar o reducir sustancialmente los aldehídos reactivos. Por ejemplo, el colágeno se puede reducir in vitro mediante el tratamiento del colágeno con un agente reductor (por ejemplo, borohidruro de sodio).

La pureza de la matriz de fibrillas de colágeno de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación se determina mediante SDS-PAGE, mapeo de péptidos, secuencia amino terminal directamente en el polímero de colágeno o después de una escisión de enzima específica (colagenasa bacteriana) o química (bromociano). Determinación, y puede evaluarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin

limitarse a, ensayos de impurezas sin colágeno. Los métodos para caracterizar la matriz de fibrillas de colágeno incluyen HPLC de intercambio catiónico, fluorescencia natural, LC/MS, MS, dispersión dinámica de luz, cromatografía de tamiz molecular, medición de viscosidad, dicroísmo circular, calorimetría diferencial de barrido, tripsina. Incluyendo, pero sin limitarse a, sensibilidad, perfilado de impurezas, TEM, SEM, crio-SEM, microscopía confocal, microscopía multifotónica y microscopía de fuerza atómica.

La proporción de probióticos con respecto a colágeno en la etapa (i) del método de acuerdo con la invención no es particularmente limitante siempre que el número sea suficiente para que después de la etapa (iii) de los métodos de la invención, se encuentre un número suficiente de microorganismos probióticos en el biocompuesto para lograr el efecto deseado. En una realización, la población de bacterias probióticas se pone en contacto con los monómeros de colágeno en una proporción de aproximadamente 10^4-10^{14} UFC de microorganismos probióticos por cada mg de colágeno. En una realización, la población de bacterias probióticas se pone en contacto con los monómeros de colágeno en una proporción de aproximadamente 10^5-10^{13} UFC de microorganismos probióticos por cada mg de colágeno. En una realización, la población de bacterias probióticas se pone en contacto con los monómeros de colágeno en una proporción de aproximadamente 10^6-10^{12} UFC de microorganismos probióticos por cada mg de colágeno. En una realización, la población de bacterias probióticas se pone en contacto con los monómeros de colágeno en una proporción de aproximadamente 10^7-10^{11} UFC de microorganismos probióticos por cada mg de colágeno. En una realización, la población de bacterias probióticas se pone en contacto con los monómeros de colágeno en una proporción de aproximadamente 10^8-10^{10} UFC de microorganismos probióticos por cada mg de colágeno. En una realización, la población de bacterias probióticas se pone en contacto con los monómeros de colágeno en una proporción de aproximadamente 10^9-10^{10} UFC de microorganismos probióticos por cada mg de colágeno. En una realización, la población de bacterias probióticas se pone en contacto con los monómeros de colágeno en una proporción de aproximadamente 6 × 10^9- UFC de microorganismos probióticos por cada 1,0 mg de colágeno.

En la etapa ii) la mezcla obtenida en la etapa i) se incuba en condiciones adecuadas para el autoensamblaje de los monómeros de colágeno en fibras de colágeno, obteniendo así fibras de colágeno que contienen bacterias probióticas atrapadas.

La cinética de polimerización se puede modular controlando parámetros tales como el pH, la temperatura y la concentración de monómero. En diferentes realizaciones, la concentración de monómero es como se ha definido anteriormente. En realizaciones preferidas, se controlan los parámetros de caudal de la solución, viscosidad de la solución y velocidad de rotación del sustrato. Típicamente, la solución que se forma en la etapa (ii) tiene un pH de aproximadamente 6 a 9, de aproximadamente 6,5 a 8,5, de aproximadamente 7 a 8, de aproximadamente 7,2 a 7,8, de aproximadamente 7,4 a 7,7 o de aproximadamente 7,6.

Típicamente, los parámetros de caudal de la solución, viscosidad de la solución y velocidad de rotación del sustrato se controlan para producir una velocidad de cizallamiento entre 1 s^{-1} y 500.000 s^{-1}, preferiblemente entre 10 s^{-1} y 10.000 s^{-1}. En algunas realizaciones, el flujo de solución se controla a una velocidad constante de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 1000 ml/min, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 ml/min. En otras realizaciones, la viscosidad de la solución se controla en el rango de aproximadamente 1 mPa-s. En una realización, la viscosidad es de aproximadamente 10 mPa-s.

La etapa (ii) del método de acuerdo con la invención se deja proceder durante un tiempo predefinido o bajo monitorización continua hasta que se haya ensamblado en fibras un porcentaje suficiente de los monómeros de colágeno. Las estructuras formadas en la etapa (ii) se caracterizan usando métodos bien conocidos para caracterizar las características microestructurales de la matriz de fibrillas de colágeno que incluyen microscopía electrónica de barrido ambiental o crioetapa, microscopía electrónica de transmisión, espectroscopia infrarroja (FTIR) y a escala molecular mediante difracción de rayos X.

En una realización, se permite que la etapa (ii) proceda hasta que se formen las estructuras que, cuando se analizan por FTIR, muestran picos a 1030 y 1078 cm^{-1} correspondientes al tramo de C-O de los grupos de hidratos de carbono (v(C-O) y amplias bandas de absorciones centradas en 1650, 1550 y 1240 cm^{-1} que surgen de las amidas I, II y III, respectivamente.

En una realización, se permite que la etapa (ii) proceda hasta que se formen las estructuras que, cuando se analizan por análisis termogravimétrico (TGA), muestran la pérdida de agua entre la temperatura ambiente y 150 °C y la descomposición del colágeno entre 230 y 600 °C. Alternativa o adicionalmente, las estructuras formadas después de la etapa (ii) pueden caracterizarse por una pérdida de peso de entre 180 y 240. Esto se aplica a los bicompuestos Col-Lf, que surgen de la descomposición de Lf.

En una realización, se permite que la etapa (ii) proceda hasta que se formen las estructuras que, cuando se analizan por análisis de difracción de rayos X, muestran un patrón de difracción caracterizado por la presencia de un pico amplio centrado a aproximadamente q = 13,25 nm^{-1} (dando como resultado un espaciado d de 0,47 nm) asociado a la dispersión difusa de las fibras de colágeno y un pico de Bragg a q = 5,46 nm^{-1} (dando como

resultado un espaciado d de 1,15 nm), que corresponde a la separación promediada molécula-molécula ecuatorial (es decir, el espaciado lateral intermolecular).

Las propiedades de tracción, compresión y viscoelásticas se pueden determinar mediante reometría o pruebas de tracción. Todos estos métodos son conocidos en la técnica. Las características del colágeno y los métodos para caracterizar las características del colágeno se analizan en ASTM International F3089-14, 2014 West Conshohocken PA. En ciertos aspectos de la presente divulgación, la matriz de fibrillas de colágeno sintético exhibe una rigidez de al menos 5 Pa. En otra realización, la matriz de fibrillas de colágeno sintético exhibe una firmeza de entre 5 Pa y 100 GPa. La rigidez también puede denominarse elasticidad o módulo lineal.

En una realización, se forman fibras que muestran un diámetro de entre 10 y 900 nm, más preferiblemente entre 50 y 800 nm, más preferiblemente entre 100 nm y 700 nm, más preferiblemente entre 150 y 600 nm e incluso más. preferentemente entre 200 y 500 nm.

En una realización, se forman fibrillas de colágeno que muestran un patrón de bandas D escalonado periódico de 67 nm.

En una realización, la etapa ii) del método de acuerdo con la invención se realiza bajo agitación continua. Normalmente se emplea agitación mecánica.

En la etapa (iii), las fibrillas de colágeno que contienen bacterias probióticas atrapadas obtenidas en la etapa (ii) se mantienen en condiciones adecuadas para la formación de exopolisacárido (EPS) por los probióticos hasta que el contenido de EPS en el biomaterial con respecto al contenido de colágeno del biomaterial medido como el contenido de azúcar sea de al menos el 2% (p/p).

Típicamente, las "condiciones adecuadas para la formación de exopolisacárido (EPS)" son condiciones que son adecuadas para la proliferación de las bacterias probióticas que están atrapadas en las fibrillas de colágeno. Esto normalmente requiere mantener las fibras de colágeno en un medio de cultivo que sea adecuado para el crecimiento de las bacterias probióticas que quedan atrapadas en las fibras de colágeno. El medio de cultivo adecuado para ser utilizado en la etapa (iii) incluye cualquier medio de cultivo que sea capaz de producir concentraciones celulares de alrededor de 10^9 ufc/ml. En realizaciones preferidas, cuando la población de bacterias probióticas contiene bacterias de ácido láctico, el medio de cultivo es medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS), medio clostridial reforzado (RCM), M17 o infusión de cerebro y corazón ((BHI - Brain Heart Infusion), medio HANK'S, medio APT, medio LM17, medio GM17 y medio Elliker. En otras realizaciones, cuando la población de bacterias probióticas contiene Bifidobacterium, el medio de cultivo que se va a utilizar en la etapa (iii) incluye MRS, levadura triptona fitona (TPY), glucosa hepática en sangre (BL), columbia (CLB), cisteína lactosa de hígado (LCL), MRS modificada (mMRS), MRS modificada y sangre (mMRS + sangre), BL modificada con sangre (mBL), RCM modificada (mRCM), RCPB y similares. Puede encontrarse una descripción del medio MRS y otros medios apropiados para el cultivo de bacterias de ácido láctico y bifidobacterias en Handbook of Culture Media for Food Microbiology, vol. 34, editado por Janet EL Corry, GDW Curtis, Rosamund M. Baird.

La etapa (iii) se lleva a cabo durante tanto tiempo como sea necesario hasta que el contenido de azúcares en el biocompuesto sea de al menos el 2% (p/p) con respecto al contenido de colágeno. El contenido de azúcar, que refleja el contenido de EPS en el biocompuesto, se determina usando cualquier método conocido en la técnica para medir el contenido total de azúcar en una muestra. En una realización preferida, el contenido de azúcar en el biocompuesto se determina usando el método estándar de fenol-ácido sulfúrico (DuBois, K. A. et al., Anal. Chem. 1956, 28, 350). En una realización, se permite que la etapa (iii) proceda hasta que el contenido de azúcar en el biocompuesto si es de al menos el 2,5% (p/p), al menos el 3%, al menos el 3,5%, al menos el 4%, al menos el 4,5%, al menos el 5%, al menos el 5,5%, al menos el 6%, al menos el 6,5%, al menos el 7%, al menos el 7,5%, al menos el 8%, al menos el 8,5%, al menos el 9%, al menos el 9,5%, al menos el 10%, al menos el 11%, al menos el 12%, al menos el 13%, al menos el 14%, al menos el 15%, al menos el 16%, al menos el 17%, al menos el 18%, al menos el 19%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 50% o más, todos estos valores se refieren en p/p con respecto al contenido de colágeno en el biocompuesto. Se entenderá que la progresión de la etapa (iii) también puede monitorizarse mediante SEM detectando la formación de una red en el biomaterial que corresponde al EPS.

Se entenderá que el método de acuerdo con la presente invención da como resultado un biomaterial en el que una fracción sustancial de los probióticos atrapados en el andamio de colágeno permanecen viables. La referencia en la presente memoria a un probiótico que "permanece viable" después de la etapa (iii) del método de acuerdo con la invención significa que es posible cultivar los probióticos. Aunque esto no significa que todas las células probióticas del biomaterial obtenido después de la etapa (iii) sigan siendo viables, debe interpretarse como que se pueden cultivar cantidades detectables del probiótico.

En diferentes realizaciones, después de la etapa (iii), al menos el 100%, al menos el 99,9%, al menos el 99,8%, al menos el 99,7%, al menos el 99,6%, al menos el 99,5%, al menos el 99,4%, al menos el 99,3%, al menos el

99,2%, al menos el 99,1%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 65%, al menos el 60% o al menos el 50% de los probióticos en el biomaterial son viables durante al menos 6 meses a 25 °C y el 60 por ciento de humedad relativa, tal como al menos 24 meses, tal como al menos 20 meses, tal como al menos 16 meses, tal como al menos 12 meses, tal como al menos 8 meses, tal como al menos 5 meses, tal como al menos 4 meses, tal como al menos 3 meses, tal como al menos 2 meses, tal como al menos 1 mes, tal como al menos 14 días, o tal como durante de 14 días a 24 meses, tal como durante de 14 días a 16 meses, tal como durante de 14 días a 8 meses, tal como como de 14 días a 4 meses, tal como de 14 días a 2 meses, tal como de 14 días a 1 mes.

Cualquier método conocido en la técnica para determinar la viabilidad de una población de probióticos se puede utilizar para determinar el contenido de probióticos viables en el biomaterial, tal como el método divulgado en el ejemplo 2 basado en la determinación de la capacidad reductora de bacterias y la correlación entre la actividad y la actividad metabólica, utilizando un polioxometalato electrocrómico (POM) (González, N. et al. Chem. Commun. 2015, 51). Una vez reducido, el POM presenta una banda de absorción en el espectro UV-vis centrada en 820 nm.

Biocompuestos de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que el método como se ha definido anteriormente da como resultado un material biocompuesto que muestra ciertas propiedades inesperadas en términos de preservación de la viabilidad de los probióticos atrapados en el mismo incluso después del almacenamiento en condiciones duras.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere a un biomaterial que se puede obtener mediante un método de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un biomaterial que comprende un andamio de colágeno, probióticos y exopolisacárido (EPS). En una realización, el andamio de colágeno comprende fibrillas de entre 100 y 500 nm de diámetro. En otra realización, el andamio de colágeno comprende fibrillas caracterizadas por un patrón de bandas D escalonado periódico de 67 nm. En otra realización, el contenido de azúcar en el biomaterial con respecto al contenido de colágeno del biomaterial medido es de al menos un 2% (p/p).

