

OP<sup>S</sup>  
JP



BT  
JCE

**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

Organización y  
Digitalización CSA Ltda

Delegatura de Propiedad Industrial  
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD  
**PATENTE DE INVENCION**



07-62893

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 Y SU USO

PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCION DE CANDIDIASIS

E INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

SCA HYGIENE PRODUCTS AB

DOMICILIO

GOTEBORG, SUECIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

608



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062893- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:39:33 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

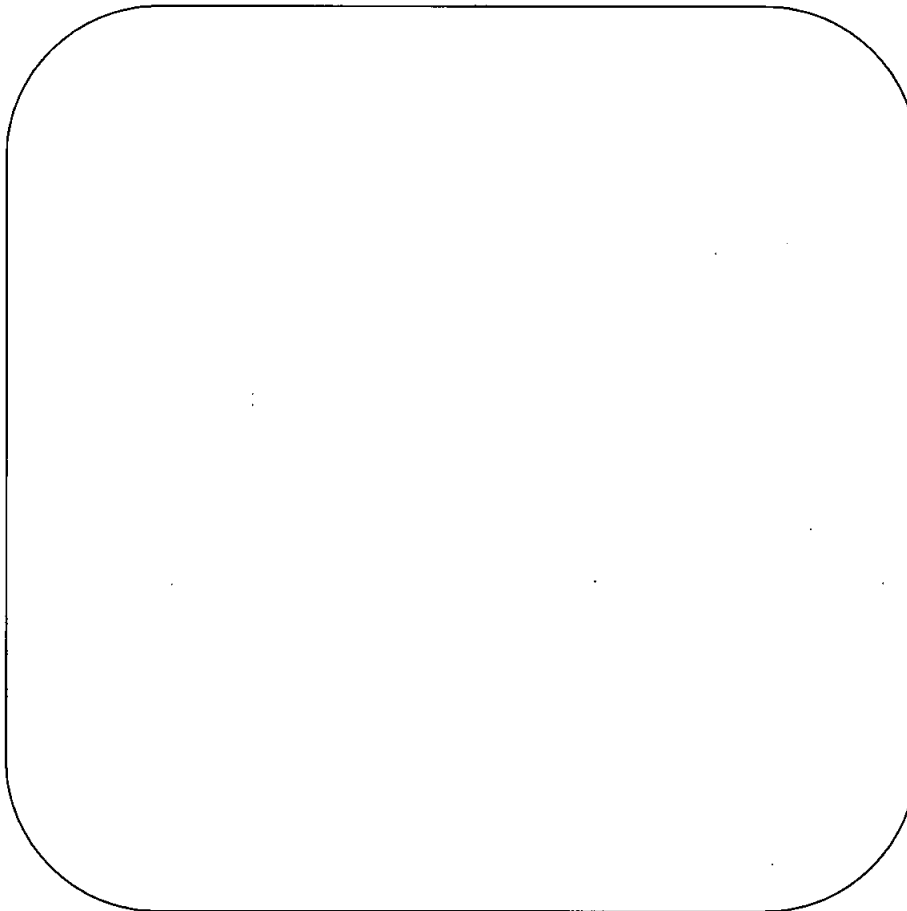
|                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>2</div> <div>SOLICITANTE</div> <div>(71)</div>                           | <div>Nombre: SCA HYGIENE PRODUCTS AB</div> <div>sociedad constituida y existente bajo las</div> <div>leyes de Suecia.</div> <div>Dirección: 405 03 Göteborg,</div> <div>Suecia</div> <div>Domicilio: Göteborg,</div> <div>Suecia</div> | <div>IDENTIFICACIÓN</div> <div>C.C. <input type="checkbox"/></div> <div>C.E. <input type="checkbox"/></div> <div>NIT <input type="checkbox"/></div> <div>Otro <input type="checkbox"/></div> <div>Cual</div> <div>Número</div>                               |
| <div>3</div> <div>REPRESENTANTE</div> <div>O APODERADO</div>                  | <div>Nombre: EMILIO FERRERO</div> <div>Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35</div> <div>Teléfono: 347 36 11</div> <div>Fax: 211 86 50</div> <div>E-mail: clientes@cavelier.com</div> <div>Domicilio: Bogotá, Colombia.</div>                | <div>IDENTIFICACIÓN</div> <div>C.C. <input checked="" type="checkbox"/></div> <div>C.E. <input type="checkbox"/></div> <div>NIT <input type="checkbox"/></div> <div>Otro <input type="checkbox"/></div> <div>Cual</div> <div>Número 438.019 T.P 31.929</div> |
| <div>4</div> <div>INVENTOR (ES)</div> <div>(72)</div>                         | <div>1. Ulrika HUSMARK</div> <div>Skogsvägen 6,</div> <div>435 38 Mölnlycke,</div> <div>Suecia</div> <div>3. Eva GRAHN HAKANSSON</div> <div>Nygatan 74,</div> <div>903 31 Umeå,</div> <div>Suecia</div>                                | <div>2. Ulla FORSGREN BRUSK</div> <div>Plommonvägen 35,</div> <div>435 43 Pixbo,</div> <div>Suecia</div> <div>4. Daniel RÖNNQVIST</div> <div>Rågången 1B,</div> <div>903 37 Umeå,</div> <div>Suecia</div>                                                    |
| <div>5</div> <div>PCT (86)</div>                                              | <div>Solicitud Internacional No. PCT/SE2006/001311</div> <div>Publicación Internacional No. WO 2008/060198 A1</div>                                                                                                                    | <div>Fecha: 17 de noviembre de 2006</div> <div>Fecha: 22 de mayo de 2008</div>                                                                                                                                                                               |
| <div>6</div> <div>Título (54)</div>                                           | <div>LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 Y SU USO PARA EL</div> <div>TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE CANDIDIASIS E INFECCIONES DEL TRACTO</div> <div>URINARIO</div>                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <div>7</div> <div>Clasificación Internacional (51)</div>                      | <div>C12N 001/020</div>                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <div>8</div> <div>Prioridad</div>                                             | <div>(33) País de Origen</div>                                                                                                                                                                                                         | <div>(32) Fecha</div>                                                                                                                                                                                                                                        |
| <div>SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/></div> |                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <div>9</div> <div>Comprobante de pago No.:</div>                              | <div>09-41,359</div> <div>09-39,886</div> <div>09-36,663</div>                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                              |
|                                                                               | <div>Fecha: 5 de junio de 2009</div> <div>1 de junio de 2009</div> <div>18 de mayo de 2009</div>                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                              |

10

**Anexos:**

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 17 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por \$425.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

**FIGURA CARACTERÍSTICA**

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA : *Emilio Ferrero*

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

**DOCUMENTOS ANEXOS**

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/060198 A1

Descripción:

Páginas 19 en el idioma original

Páginas 37 en español

Reivindicaciones: Número (s) 32

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.
4. ☒ Extracto de publicación.

**SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA  
FASE INTERNACIONAL**

CAVELIER