El término "probiótico" se ha explicado en detalle en el contexto del método para producir el biomaterial de acuerdo con la invención y se utiliza con el mismo significado en el contexto del biomaterial de acuerdo con la invención. En realizaciones preferidas, el probiótico es una bacteria de ácido láctico, una *Bifidobacterium* o una combinación de ambas. En una realización más preferida, el Lactobacillus se selecciona de *L. fermentum*, *L. acidophilus L. crispatus, L. jensenii* y, *L. gasseri* o en donde la Bifidobacterium se selecciona de *B. breve, B. longum, B. bifidum y B. dentium* o cualquier combinación de los mismos. En una realización aún más preferida, el probiótico es *L. fermentum* y/o *L acidophilus* y más particularmente, *L. fermentum* CECT5716 y/o *L. acidophilus* CECT903 o una combinación de los mismos.

En el biomaterial, una facción sustancial de los probióticos atrapados en el andamio de colágeno permanece viable. En diferentes realizaciones, al menos el 100%, al menos el 99,9%, al menos el 99,8%, al menos el 99,7%, al menos el 99,6%, al menos el 99,5%, al menos el 99,4%, al menos el 99,3%, al menos el 99,2%, al menos el 99,1%, al menos el 90%, al menos el 85%, al menos el 80%, al menos el 75%, al menos el 70%, al menos el 65%, al menos el 60% o al menos el 50% de los probióticos en el biomaterial son viables durante al menos 6 meses a 25 °C y el 60 por ciento de humedad relativa, tal como al menos 24 meses, tal como al menos 20 meses, tal como al menos 16 meses, tal como al menos 12 meses, tal como al menos 8 meses, tal como al menos 5 meses, tal como al menos 4 meses, tal como al menos 3 meses, tal como al menos 2 meses, tal como al menos 1 mes, tal como al menos 14 días, o tal como durante de 14 días a 24 meses, tal como durante de 14 días a 16 meses, tal como durante de 14 días a 8 meses, tal como como de 14 días a 4 meses, tal como de 14 días a 2 meses, tal como de 14 días a 1 mes.

El término "andamio de colágeno", como se usa en la presente memoria, se refiere a una matriz que resulta del ensamblaje espontáneo de monómeros de colágeno cuando se coloca en un medio ligeramente ácido, neutro o ligeramente alcalino. El término "monómero de colágeno" se ha explicado en detalle anteriormente en el contexto del método para obtener los biocompuestos y se aplica igualmente al presente caso. En una realización preferida, el andamio de colágeno se obtiene a partir de colágeno de tipo I.

La concentración adecuada de probióticos en el biocompuesto es de al menos 6 x 10^{12} UFC por gramo de colágeno.

En una realización, el andamio de colágeno se caracteriza por que muestra picos a aproximadamente 1030 y 1080 cm^{-1} correspondientes a la tensión C-O de los grupos de hidratos de carbono (ν(CO)) y bandas de absorciones amplias centradas en 1650, 1550 y 1240 cm^{-1} que surgen de las amidas I, II y III, respectivamente, cuando se analizan por FTIR. En otra realización, el andamio de colágeno se caracteriza por que muestra un

pico amplio centrado a aproximadamente q = 13,25 nm^{-1} y un pico de Bragg a q = 5,46 nm^{-1} , lo que da como resultado un espaciado d de 0,47 y 1,15 nm, respectivamente, cuando se analiza por difracción de rayos X. En otra realización, el andamio de colágeno se caracteriza por que muestra la pérdida de agua entre temperatura ambiente y 150 °C y la descomposición del colágeno entre 230 y 600 °C cuando se analiza por análisis termogravimétrico.

El término "exopolisacárido", como se usa en la presente memoria, se refiere a polímeros naturales de alto peso molecular compuestos de restos de azúcar y secretados por microorganismos en su entorno. Los exopolisacáridos pueden denominarse indistintamente polisacáridos extracelulares (EPS). Los EPS establecen la integridad funcional y estructural de las biopelículas, y se consideran el componente fundamental que determina las propiedades fisicoquímicas de una biopelícula. Los EPS constituyen del 50 por ciento al 90 por ciento de la materia orgánica total de una biopelícula. Sin embargo, algunos exopolisacáridos también comprenden sustituyentes que no son hidratos de carbono (tales como acetato, piruvato, succinato y fosfato).

Los exopolisacáridos de ejemplo incluyen, sin limitación, acetano (*Acetobacter xylinum*), alginato (*Azotobacter vinelandii*), celulosa (*Acetobacter xylinum*), quitosano (Mucorales sp.), curdlan (*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*), ciclosporanos (*Agrobacterium* sp., *Rhizobium* sp. y *Xanthomonas* sp.), dextrano (*Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc dextranicum* y *Lactobacillus hilgardii*), emulsano (*Acinetobacter calcoaceticus*), galactoglucopolisacáridos (*Achromobacter* sp., *Agrobacterium radiobacter, Pseudomonas marginalis, Rhizobium* sp. y Zooglea sp.), gellan (*Aureomonas elodea* y *Sphingomonas paucimobilis*), glucuronano (*Sinorhizobium meliloti*), N-acetilglucosamina (*Staphylococcus epidermidis*), N-acetil-heparosano (*Escherichia coli*), ácido hialurónico (*Streptococcus equi*), indicano (*Beijerinckia indica*), kefirano (*Lactobacillus hilgardii*), lentinano (*Lentinus elodes*), levano (*Alcaligenes viscosus, Zymomonas mobilis, Bacillus subtilis*), pululano (*Aureobasidium pullulans*), escleroglucano (*Sclerotium rolfsii, Sclerotium delfinii* y *Sclerotium glucanicum*), esquizofilano (*Schizophylum commune*), stewartano (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*), succinoglicano (*Alcaligenes faecalis* var *myxogenes, Sinorhizobium meliloti*), xantano (*Xanthomonas campestris*) y welan (*Alcaligenes* sp.).

Los EPS adecuados encontrados en los biocompuestos de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier EPS que sea producido por una o más de las cepas probióticas que forman la población de células probióticas. En el caso particular de que la población de células probióticas comprenda bacterias de ácido láctico (BAL), el EPS que forma parte de los biocompuestos puede ser un homopolisacárido (HoPS), un heteropolisacárido (HePS) o una mezcla de los mismos.

El biomaterial de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el HoPS se selecciona entre α-glucanos, β-glucanos y β-fructanos, y el HePS comprende cualquiera de D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa y monosacáridos N-acetilados seleccionados de N-acetil-glucosamina (GluNAc), N-acetil-galactosamina (GalNAc), fucosa, ácido glucurónico, glicerol y manosa.

Los HoPS están compuestos de un tipo de monosacáridos constituyentes (D-glucopiranosa o D-fructofuranosa) e incluyen, sin limitación, α-glucanos, β-glucanos y β-fructanos, y el HePS comprenden cualquiera de D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa y monosacáridos N-acetilados seleccionados de N-acetil-glucosamina (GluNAc), N-acetil-galactosamina (GalNAc), fucosa, ácido glucurónico, glicerol y manosa.

En otras realizaciones, los EPS que forman parte de los biocompuestos de acuerdo con la invención incluyen uno o más de los HoPS resumidos en la Tabla 2 de Ruas-Madiedo et al. (International Dairy Journal, 2002, 12, 163-171) y que incluyen:

- α-D-glucanos, incluidos dextrano, mutano, alternano,
- β-D-glucanos,
- Fructanos, incluidos levanos y similares a la inulina.
- poligalactano

Los HePS están compuestos por una cadena principal de subunidades repetidas, que están ramificadas (en las posiciones C2, C3, C4 o C6) o no ramificadas y que constan de tres a ocho monosacáridos, derivados de monosacáridos o monosacáridos sustituidos.

En algunas realizaciones, los HoPS y HePS que forman parte de los biocompuestos de acuerdo con la presente invención incluyen cualquiera de las moléculas que se muestran en la Tabla 1 en de Vuyst et al. (International Dairy Journal, 2001, 11, 687-707).

Estos incluyen HoPS y HePS en los que las unidades repetidas comprenden glucosa (Glc), GlcNAc (N-acetilglucosamina), galactosa (Gal), GalNAc (N-acetilgalactosamina), ramnosa (Rha) y fucosa (Fuc) en

diferentes combinaciones y en los que las unidades que se repiten son trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos, pentasacáridos y octasacáridos.

En otras realizaciones, los HoPS y HePS que forman parte de los biocompuestos de acuerdo con la presente invención incluyen cualquiera de las moléculas que se muestran en la Tabla 4 en Vaningelgem et al. (Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70:900-912). Estos incluyen EPS compuestos de galactosa y glucosa (Grupo I), galactosa y ramnosa (Grupo II), galactosa, glucosa y N-acetilgalactosamina (Grupo III), galactosa, glucosa y ramnosa (Grupo IV), galactosa, glucosa, N-acetilgalactosamina. y ramnosa (Grupo V) o galactosa, glucosa y N-acetilglucosamina (Grupo VI).

En otras realizaciones, los HePS que forman parte de los biocompuestos de acuerdo con la presente invención incluye cualquiera que tenga cualquiera de las unidades repetitivas resumidas en la Tabla 2 de Ruas-Madiedo et al. (International Dairy Journal, 2002, 12, 163-171).

En una realización, los EPS que forman parte de los biocompuestos de acuerdo con la invención se seleccionan de dextrano, levano, mutano, alternano, reuterano y similares a la inulina. En otra realización, el EPS es dextrano, levano o una combinación de los mismos.

El contenido de EPS en los biocompuestos según la invención no es particularmente limitante. El contenido de EPS se puede determinar midiendo el contenido de azúcar en el biocompuesto determinado usando cualquier método conocido en la técnica para medir el contenido total de azúcar en una muestra. En algunas realizaciones, el contenido de azúcar en el biocompuesto puede ser de al menos el 2%, al menos el 2,5%, al menos el 3%, al menos el 3,5%, al menos el 4%, al menos el 4,5%, al menos el 5%, al menos el 5,5%, al menos el 6%, al menos el 6,5%, al menos el 7%, al menos el 7,5%, al menos el 8%, al menos el 8,5%, al menos el 9%, al menos el 9,5%, al menos el 10%, al menos el 11%, al menos el 12%, al menos el 13%, al menos el 14%, al menos el 15%, al menos el 16%, al menos el 17%, al menos el 18%, al menos el 19%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 50% o más, todos estos valores se refieren en p/p con respecto al contenido de colágeno en el biocompuesto.

Usos médicos y composiciones farmacéuticas de los biocompuestos de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto que los biocompuestos de la invención se pueden unir a mucina porcina, siendo dicha adhesión parcialmente dependiente de la presencia de colágeno en la solución. Además, los biocompuestos de la invención también son capaces de restaurar las condiciones sanas a partir de un fluido que imita el fluido que aparece en la vaginosis bacteriana al inducir un cambio del pH de 5 que aparece en condiciones patológicas a un valor de pH de 4 que corresponde a condiciones sanas. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, este cambio de pH se debe ciertamente al ácido láctico excretado por las bacterias probióticas, de acuerdo con las evidencias anteriores de que las bacterias permanecen vivas y activas una vez atrapadas en la matriz de colágeno. Curiosamente, la caída en el pH con *Lf* y *La* sin colágeno fue mucho más lenta y no alcanzó el valor de pH sano de 4,0.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se refiere a un biomaterial de acuerdo con la invención para uso en medicina. En otra realización, la invención se refiere a un biomaterial o biocompuesto de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de una disbiosis vaginal, preferiblemente una infección vaginal. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de una disbiosis vaginal, más preferiblemente una infección vaginal, en un sujeto que comprende la administración del biomaterial o material biocompuesto de acuerdo con la presente invención.

Como se usa en la presente memoria, "prevenir" o "prevención" se refiere a cualquier metodología en la que el estado de la enfermedad no ocurre debido a las acciones de la metodología (tal como, por ejemplo, la administración de un probiótico y/o un prebiótico como se describe en esta memoria). En un aspecto, se entiende que la prevención también puede significar que la enfermedad no se establece en la medida en que ocurre en los controles no tratados. Por ejemplo, puede haber una reducción del 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100% en el establecimiento de la frecuencia de la enfermedad con respecto a controles no tratados. Por consiguiente, la prevención de una enfermedad abarca una reducción en la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad, en relación con un sujeto no tratado (por ejemplo, un sujeto que no recibe un probiótico y/o un prebiótico como se describe en la presente memoria).

"Tratamiento", "tratar" o "que trata" significa un método para reducir los efectos de una enfermedad o condición. El tratamiento también puede referirse a un método para reducir la enfermedad o condición en sí, en lugar de solo los síntomas. El tratamiento puede ser cualquier reducción de los niveles previos al tratamiento y puede ser, pero sin limitarse a, la ablación completa de la enfermedad, condición o los síntomas de la enfermedad o condición. Por lo tanto, en los métodos divulgados, el "tratamiento" se puede referir a una reducción del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en la gravedad de una enfermedad o condición establecida o la progresión de la enfermedad. Por ejemplo, un método divulgado para reducir los efectos de una infección vaginal se considera que es un tratamiento si hay una reducción del 10% en uno o más síntomas

de la enfermedad en un sujeto con la infección cuando se compara con los niveles previos al tratamiento en el mismo sujeto o sujetos de control. Por lo tanto, la reducción puede ser del 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% o cualquier cantidad de reducción intermedia en comparación con los niveles nativos o de control. Se entiende y se contempla en la presente memoria que "tratamiento" no se refiere necesariamente a una cura de la enfermedad o condición, sino a una mejora en el pronóstico de una enfermedad o condición (por ejemplo, vaginosis bacteriana).

El término "disbiosis" o "condición disbiótica" se define como un estado en el que la microbiota produce efectos nocivos a través de (a) cambios cualitativos y cuantitativos en el contenido o cantidad de la propia microbiota, (b) cambios en sus actividades metabólicas; y/o (c) cambios en su distribución local. Específicamente, la disbiosis de la vagina se define como una aberración del estado sano. Un estado sano se define en este caso como una condición con una susceptibilidad relativamente baja a enfermedades de transmisión sexual. Se ha aceptado ampliamente que la actividad de Lactobacillus spp. contribuye a mantener esta baja susceptibilidad mediante la protección del entorno vaginal contra patógenos mediante la producción de ácido láctico, lo que resulta en un pH bajo. Por tanto, la disbiosis vaginal se caracteriza, entre otras cosas, por la presencia de un pH relativamente alto.

En una realización, la disbiosis vaginal es una infección vaginal.

El término "infección vaginal", como se usa en la presente memoria, se refiere a un trastorno o enfermedad que resulta del crecimiento no deseado de un patógeno en la vagina seleccionado del grupo que comprende: *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Gardnerella vaginalis, Trichomonas vaginalis, Neisseria gonorrhoeae, Escherichia coli,* Herpes simplex y *Hemophilus ducreyie.* El término incluye, sin limitación, candidiasis, vaginitis, vulvovaginitis y vaginosis bacteriana.

En una realización, el biomaterial para uso de acuerdo con la presente invención se usa para el tratamiento de una infección seleccionada entre vaginosis bacteriana, vaginitis por tricomonas o candidiasis. En otra realización más, el biomaterial para uso de acuerdo con la presente invención se usa en el tratamiento de una infección causada por una bacteria, levadura o parásito protozoario.

En una realización, la infección es causada por un crecimiento excesivo de levadura en el área vulvovaginal, en cuyo caso las composiciones de acuerdo con la presente invención se usan "infección vaginal por levadura". Las infecciones vaginales por levaduras generalmente son provocadas por un crecimiento excesivo de la levadura Candida, tales como, pero sin limitarse a, organismo comensal *Candida albicans.* Otras especies de Candida implicadas en las infecciones vaginales por levaduras incluyen, pero no se limitan a, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida tropicalis.* La infección vaginal por levaduras puede denominarse "candidiasis vaginal" o "vaginitis candidal". Las infecciones vaginales por levaduras también pueden estar provocadas por levaduras que no son Candida, tales como especies de Trichosporon, tales como Trichosporon beigelii y Sacharomyces cereviasae. Los síntomas de las infecciones vaginales por levaduras son irritación vaginal, secreción y picazón intensa en la vagina y la vulva. Como es el caso de la VB, los antibióticos de amplio espectro, los espermicidas, las hormonas y otros factores, aún no completamente comprendidos, pueden causar la alteración de la flora bacteriana normal, lo que da lugar a infecciones vaginales por levaduras. Las infecciones vaginales por levaduras también son comunes en sujetos inmunoafectados.

En otra realización, la infección es vaginosis bacteriana.

El término "vaginosis bacteriana", abreviado como "VB", y términos similares deben entenderse en el sentido amplio como las alteraciones de la composición de la flora bacteriana vaginal en un sujeto femenino, en comparación con una composición de la flora bacteriana vaginal de línea base, de referencia o "normal". La VB no se limita a una composición de flora bacteriana vaginal específica ni a ningún síntoma particular observado en un sujeto femenino o población de sujetos femeninos particular. El término "vaginosis" definido en la presente memoria comprende una vaginosis seleccionada de vaginosis bacteriana, vaginitis fúngica o vaginitis por Tricomonas, preferiblemente, una vaginosis provocada por Gardnerella vaginalis, *Bacterioid fragilis*, *Tricomonas vaginalis*, *Candida albicans, Streptococcus agalactiae, Streptococcus aureus, Staphylococcus aureus, Neisseria gonorrhoeae, Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosao Salmonella typhimurium*, y similares. En una realización, la vaginosis bacteriana está provocada por un crecimiento excesivo de la flora vaginal normal seleccionada entre *Gardnerella vaginalis* o Mobiluncus spp.

En la presente memoria se proporcionan procesos para usar las formulaciones vaginales probióticas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las formulaciones vaginales probióticas se usan para acidificar o mantener la acidez del entorno vaginal. Por consiguiente, las formulaciones vaginales probióticas se pueden usar en los métodos de modulación de la acidificación, incluyendo aumento de la acidez, mantenimiento de la acidez o disminución de la acidez o el pH vaginal. En algunas realizaciones, las formulaciones vaginales probióticas se usan para establecer o mejorar la flora vaginal, por ejemplo, aumentando los niveles de Lactobacilli en la flora

vaginal o disminuyendo los niveles de levadura, tal como levadura Candida. Las formulaciones vaginales probióticas también se pueden usar en métodos para tratar, aliviar, prevenir o reducir la probabilidad de infecciones urogenitales o condiciones inflamatorias, incluyendo vaginitis, infecciones del tracto urinario, atrofia vaginal e inflamación posquirúrgica en un sujeto. Por ejemplo, las formulaciones vaginales probióticas se pueden usar en los métodos de tratamiento, alivio, prevención o reducción de la probabilidad de vaginitis o sus síntomas, tales como sequedad vaginal, ardor o picazón en un sujeto. En el contexto de los métodos anteriores, la vaginitis puede tener diversas etiologías, tales como, pero sin limitarse a, VB, infección por levaduras o atrofia vaginal. La vaginitis o los síntomas relacionados con la vaginitis o similares a la vaginitis también pueden ser de etiología desconocida. En otro ejemplo, las formulaciones vaginales probióticas se pueden usar en los métodos de tratamiento, alivio, prevención o reducción de la probabilidad de sequedad vaginal de diversas etiologías, tales como, pero sin limitarse a, VB, infección por levaduras, traumatismos, efectos secundarios de medicación o atrofia vaginal. En otro ejemplo, las formulaciones vaginales probióticas se pueden usar en los métodos de tratamiento, alivio, prevención o reducción de la probabilidad de inflamación urogenital, incluyendo inflamación vulvovaginal de diversas etiologías, tales como, pero sin limitarse a, infección, irritación, traumatismo, tal como traumatismo posquirúrgico o de parto. Uno o más usos de las formulaciones vaginales probióticas pueden describirse como adecuados para mejorar, mantener o lograr la salud vaginal.

Los procesos o métodos de uso de las formulaciones vaginales probióticas incluyen la etapa de administrar por vía vaginal al sujeto una formulación vaginal probiótica en una cantidad eficaz. La cantidad eficaz puede variar en base al efecto deseado, la formulación específica, la forma de dosificación, el régimen de dosificación y otros factores. Por ejemplo, la formulación, en forma de dosificación unitaria de cápsulas, se puede administrar en una cantidad de 1 a 5 cápsulas por día, incluyendo, por ejemplo, 1 o 2 cápsulas por día. El período de administración puede ser durante al menos 1 día, al menos 3 días, al menos 6 días, o según lo prescrito por un médico o hasta que se logre la mejoría o reducción de los síntomas.

Los métodos terapéuticos de acuerdo con la presente invención comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del biomaterial o biocompuestos probióticos de la invención a un sujeto que lo necesite.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad suficiente de la bacteria o cultivo de la invención para proporcionar el efecto deseado y generalmente estará determinada por, entre otras causas, las características de la bacteria o cultivo de la propia invención y del efecto terapéutico a conseguir. También dependerá del sujeto a tratar, la gravedad de la enfermedad que padezca dicho sujeto, la forma de dosificación elegida, etc. Por esta razón, las dosis mencionadas en esta invención deben considerarse únicamente como guías para el experto en la materia, quien debe ajustar las dosis dependiendo de las variables mencionadas anteriormente. En una realización, la cantidad eficaz produce la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad que se está tratando, por ejemplo, la normalización de los niveles del metal que era deficiente en el sujeto.

El término "sujeto" se utiliza en el presente documento para describir un humano o un animal. En el contexto de las realizaciones de los presentes productos, formulaciones y procesos, "sujeto" indica un mamífero hembra, tal como un humano, a quien se administran las composiciones por vía vaginal. Los sujetos femeninos pueden tener o estar en riesgo de desarrollar una enfermedad o condición particular, por ejemplo, una infección urogenital, tal como vaginitis. Por ejemplo, los sujetos femeninos pueden estar en riesgo de recurrencia de una infección urogenital o vaginitis, en base a su historial médico, uso de antibióticos, uso de espermicidas o estilo de vida (por ejemplo, hábitos sexuales). Los sujetos femeninos también pueden tener o desear prevenir una infección urogenital o vaginitis o síntomas de las mismas, una infección urogenital sospechosa o vaginitis sospechosa, y síntomas similares a una infección urogenital o similares a vaginitis, incluso en ausencia de un diagnóstico formal o de infección urogenital completa o vaginitis.

Para que el biomaterial o material biocompuesto de la invención sea administrado, tiene que estar formulado como un producto adecuado para la administración vaginal, es decir, como un producto vaginal o formulación vaginal. Así, en otra realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el biomaterial de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para administración vaginal.

El término "producto vaginal" o "formulación vaginal" se usa en la presente memoria para referirse a composiciones de materia en una forma de dosificación adecuada para administración vaginal. Los términos "producto vaginal probiótico" y "formulación vaginal probiótica" se refieren a una composición de materia en una forma de dosificación adecuada para administración vaginal y que comprende un probiótico. Algunos ejemplos de formulaciones vaginales son supositorios (incluyendo, pero sin limitarse a, cápsulas y comprimidos), tampones, soluciones, polvos, ungüentos, cremas y espumas en aerosol.

El término "administración vaginal" incluye "administración transvaginal" y "administración intravaginal", que se refieren a vías de administración, en las que una sustancia, una composición o una formulación se aplica dentro de una cavidad vaginal o área vulvovaginal o a través de la vagina a otras partes del tracto urogenital.

Las composiciones probióticas para administración tópica se pueden aplicar en forma de cremas o ungüentos. Como tales, idealmente comprenderán una sustancia oleosa procedente de fuentes vegetales, marinas o animales. El aceite líquido adecuado incluye aceites saturados, insaturados o poliinsaturados. A modo de ejemplo, el aceite insaturado puede ser aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de canola, aceite de semilla de algodón, aceite de coco, aceite de sésamo, aceite de girasol, aceite de semilla de borraja, aceite de Syzigium aromaticum, aceite de semilla de cáñamo, aceite de arenque, aceite de hígado de bacalao, aceite de salmón, aceite de linaza, aceite de germen de trigo, aceites de onagra o mezclas de los mismos, en cualquier proporción. Estas cremas o ungüentos pueden comprender además ácidos grasos poliinsaturados. En una o más realizaciones, dichos ácidos grasos insaturados se seleccionan del grupo de ácidos grasos omega-3 y omega-6. Ejemplos de tales ácidos grasos poliinsaturados son el ácido linoleico y linolénico, el ácido gamma-linoleico (GLA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Tales ácidos grasos insaturados son conocidos por su efecto acondicionador de la piel, lo que contribuye al beneficio terapéutico de la composición. Por tanto, la composición puede incluir al menos un 6 por ciento de un aceite seleccionado entre aceite omega-3, aceite omega-6 y mezclas de los mismos. También se pueden utilizar los aceites esenciales, que también se consideran aceites terapéuticamente activos, que contienen moléculas activas de origen biológico y, tras la aplicación tópica, ejercen un efecto terapéutico, que concebiblemente sinérgico con el efecto beneficioso de la mezcla probiótica en la composición. Otra clase de aceites terapéuticamente activos incluye aceites líquidos hidrofóbicos derivados de plantas, que se sabe que poseen beneficios terapéuticos cuando se aplican tópicamente. También se pueden usar aceites de silicona y son deseables debido a sus conocidas propiedades protectoras y oclusivas de la piel. Los aceites de silicona adecuados incluyen siliconas no volátiles, tales como polialquilsiloxanos, poliarilsiloxanos, polialquilarilsiloxanos y copolímeros de poliétersiloxano, polidimetilsiloxanos (dimeticonas) y copolímeros de poli(dimetilsiloxano)-(difenilsiloxano). Éstos se eligen entre polidimetilsiloxanos cíclicos o lineales que contienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 5, átomos de silicio. También se pueden utilizar siliconas volátiles tales como las ciclometiconas. Los aceites de silicona también se consideran aceites terapéuticamente activos, debido a sus propiedades protectoras y de retención de barrera.

Para aplicación vaginal, la composición probiótica puede estar en forma de cápsula vaginal o comprimido vaginal. El término "cápsula" se refiere a una cápsula farmacéutica de cubierta dura. La cápsula consta de un cuerpo y una tapa y puede comprender una formulación de relleno que contiene la composición probiótica. Las cápsulas adecuadas para su uso de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, NPcapsCR' disponible de Capsugel que contiene pululano, carragenano y cloruro de potasio, así como las cápsulas descritas en la patente de EE. UU. Nº 8.105.625 y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. Nº 2005/0249676. En un aspecto, las cápsulas para uso de acuerdo con la invención comprenden pululano con un peso molecular entre aproximadamente 50 y 500 kDa, entre 100 y 400 kDa, entre aproximadamente 150 y 300 kDa y preferiblemente entre aproximadamente 180 y 250 kDa. En otro aspecto, las cápsulas para uso de acuerdo con la invención comprenden pululano de aproximadamente un 50 por ciento a aproximadamente el 100 por ciento en peso (cápsula sin llenar). En otros aspectos, las cápsulas comprenden aproximadamente de 60 a 90 o de 70 a 90, o de 80 a 90 por ciento en peso de pululano. Preferiblemente, las cápsulas comprenden aproximadamente del 85 al 90 por ciento en peso de pululano. Las cápsulas para uso de acuerdo con la invención pueden comprender además (además de pululano) uno o más agentes gelificantes (por ejemplo, hidrocoloides o polisacáridos tales como alginatos, goma agar, goma guar, algarroba, carragenano, goma tara, goma arábiga, pectina, xantano y similares); sales que comprenden cationes tales como K, Li, Na, NH4, Ca, Mg; y/o tensioactivos tales como laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cetrimida, ésteres de azúcares de ácidos grasos, monooleato de glicerol, ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán, alcohol polivinílico, dimetilpolisiloxano, ésteres de sorbitán o lecitina.

Las cápsulas para uso de acuerdo con la invención pueden comprender además uno o más agentes plastificantes (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, alcohol polivinílico, sorbitol, maltitol y similares); agentes potenciadores de la disolución (por ejemplo, maltosa, lactosa, sorbitol, manitol, xilitol, maltitol y similares); agentes de refuerzo (por ejemplo, polidextrosa, celulosa, maltodextrina, gelatina, gomas y similares); colorantes y/u opacificantes como se describe en la patente de EE. UU. Nº 8.105.625. En una realización preferida, la cápsula comprende pululano en una cantidad del 85 por ciento al 90 por ciento en peso, cloruro de potasio en una cantidad del 1,0 por ciento al 1,5 por ciento en peso, carragenano en una cantidad del 0,1 por ciento al 0,4 por ciento en peso, uno o más tensioactivos en una cantidad del 0,1 por ciento al 0,2 por ciento en peso y agua en una cantidad del 10 por ciento al 15 por ciento en peso.

Las formas de dosificación de las formulaciones probióticas vaginales probióticas son adecuadas para la administración vaginal y se seleccionan para administrar una cantidad eficaz de la formulación probiótica vaginal. En algunas realizaciones, la formulación vaginal probiótica se suministra como un polvo y puede administrarse mediante un aplicador adecuado. En este caso, la formulación vaginal probiótica puede suministrarse como un componente de un kit que incluye un aplicador. La formulación vaginal probiótica puede estar preenvasada en el aplicador, o suministrarse como un artículo separado del kit. En algunas otras realizaciones, la aplicación vaginal probiótica se incorpora en tampones vaginales. Un kit que comprende los tampones incluye opcionalmente uno o más aplicadores. Las formas de dosificación adecuadas también

incluyen supositorios vaginales, incluyendo cápsulas y comprimidos, que pueden administrarse con o sin un aplicador adecuado. La elección de la forma de dosificación depende de una variedad de factores. Por ejemplo, la forma de dosificación elegida debe garantizar la estabilidad de los ingredientes de la formulación durante el almacenamiento, una administración conveniente y un suministro rápido de la formulación en el entorno vaginal. En particular, la forma de dosificación de las formulaciones vaginales probióticas no debería afectar perjudicialmente a la viabilidad ni permitir la reconstitución prematura (antes de la administración) de los componentes probióticos de la formulación. Para este fin, la forma de dosificación no debe contener agua. Al mismo tiempo, la forma de dosificación debe permitir una rápida dispersión o disolución de los ingredientes de la formulación en el entorno vaginal tras la administración. Por ejemplo, si se elige un comprimido o una cápsula como forma de dosificación, se debe formular para disgregarse rápidamente cuando se administra en la vagina.

Adicionalmente, la administración puede ser crónica o intermitente, según lo considere apropiado el médico supervisor, particularmente en vista de cualquier cambio en el estado de la enfermedad o cualquier efecto secundario indeseable. La administración "crónica" se refiere a la administración de la composición de manera continua mientras que la administración "intermitente" se refiere al tratamiento que se realiza con interrupción. La cantidad eficaz de unidades formadoras de colonias (UFC) para las cepas en la composición la determinará el experto en la técnica y dependerá de la formulación final. Por ejemplo, cuando se administra por vía oral sin ningún otro agente activo, la cantidad total de las cepas de la invención está presente en la composición en una dosis única en una cantidad que da una dosis diaria eficaz de 10^7 a 10^{12} UFC, según la legislación actual, preferiblemente de 10^9 a 10^{11} UFC y, cuando se administra por vía vaginal o rectal, en una cantidad que da una dosis diaria eficaz de 10^3 a 10^{12} UFC, preferiblemente de 10^5 a 10^{10} UFC. El término "unidad formadora de colonias" ("UFC") se define como el número de células bacterianas como se revela por recuentos microbiológicos en placas de agar. Los suplementos alimenticios contienen normalmente cepas probióticas en una cantidad que oscila de 10^7 y 10^{12} UFC/g. En una realización particular, la composición de la invención es un suplemento alimenticio para dosis diarias que comprende entre 10^9-10^{11} UFC/g. El término "producto farmacéutico" se entiende en su significado amplio en esta descripción, incluyendo cualquier composición que comprenda un ingrediente activo, en este caso, las cepas de la invención preferiblemente en forma de composición, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "producto farmacéutico" no se limita a medicamentos. El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en esta memoria, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del bien juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un humano) sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcionales a una relación de beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc., también debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Los vehículos, excipientes, etc. adecuados se pueden encontrar en textos farmacéuticos estándar.

La invención se define por medio de los siguientes aspectos:

La invención se explica a continuación por medio de los siguientes ejemplos que deben interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

Ejemplos

Sección experimental

Reactivos, fuentes de bacterias y colágeno: Los reactivos de alta pureza se adquirieron de Sigma-Aldrich. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada ultrapura (18 MΩ·cm). *El polvo de Lactobacillus fermentum* (*Lf*, CECT5716) se obtuvo de Biosearch Life S.A. *Lactobacillus acidophilus* (*La*, CECT903, Moro 1900) se adquirió de CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). El medio De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) se adquirió de Thermo Scientific. El colágeno de tipo I se extrajo del tendón equino utilizando el método de fabricación estandarizado de OPOCRIN S.p.A (Corlo di Formigine, Módena, Italia) como se describe por Tampieri, A. et al. (J. Biomed. Mater. Res., 2003, 67A, 618).

Atrapamiento de bacterias Lactobacilli en la matriz de colágeno: La y Lf se inocularon por separado en 100 ml de caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 37 °C con agitación continua (180 rpm). Posteriormente, las bacterias se recogieron por centrifugación (10000 g, 5 minutos), se lavaron con solución salina (NaCl al 0,9% en agua) y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4) para obtener una suspensión de bacterias con $2 \cdot 10^9$ Unidad formadoras de colonias (UFC) mL^{-1}. Después, se mezclaron 3 ml de suspensión de bacterias con 1 ml de solución de colágeno (1,5 mg ml^{-1}, pH 3,0) provocando la formación de una matriz 3D de fibras de colágeno autoensambladas en presencia del probiótico. Las matrices de colágeno con las bacterias atrapadas se mantuvieron durante 30 minutos a 37 °C en agitación continua (180 rpm) y luego se lavaron con 10 ml de solución salina (NaCl al 0,9% en agua) para eliminar las bacterias no atrapadas.

Preparación de biocompuestos de col-Lf y col-La: Las matrices de colágeno con las bacterias atrapadas se incubaron después en 10 ml de caldo MRS durante 6 h a 37 °C. Los materiales resultantes, denominados col-Lf y col-La, se lavaron con solución salina y se almacenaron hasta sus posteriores caracterizaciones ex situ.

Caracterización ex situ de biocompuestos de col-Lf y col-La mediante microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (FESEM): Las matrices de colágeno (con y sin probióticos) y biocompuestos de Col-La y Col-Lf se fijaron en 1 ml de tampón cacodilato (0,1 M, pH 7,4) que contenía un 2,5% de glutaraldehído a 4 °C. Después de 24 horas, las muestras se lavaron 3 veces (30 min a 4 °C) con tampón cacodilato. La muestra se tiñó con solución de tetróxido de osmio (1 % v/v) durante 2 horas en la oscuridad, y después se enjuagó repetidamente con agua Milli-Q para eliminar el exceso de osmio. Las muestras se deshidrataron a continuación a temperatura ambiente con mezclas de etanol/agua del 50%, 70%, 90% y 100% (v/v) durante 20 min cada una, repitiéndose la última concentración tres veces y secándose en el punto crítico de CO_2 . Finalmente, las muestras deshidratadas se montaron sobre tetones metálicos con adhesivo conductor, se cubrieron con una fina película de carbono y se analizaron usando un FESEM (Zeiss SUPRA40V, Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada).

Caracterización ex situ de biocompuestos de col-Lf y col-La mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR): los espectros FTIR se recogieron en un espectrómetro Bruker Tensor 27 en configuración de reflexión total atenuada (ATR) con una resolución de 3 cm^{-1} por acumulación de 100 barridos que cubren el rango espectral de 4000-400 cm^{-1} .

Caracterización ex situ de biocompuestos col-Lf y col-La mediante análisis de termogravimetría (TGA): Se produjeron TGA utilizando una balanza térmica Mettler-Toledo TGA/DSC1 (Mettler-Toledo, Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada) con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min hasta 900 °C en flujo de nitrógeno.

Caracterización ex situ de biocompuestos col-Lf y col-La mediante difracción de rayos X de sincrotrón: los datos se recogieron en un capilar de vidrio de 1,0 mm de diámetro lleno con matrices de colágeno secas o colágeno/bacterias en la línea de haz X04SA-MS de la Fuente de Luz Suiza (SLS) del Instituto Paul Scherrer (Villigen, Suiza). La energía del haz se fijó en 16 keV (longitud de onda operativa, A = 0,77627 Å). Los datos se recogieron con la ayuda del detector MYTHEN II de recuento de fotón único sensible a la posición. Las muestras se liofilizaron a -40 °C (LyoQuest, Telstar) durante la noche antes de las caracterizaciones por FTIR, TGA y difracción de rayos X.

Cuantificación de EPS: Se utilizó el método fenol-sulfúrico estándar para la cuantificación de EPS (DuBois et al., Anal. Chem. 1956, 28, 350). Las muestras se sumergieron en 1 ml de solución salina que contenía 500 µL de fenol (5% en agua) y 2,5 ml de ácido sulfúrico y se mantuvieron en un baño de agua a 30 °C durante 20 min. La absorbancia de cada muestra se midió a 490 nm. La concentración de EPS se determinó utilizando los coeficientes de absorción obtenidos a partir de una curva de calibración y expresados en mg de azúcar por g de colágeno. Las curvas de calibración se realizaron utilizando una mezcla de dextrano y levano, los componentes más característicos del EPS excretado por los lactobacilos. Cada muestra se ensayó por triplicado.

Ensayo de viabilidad in vitro : La viabilidad bacteriana en Col-Lf se evaluó cualitativamente con el kit de viabilidad bacteriana *Bac*Light™ (Thermo-Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo consiste en combinar una tinción de unión al ADN impermeable a la membrana, es decir, yoduro de propidio (PI), con una contratinción de unión al ADN permeable a la membrana, SYTO9, que tiñe bacterias muertas y vivas y muertas, respectivamente. Las imágenes de microscopía de barrido láser confocal (CSLM) se recogieron con un microscopio Nikon Eclipse Ti-E A1 equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 60x. Las imágenes se analizaron con el software NIS Elements. Para adquirir señales SYTO 9, se utilizó un láser de 488 nm y un filtro de emisión de 505-550 nm. Para PI, se utilizó un láser de 561 nm y un filtro de emisión de paso largo de 575 nm. La reconstrucción de la imagen tridimensional se obtuvo con 39 secciones z.

Actividad bacteriana de col-Lf y col-La después del almacenamiento a 4 °C: el biocompuesto de colágeno-probiótico y los controles correspondientes (probióticos desnudos) se almacenaron a 4 °C durante 2 semanas, 1 mes y 2 meses. Después de este tiempo, las muestras y los controles se añadieron por separado a 10 ml de medio de caldo MRS y se incubaron a 37 °C y 180 rpm durante 1 hora. Después, todas las muestras se lavaron dos veces (3000 g, 5 min) con solución salina (NaCl al 0,9% en agua). Posteriormente, se añadieron 10 mL de medio de caldo MRS diluido 1/10 y se incubaron a 37 °C y 180 rpm. Se utilizó caldo MRS diluido 1/10 para evitar la capacidad autorreductora del caldo MRS no diluido. Se recogieron secuencialmente alícuotas de 1 ml de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos en tiempos programados: 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h. Se centrifugaron alícuotas (3000 g, 5 min) para eliminar cualquier bacteria residual. La actividad de fermentación de los materiales vivos encapsulados y los controles correspondientes se monitorizaron mediante mediciones de pH. Para confirmar la mayor viabilidad de los sistemas de bacterias del colágeno con respecto a las bacterias no atrapadas, se aplicó un procedimiento desarrollado por los inventores que consistía en correlacionar la proliferación bacteriana con su capacidad reductora frente al polioxometalato electrocrómico (POM), [$P_2Mo^{VI}O_62$]$^{6-}$) (González et al., Chem. Commun. 2015, 51). Se añadieron 190 µl de cada alícuota a un pocillo que contenía 10 µl de una solución 10 mM de POM. Las muestras se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se irradiaron con luz UV (365 nm) durante 10 minutos y después se midió la absorbancia en

un lector de placas NanoQuant de Tecan. Se realizaron los mismos experimentos con materiales almacenados a temperatura ambiente (muestras frescas). Además, se utilizaron controles de col libre para confirmar que este material por sí solo no es capaz de disminuir el pH ni reducir el POM. Cada alícuota se ensayó por triplicado.

Ensayo in vitro *de adhesión bacteriana*: la adhesión de col-probióticos y probióticos se analizó según el método informado anteriormente con ligeras modificaciones. [25,26] En resumen, los pocillos de placas Maxisorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) se incubaron durante la noche a 4 °C con 100 µL de una solución de 5 mg mL^{-1} de mucina porcina (Sigma-Aldrich) en PBS pH 7,4. Después de la inmovilización, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con BSA al 2% en PBS durante 1 h. Los sedimentos bacterianos de fracciones de 5 ml de cultivo bacteriano se recogieron por centrifugación (6000 g, 5 minutos), se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en 5 ml de PBS. Tras retirar la solución de BSA y lavar tres veces los pocillos con PBS, se añadió la suspensión bacteriana (100 µl, 10^8 UFC ml^{-1}). En el caso de muestras de matriz colágeno-bacteria, se añadieron 25 µL de colágeno (50 mg mL-1 en ácido acético 0,1 M). La placa se incubó con *Lf* o La en un agitador orbital a 180 rpm durante con 2 horas a 37 ºC. Las bacterias no adheridas se retiraron lavando los pocillos tres veces con 100 µL de PBS y las muestras se fijaron a 60 °C durante 20 min. Posteriormente, las células fijadas se tiñeron con cristal violeta (100 µL por pocillo, solución al 0,1%) durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, los pocillos se lavaron dos veces con 150 µL de PBS y el colorante unido a las bacterias se disolvió en 50 µL de tampón citrato (pH 4,3) durante 1 h. La absorbancia se midió a 590 nm utilizando el lector de placas de microtitulación (NanoQuant). Los resultados se expresaron como la media de triplicados con un volumen total de 200 µL, después de recoger cuatro réplicas de 50 µL en un pocillo. Los controles consistieron en mucina y mucina-colágeno, y las muestras fueron mucina-*Lf*, mucina-*La*, mucina-col-*La* y mucina-col-*Lf*, bloqueadas o no con BSA.

Actividad bacteriana de col-Lf y col-La en un fluido VB simulante: Las muestras de colágeno-probiótico y los controles se añadieron por separado a 10 ml de fluido VB simulante y se incubaron a 37 °C y 180 rpm. 1 L de líquido VB, preparado de acuerdo con el protocolo previamente informado (DH Owen, DF Katz, Contraception 1999, 59, 91.) con ligeras modificaciones, contiene NaCl, 3,51 g; KOH, 1,40 g; $Ca(OH)_2$, 0,222 g; albúmina sérica bovina, 0,018 g; urea, 0,4 g; glicerol, 0,16 g; glucosa, 10 g; ácido láctico, 2 g; y ácido acético, 1 g. El pH fue de 5,00. Se recogieron secuencialmente alícuotas de 1 ml de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos en tiempos programados: 0, 2, 4, 6, 8 y 24 h. Se centrifugaron alícuotas (3000 g, 5 min) para eliminar cualquier bacteria residual. Se midió el pH de los materiales vivos atrapados y los controles correspondientes para demostrar la capacidad de restaurar el pH del medio. Cada alícuota se ensayó por triplicado.

Análisis estadístico: Los resultados se expresan como promedio ± error estándar de la media (S.E.M.). Las comparaciones estadísticas se realizaron usando ANOVA unidireccional y la prueba post hoc de Bonferroni con el software GraphPad Prism (versión 6.0). Un $p < 0,05$ se consideró un valor significativo.

EJEMPLO 1: Matriz de colágeno como andamio para probióticos

Una solución ácida que contenía monómeros de colágeno se mezcló con los probióticos (Lf o La) en tampón PBS (pH 7,4). El aumento instantáneo del pH induce el autoensamblaje del colágeno en una matriz de fibras de alta densidad con varios cientos de micrones de longitud y diámetros entre 200 y 500 nm (Figura 1a,b), que muestra el patrón característico de bandas D (67 nm). Como es evidente a partir de las micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 1c-d), utilizando este sencillo procedimiento de un solo recipiente, los probióticos *Lf* (Figura 1c,d) y *La* (Figura 2) fueron atrapados con éxito en la red de fibras de colágeno. Además, la presencia de probióticos no alteró la estructura inducida por el pH y el ensamblaje de las fibras de colágeno, que fueron similares a las obtenidas en PBS sin bacterias (Figura 1a,b).

Curiosamente, cuando ambos materiales de colágeno que contenían probióticos se incubaron en un medio probiótico óptimo, tal como MRS, las bacterias proliferaron con éxito y produjeron biopelículas, que decoraron las fibras de colágeno (Figura 1e-f y 2). Es interesante observar que estos tipos de bacterias excretan exopolisacáridos (EPS). Los EPS desempeñan un papel importante en la formación de la biopelícula, que es esencial para que las bacterias creen un microentorno conductor del crecimiento en un sustrato, en este caso, las fibras de colágeno. La excelente integración de bacterias en la matriz de colágeno, atestiguada por la formación de biopelículas, es evidente a partir de la Figura 1e-f, que muestra cómo las bacterias se adhieren a las fibras de colágeno a través de su EPS (Figura 1f y 2). Estos materiales (col-*Lf* y col-*La*, en lo sucesivo) son en realidad biocompuestos híbridos formados por tres constituyentes: la matriz de colágeno, el probiótico y su EPS bacteriano, siendo este último el 'pegamento' natural de los otros dos componentes. Esta clase de biocompuestos nunca ha sido reportada.

La cantidad de EPS en los biocompuestos col-*Lf* y col-*La* se cuantificó mediante una prueba de azúcar estándar (véase la Sección Experimental). Se obtuvieron valores de 98 y 93,3 mg por gramo de colágeno para col-*Lf* y col-*La*, respectivamente. Curiosamente, los materiales iniciales obtenidos al incubar probióticos y colágeno en PBS contenían niveles de azúcar mucho más bajos (10 y 18,6 mg por gramo de colágeno, respectivamente). El drástico aumento de azúcar en los biocompuestos finales col-*Lf* y col-*La* se debe ciertamente a la formación

de biopelículas en el medio óptimo MRS, de acuerdo con las imágenes SEM.

El biocompuesto se caracterizó además a macroescala mediante espectroscopia infrarroja (FTIR) y análisis termogravimétrico (TGA), y a escala molecular mediante difracción de rayos X sincrotrón (Figura 3). Los espectros FTIR y TGA de col-*Lf* muestran las principales huellas digitales de las fibras de colágeno junto con algunas señales asignables a la presencia de bacterias (Figura 3a y b). Los patrones de difracción de colágeno y col-*Lf* fueron similares (Figura 3c) con un pico amplio centrado en aproximadamente $q = 13{,}25\ nm^{-1}$ debido a la dispersión difusa de las fibras de colágeno. El pico de Bragg en $q = 5{,}46\ nm^{-1}$ corresponde a la separación ecuatorial promediada molécula-molécula (*es decir*, el espaciado lateral intermolecular) de la triple hélice de colágeno. Este pico da como resultado un espaciado *d* de 1,15 nm, que concuerda con el espaciado *d* correspondiente del colágeno en tejidos biológicos secos no mineralizados y confirma que las bacterias no afectan el ensamblaje macromolecular de las fibras de colágeno.

La prueba estándar vivo/muerto basada en SYTO9 (verde)/yoduro de propidio (rojo) demostró que las bacterias *Lf* y La estaban vivas en los materiales col-*Lf* y col-La (Figura 4). Como es evidente a partir de la Figura 4, la mayoría de los probióticos *Lf* permanecen vivos (verde), con solo unas pocas bacterias muertas (rojo) encontradas. Además, la imagen de vista lateral (suma de secciones xy sucesivas) (Figura 4a) muestra que las bacterias penetraron e invadieron toda la matriz de colágeno para formar biomateriales híbridos únicos. Curiosamente, la imagen confocal de vista superior ampliada (Figura 4b-c) muestra la alineación de las bacterias a lo largo del andamio de colágeno, lo que sugiere la existencia de un reconocimiento específico del probiótico por parte del colágeno. Se encontraron resultados similares para col-*La*.

EJEMPLO 2: La matriz de colágeno estabiliza los probióticos en condiciones adversas y mejora su actividad metabólica

La matriz de colágeno no actúa simplemente como un andamio de alojamiento para probióticos, sino que también les proporciona protección adicional durante el almacenamiento en condiciones adversas (por ejemplo, a 4 °C). Las bacterias vivas excretan metabolitos al medio y los *lactobacilos*, en particular, excretan ácido láctico, que regula el pH a alrededor de 4. Se mide la evolución del pH para monitorizar la actividad metabólica de los probióticos después del almacenamiento en condiciones adversas (4 °C). La evolución del pH de *Lf* y col-*Lf* frescos (sin tratamiento térmico) y después del almacenamiento a 4 °C durante dos, cuatro y ocho semanas, se muestra en la Figura 5. Col- *Lf* indujo una caída mucho mayor del pH en medios MRS diluidos en comparación con el de *Lf* (Figura 5a), apoyando que los probióticos embebidos dentro de la matriz de colágeno retienen su actividad metabólica y sus probióticos. Se observaron comportamientos similares para el par col-*La*/*La* después de dos y cuatro semanas de almacenamiento a 4 °C. Sin embargo, el col-La almacenado durante ocho semanas mostró mucha menos actividad (Figura 6a).

Además, se evaluó la actividad metabólica de col-*Lf* y col-*La* almacenados a 4 °C usando un ensayo que correlaciona la capacidad reductora de las bacterias con su actividad metabólica, utilizando un polioxometalato electrocrómico (POM) (González , N. et al. Chem. Commun. 2015, 51). Una vez reducido, el POM presenta una banda de absorción en el espectro UV-vis centrada en 820 nm. Se monitorizó la evolución de esta banda de absorción después de incubar alícuotas de los sobrenadantes de cultivos col-*Lf* o *Lf* con una solución acuosa de POM (Figura 5b). La actividad de reducción de POM en el medio de caldo MRS se potencia cuando las bacterias están embebidas en la matriz de colágeno en comparación con las de las bacterias almacenadas libres (Figura 5b). Los valores finales de col-*Lf* almacenados durante dos, cuatro y ocho semanas fueron similares a los obtenidos para muestras frescas (almacenadas a temperatura ambiente). Se observó un comportamiento similar para el par col-*La*/*La* después de dos u ocho semanas.

Las muestras de col-*La* después de 2 meses de almacenamiento mostraron mucha menos capacidad para reducir POM (Figura 6b), de acuerdo con su capacidad inferior para reducir el pH (*cf.* col-*Lf*) indicada anteriormente (Figura 6b).

Estas observaciones respaldan que la matriz de colágeno ayuda a mantener la actividad celular central de los probióticos, especialmente la de *Lf*, incluso después de su exposición a condiciones de almacenamiento adveras prolongadas. La retención de altas actividades metabólicas y celulares es un parámetro crítico para el uso exitoso de probióticos en terapias libres de antibióticos.

EJEMPLO 3: La matriz de colágeno mejora la adhesión de probióticos

El colágeno es la principal proteína estructural en el espacio extracelular de varios tejidos conectivos del cuerpo. Por tanto, otra ventaja de utilizar colágeno como andamio para probióticos es la excepcional capacidad de esta proteína para adherirse a tejidos biológicos. La adhesión del probiótico a la mucosa vaginal es de suma relevancia para tratar eficazmente la VB con probióticos. De hecho, si un biomaterial que contiene probióticos altamente proliferativos no se adhiere adecuadamente a la mucosa vaginal, no ofrecería mucho valor para la terapia de VB.

Se evaluaron las propiedades de adhesión de col-*Lf*/col-*La* y *Lf*/*La* a células endoteliales utilizando mucina porcina, un material que contiene proteínas fuertemente glicosiladas producidas por tejidos epiteliales, que es un modelo de adhesión bien establecido. La adherencia sobre mucina porcina inmovilizada de col-*Lf*/col- *La* y *Lf*/*La* se midió mediante cuantificación espectroscópica indirecta de bacterias adsorbidas marcadas con cristal violeta (véase la Sección Experimental). Como se muestra en la Figura 7, la adhesión de col-*Lf* a la mucina fue sensiblemente mayor que la de *Lf*, lo que respalda la capacidad del colágeno para mejorar la adhesión de los probióticos atrapados. La formulación de col-*La* también mostró una mayor adhesión a la mucina que el probiótico *La* solo (Figura 8). Al comparar la adhesión de col-*Lf* y col-*La* a la mucina, se observó una señal más alta correspondiente al cristal violeta para col-*Lf*. Esto es probablemente debido al mayor valor de UFC de col-*Lf* en comparación con el de col-*La*, como se analizó anteriormente.

El modelo de adhesión típico también incluye un tratamiento con albúmina sérica bovina (BSA) después de la inmovilización de mucina. La BSA bloquea los sitios libres restantes de las placas de pocillos sensibles a proteínas después de la inmovilización de mucina. Los experimentos que utilizan BSA (Figura 9) no mostraron diferencia significativa con la de los experimentos correspondientes sin BSA (Figura 9b). Este experimento de control permite concluir que el aumento de la absorbancia no se debe a la potencial adsorción de colágeno a las placas de unión a proteínas, sino que se debe al aumento de la absorción del col-*Lf* adherido.

La mayor adhesión a la mucina de los probióticos col sobre los probióticos prístinos evidencia el papel de la matriz de colágeno para permitir el anidamiento de los probióticos atrapados en un tejido específico, como podría ser la mucosa vaginal durante las condiciones patogénicas provocadas por VB. Como se indicó anteriormente, una adhesión adecuada del material que contiene probióticos a la mucosa vaginal es crucial para lograr la eficacia del tratamiento de la VB. Si la adhesión no es óptima, los probióticos no pueden aclimatarse ni excretar eficazmente el ácido láctico en un microentorno desfavorable y es probable que las bacterias patógenas permanezcan activas, promoviendo más la infección.

EJEMPLO 4: col-*Lf* y col-La para terapia de VB

Una etapa decisiva para confirmar la funcionalidad de col-*Lf* y col-*La* para la terapia de VB es su capacidad para restaurar las condiciones sanas a partir de un fluido de VB simulado a pH 5,0. Como se observa en la Figura 10, tanto col- *Lf* como col-*La* fueron capaces de cambiar el pH 5 del medio VB al de condiciones sanas, pH 4. Este cambio de pH se debe ciertamente al ácido láctico excretado por las bacterias probióticas, de acuerdo con las evidencias anteriores de que las bacterias permanecen vivas y activas una vez atrapadas en la matriz de colágeno. Curiosamente, la caída en el pH con *Lf* y *La* sin colágeno fue mucho más lenta y no alcanzó el valor de pH sano de 4,0 (Figura 10).

Vale la pena destacar dos observaciones de estos resultados: i) los dos materiales, col-*Lf* y col-*La*, fueron capaces de cambiar el pH del medio de VB no sano (pH 5) a las condiciones vaginales sanas (pH 4); y ii) la capacidad para reducir el pH de col-*Lf* o col-La es mayor que la de *Lf* o *La*. Estas observaciones señalan que la matriz de colágeno estabiliza los probióticos y los hace más robustos para resistir el impacto de estar en un entorno hostil, como lo es el fluido de VB. Esto es de interés significativo, ya que perfila la baja eficacia de los probióticos prístinos como posible tratamiento de la VB y sugiere la necesidad de una matriz biocompatible adicional con propiedades de alta adherencia, tal como el colágeno que estabiliza los probióticos para superar el medio hostil de la VB.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar un biomaterial que comprende colágeno de tipo I, probióticos y exopolisacárido, en donde el método comprende:

i. poner en contacto una población de bacterias probióticas con monómeros de colágeno,

ii. incubar la mezcla obtenida en la etapa i) en condiciones adecuadas para el autoensamblaje de los monómeros de colágeno en fibras de colágeno, obteniendo así fibras de colágeno que contienen bacterias probióticas atrapadas; y

iii. mantener las fibras de colágeno que contienen bacterias probióticas atrapadas obtenidas en la etapa ii) en condiciones adecuadas para la formación de exopolisacárido (EPS) por los probióticos hasta que el contenido de EPS en el biomaterial con respecto al contenido de colágeno del biomaterial medido como el contenido de azúcar sea de al menos el 2% (p/p).

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde que el colágeno es colágeno de tipo I.

3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la etapa (ii) se lleva a cabo a un pH de entre 4 y 9.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa ii) se lleva a cabo hasta que se forman fibrillas de colágeno que muestran un diámetro de entre 1 y 600 nm y/o muestran un patrón de bandas D escalonado periódico de 67 nm; o en donde la etapa ii) se realiza bajo agitación continua.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa iii) se lleva a cabo incubando las fibras de colágeno que contienen probiótico atrapado en medio MRS; opcionalmente en donde el probiótico es Lactobacillus o Bifidobacterium; opcionalmente en donde el probiótico se selecciona de *L fermentum, L acidophilus, L crispatus, Ljensenii y L gasseri. B. breve, B. longum, B. bifidum*, y *B. dentium.*

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el probiótico es *L fermentum* y/o *L acidophilus* y más particularmente *L fermentum* CECT5716 y/o *L acidophilus* CECT903.

7. Un biomaterial obtenible mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Un biomaterial que comprende un andamio de colágeno, probióticos y exopolisacárido (EPS), en donde el andamio de colágeno comprende fibrillas de entre 100 y 500 nm de diámetro y en donde el contenido de azúcar en el biomaterial con respecto al contenido de colágeno del biomaterial es de al menos 2% (p/p).

9. El biomaterial de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el andamio de colágeno comprende fibrillas que muestran un patrón de bandas D escalonado periódico de 67 nm.

10. El biomaterial de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en donde el colágeno es colágeno de tipo I; opcionalmente en donde la concentración probiótica es de al menos 6×10^{12} UFC por gramo de colágeno; opcionalmente en donde el EPS se selecciona de homopolisacáridos (HoPS) y/o un heteropolisacárido (HepS).

11. El biomaterial de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el HoPS se selecciona de α-glucanos, β-glucanos y β-fructanos, y/o el HePS comprende cualquiera de D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa y monosacáridos N-acetilados seleccionados de N-acetil-glucosamina (GluNAc), N-acetil-galactosamina (GalNAc), fucosa, ácido glucurónico, glicerol y manosa; opcionalmente en donde el EPS se selecciona de dextrano, levano, mutano, alternano, reuterano y similar a la inulina; opcionalmente en donde el EPS es dextrano, levano o una combinación de los mismos.

12. El biomaterial de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el probiótico se selecciona de Lactobacillus y/o Bifidobacterium; opcionalmente en donde el Lactobacillus se selecciona de *L. fermentum, L. acidophilus, L. crispatus, L. jensenii* y, *L. gasseri* o en donde la Bifidobacterium se selecciona de *B. breve, B. longum, B. bifidum* y *B. dentium* o cualquier combinación de los mismos; opcionalmente en donde los probióticos son *L. fermentum* y/o *L. acidophilus* y más particularmente, *L. fermentum* CECT5716 y/o *L. acidophilus* CECT903 o una combinación de los mismos.

13. El biomaterial de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para su uso en medicina.

14. El biomaterial de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para su uso en el tratamiento de una infección vaginal; opcionalmente en donde la infección está provocada por una bacteria, levadura o parásito protozoario; opcionalmente en donde la infección es vaginosis bacteriana, vaginitis por tricomonas o candidiasis; opcionalmente en donde la infección es vaginosis bacteriana; opcionalmente en donde la vaginosis

bacteriana está provocada por el crecimiento excesivo de la flora vaginal normal seleccionada de *Gardnerella vaginalis* o *Mobiluncus spp.*

15. Una composición farmacéutica que comprende el biomaterial de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 y un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para administración vaginal.

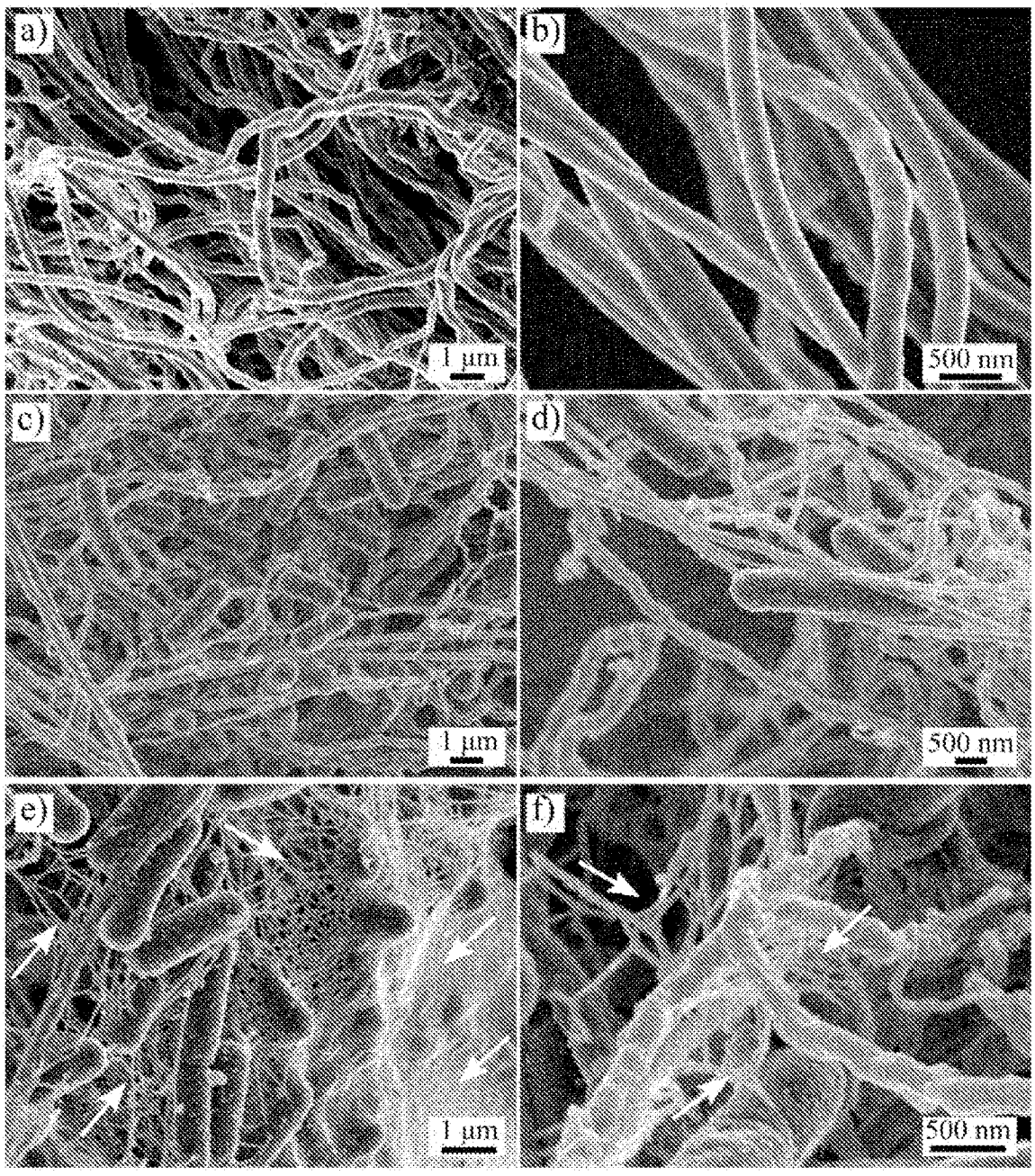


Fig. 1

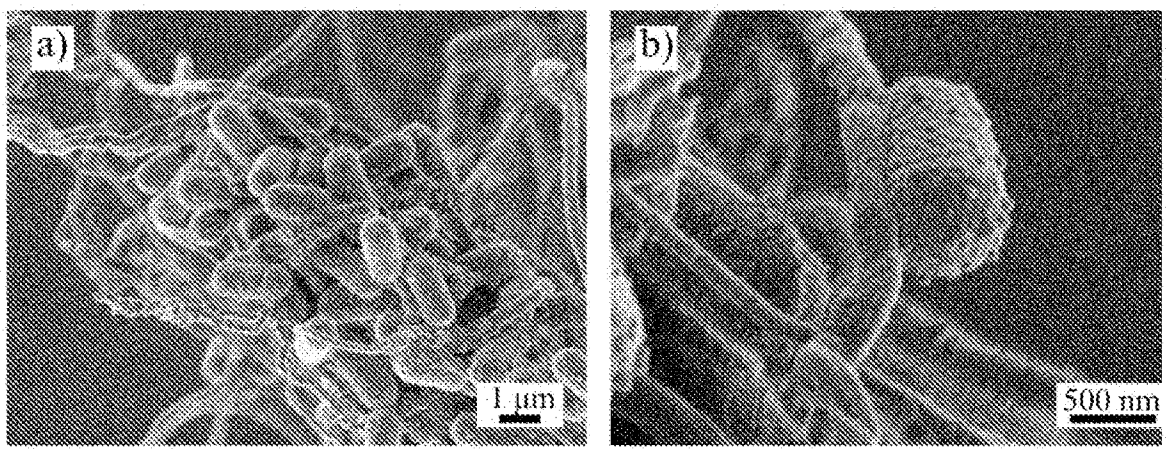
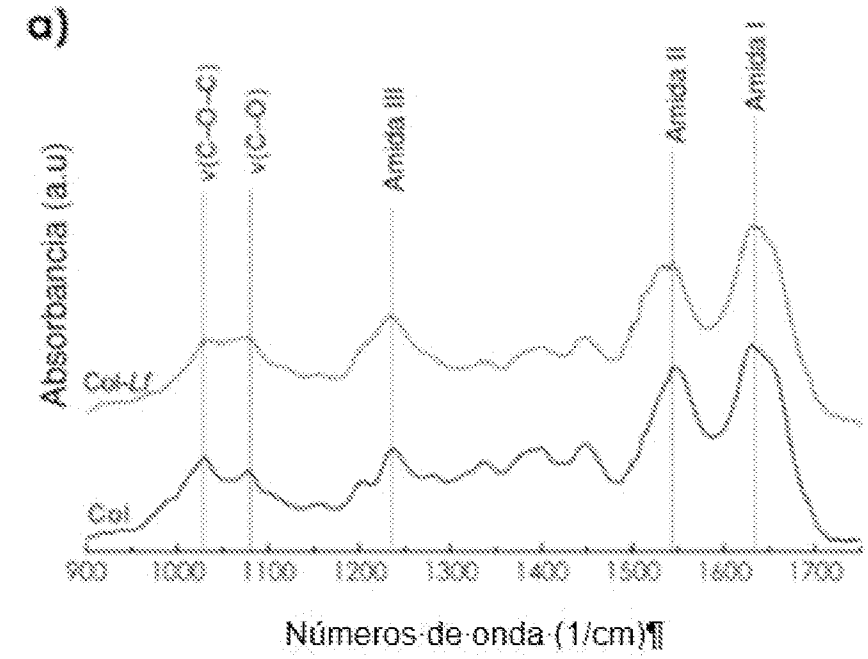


Fig. 2


a)
Absorbancia (a.u)
ν(C–O–C)
ν(C–O)
Amida III
Amida II
Amida I
Cel-U
Cel
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
1600
1700
Números de onda (1/cm)

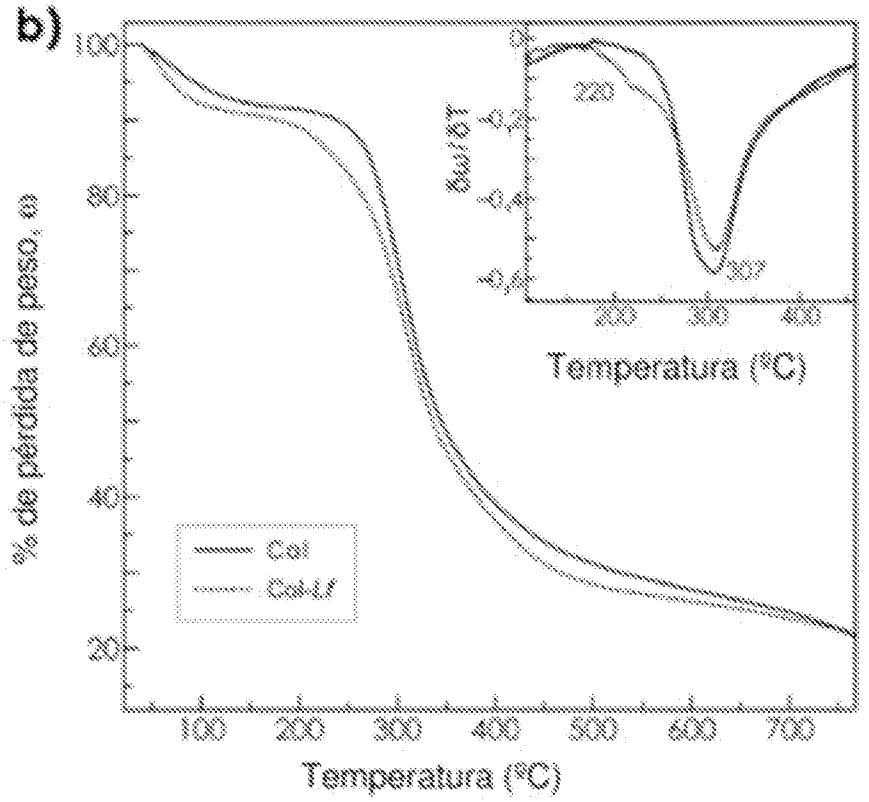

b)
% de pérdida de peso, ω
100
80
60
40
20
dω/dT
220
307
200
300
400
Temperatura (°C)
Cel
Cel-U
100
200
300
400
500
600
700
Temperatura (°C)

Fig. 3

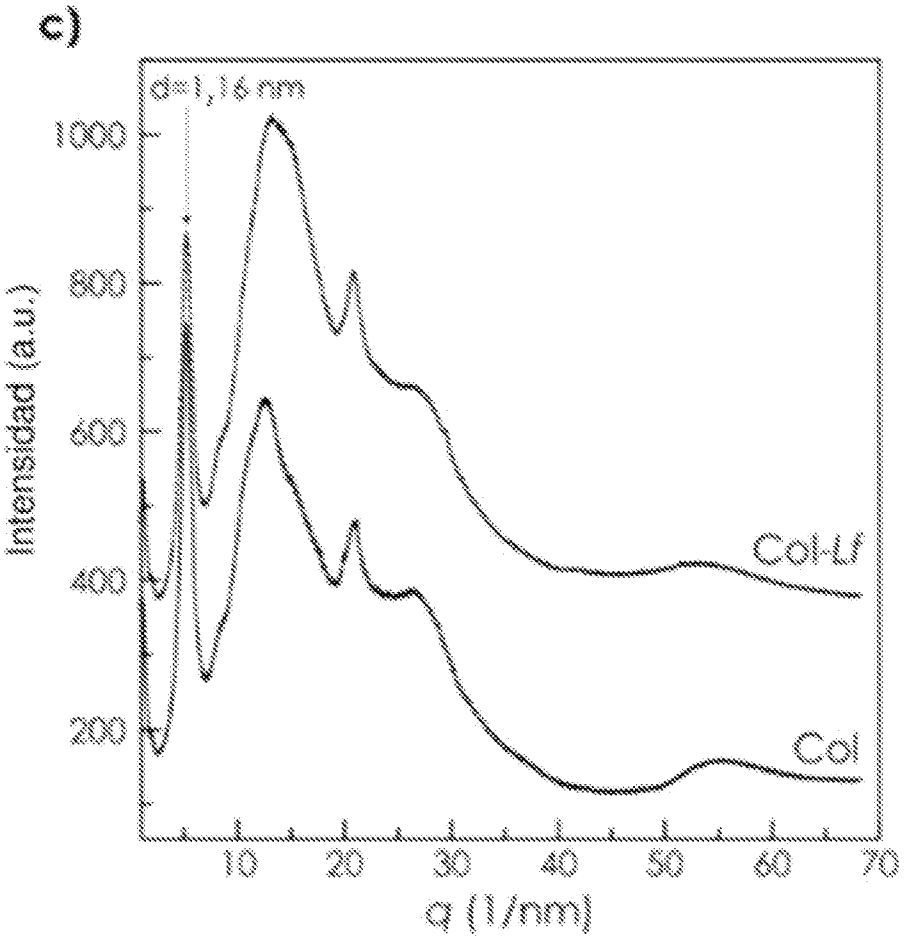

c)
d=1,16 nm
1000
800
600
400
200
Intensidad (a.u.)
Col-U
Col
10
20
30
40
50
60
70
q (1/nm)

Fig. 3 (cont.)

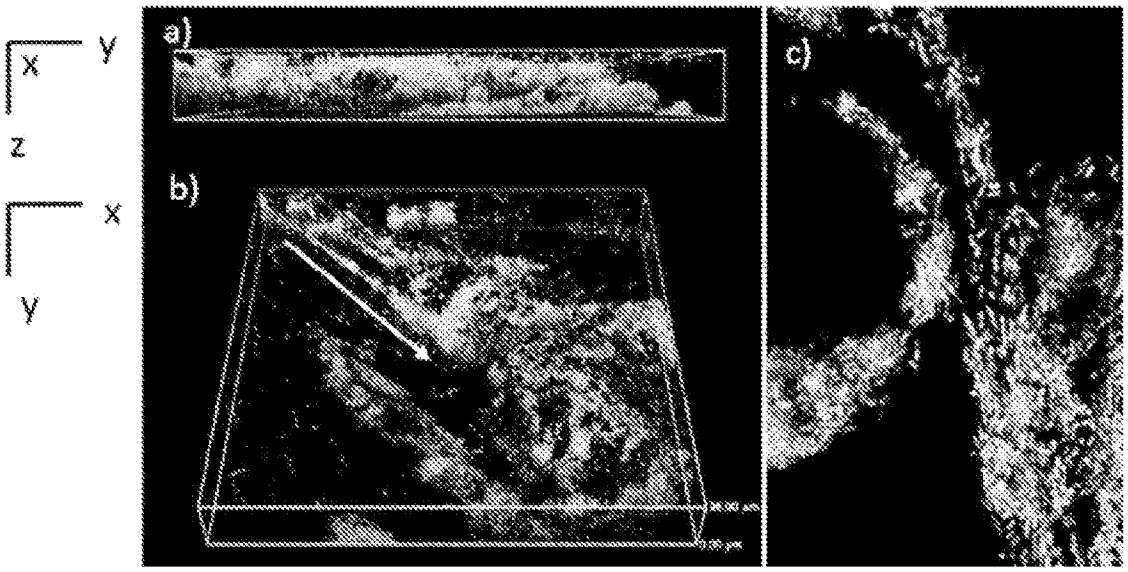
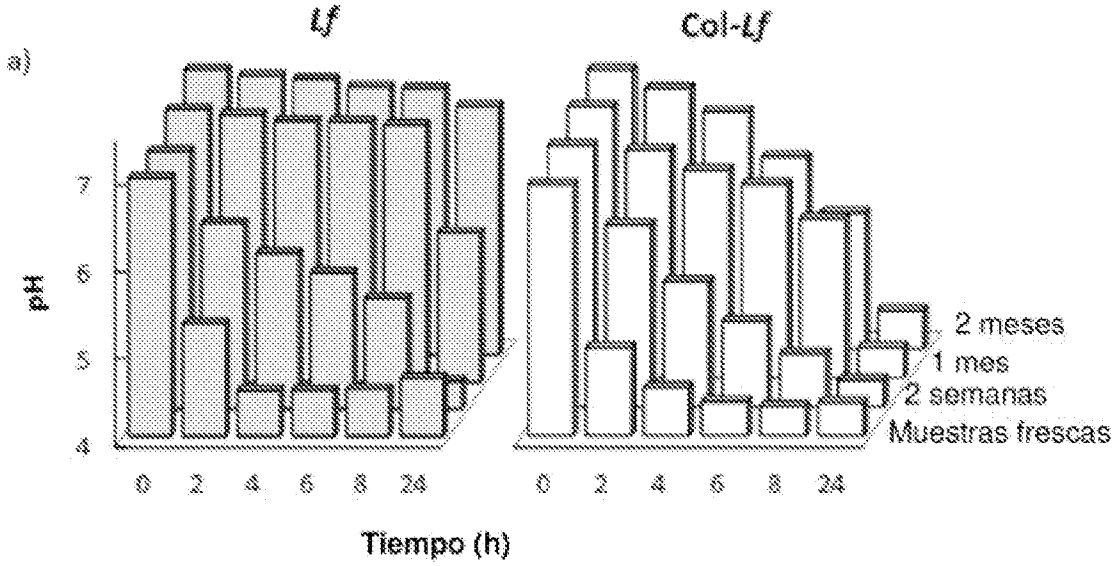


Fig. 4


a)
Uf
Col-Uf
pH
7
6
5
4
0 2 4 6 8 24
0 2 4 6 8 24
2 meses
1 mes
2 semanas
Muestras frescas
Tiempo (h)

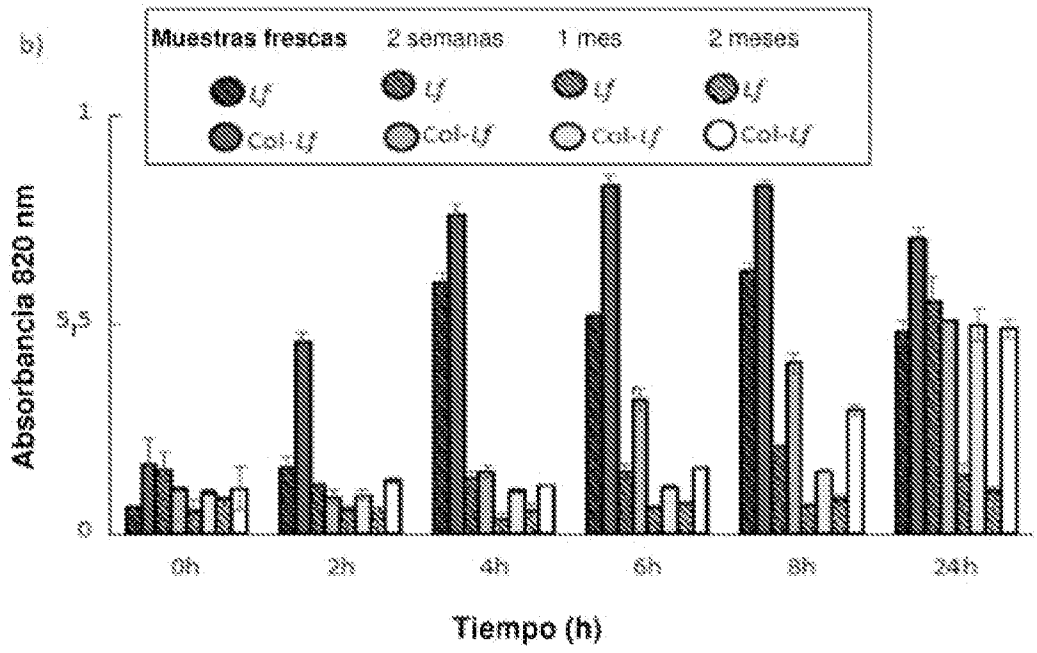

b)
Muestras frescas
2 semanas
1 mes
2 meses
Uf
Col-Uf
Absorbancia 820 nm
0h
2h
4h
6h
8h
24h
Tiempo (h)

Fig. 5

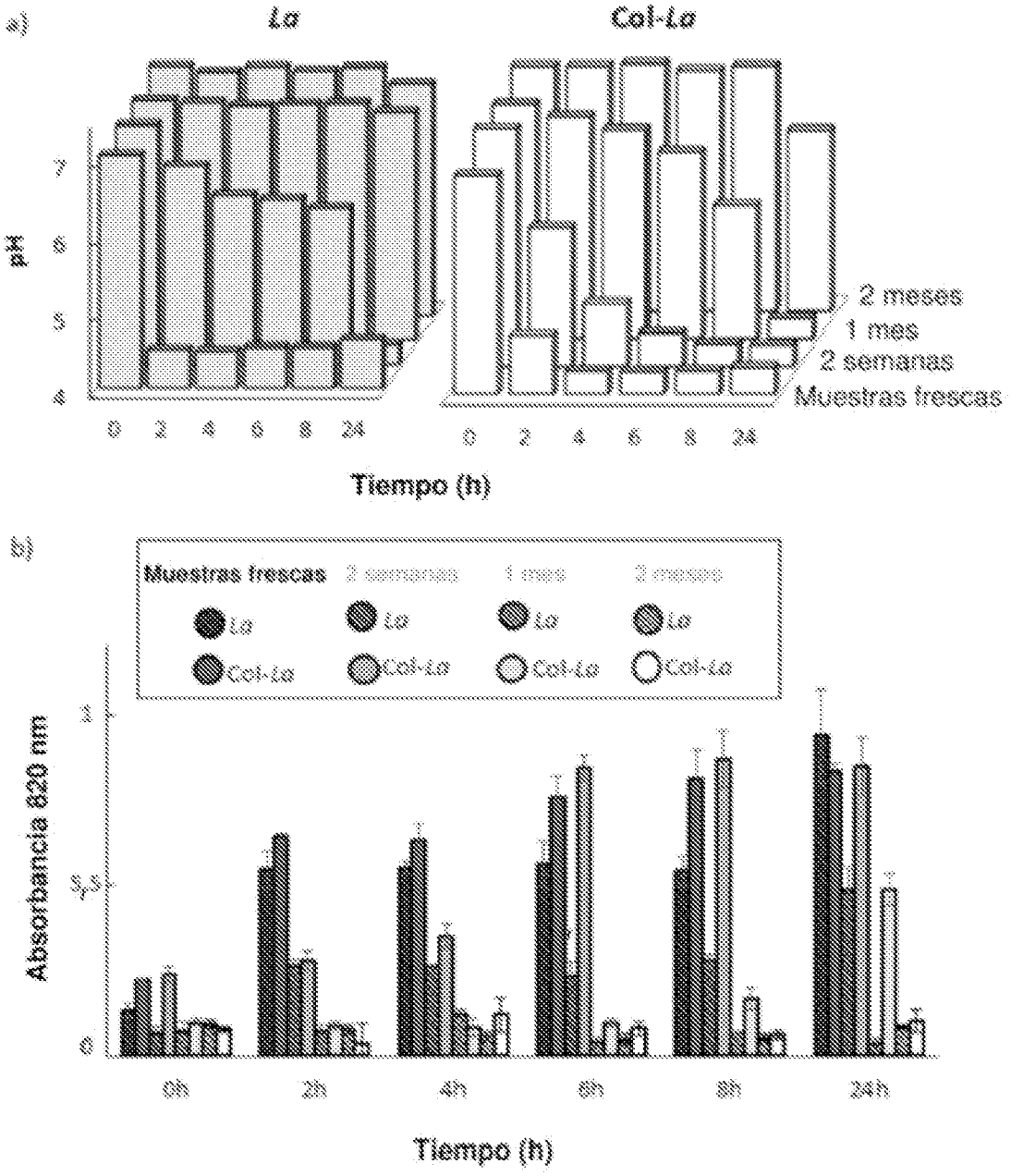

a)
La
Col-La
pH
7
6
5
4
0 2 4 6 8 24
0 2 4 6 8 24
2 meses
1 mes
2 semanas
Muestras frescas
Tiempo (h)
b)
Muestras frescas
La
Col-La
Absorbancia 820 nm
1
0,5
0
0h
2h
4h
6h
8h
24h
Tiempo (h)

Fig. 6

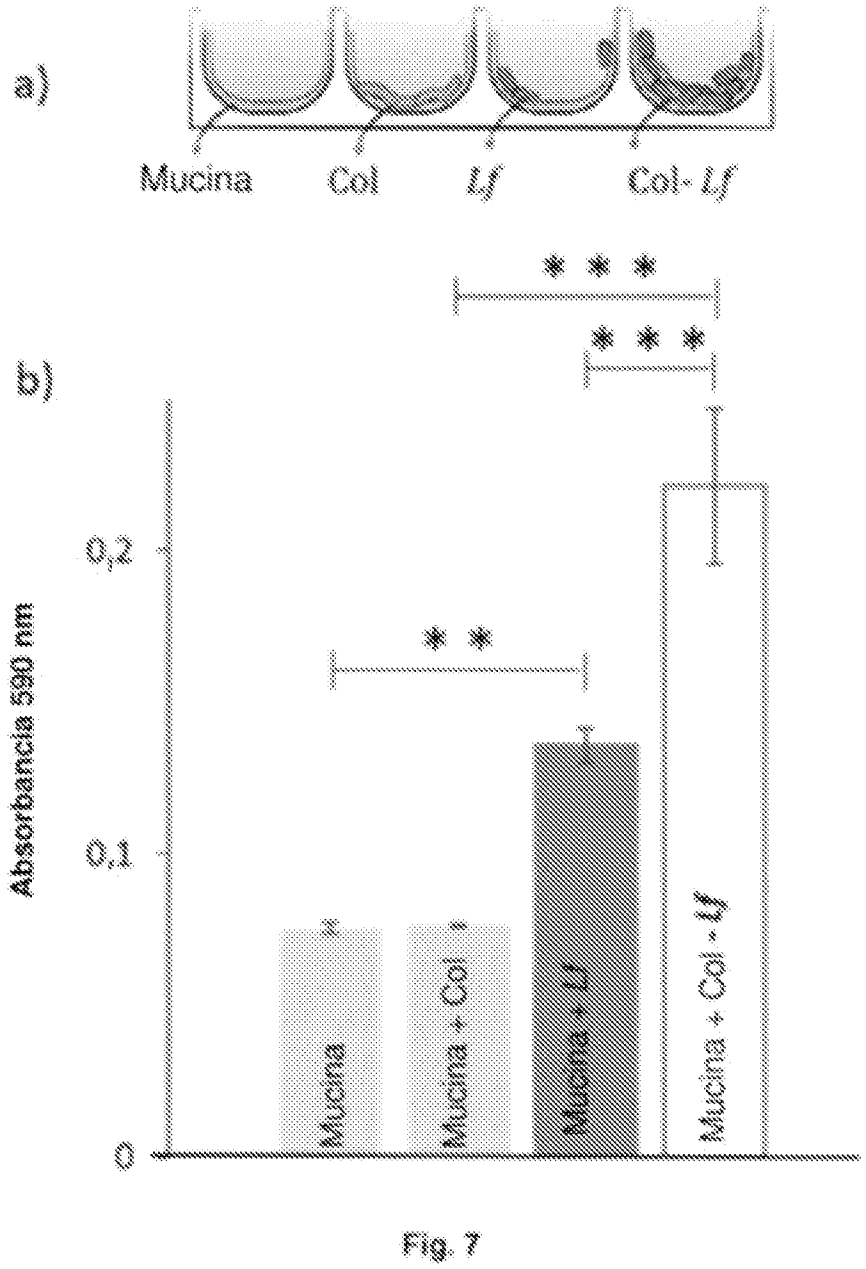

a)
Mucina
Col
Lf
Col- Lf
b)
Absorbancia 590 nm
0,2
0,1
0
Mucina
Mucina + Col
Mucina + Lf
Mucina + Col - Lf

Fig. 7

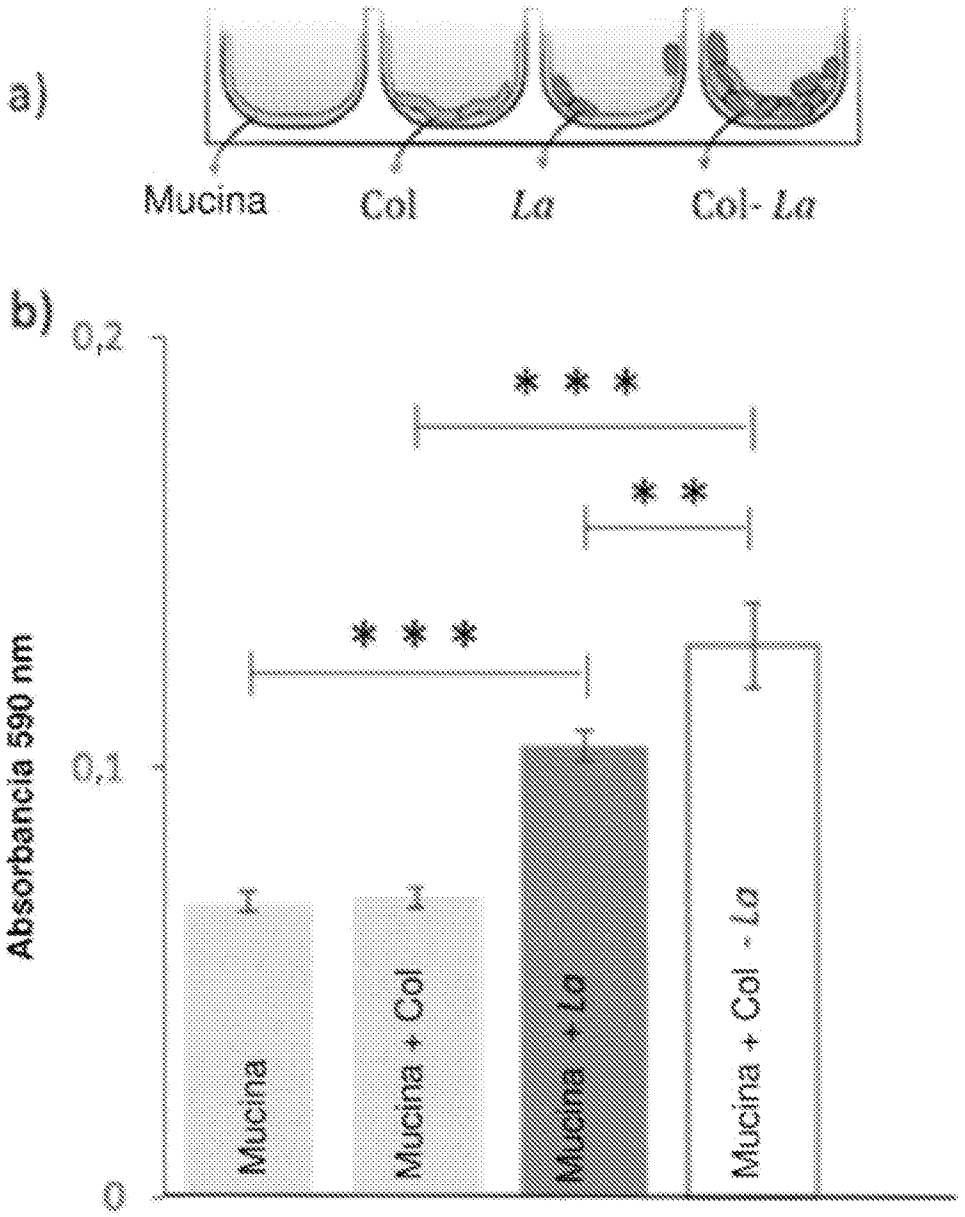

a)
Mucina
Col
La
Col- La
b)
Absorbancia 590 nm
0,2
0,1
0
* * *
* *
* * *
Mucina
Mucina + Col
Mucina + La
Mucina + Col - La

Fig. 8

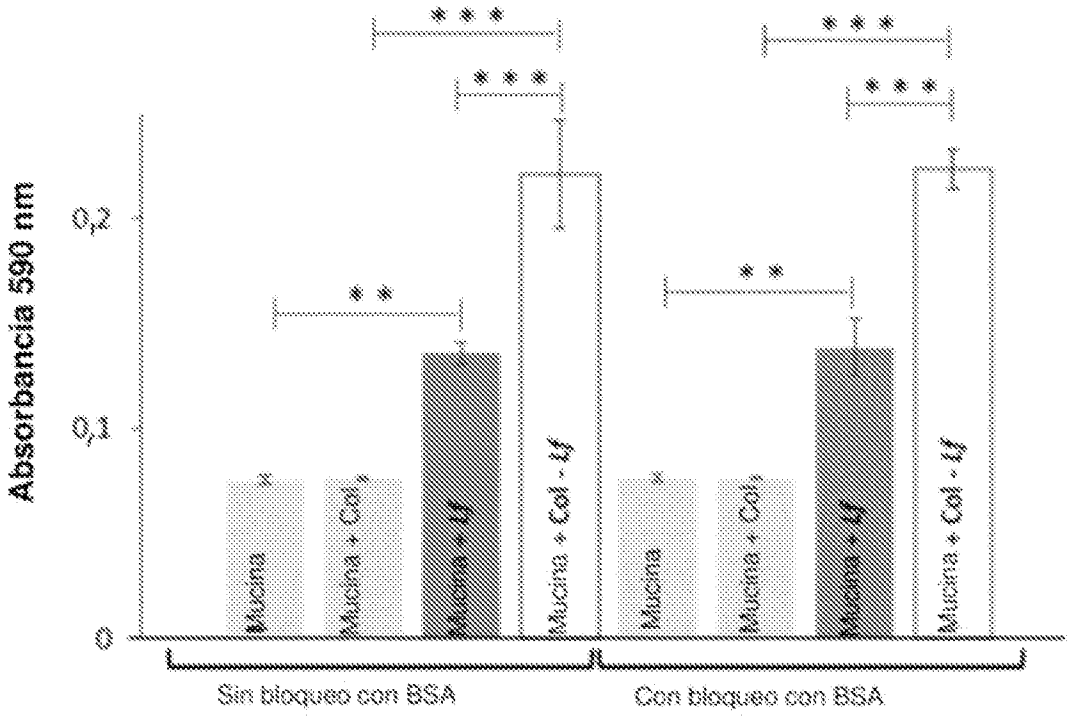

Absorbancia 590 nm
0
0,1
0,2
* * *
* * *
* *
* * *
* * *
* *
Mucina
Mucina + Col
Mucina + Uf
Mucina + Col - Uf
Mucina
Mucina + Col
Mucina + Uf
Mucina + Col - Uf
Sin bloqueo con BSA
Con bloqueo con BSA

Fig. 9

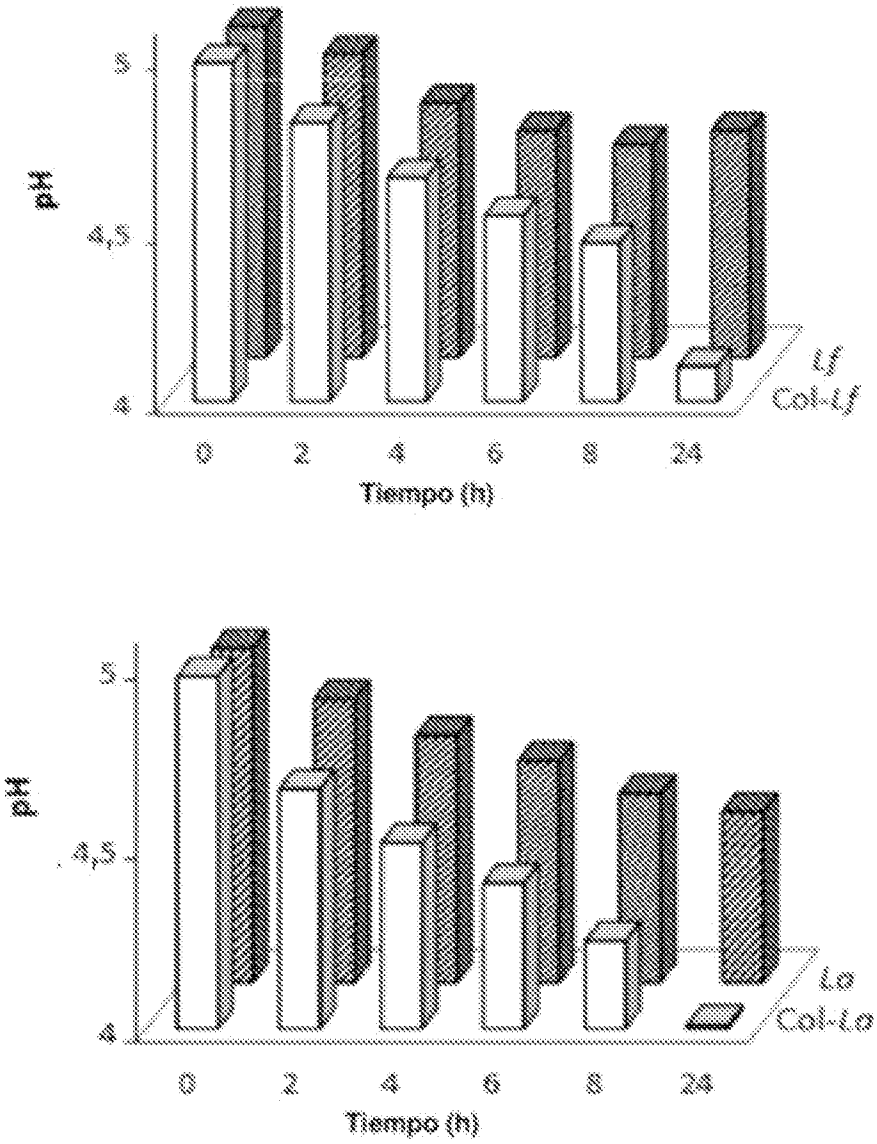

pH
5
4,5
4
0
2
4
6
8
24
Tiempo (h)
Lf
Col-Lf
pH
5
4,5
4
0
2
4
6
8
24
Tiempo (h)
Lo
Col-Lo

Fig. 10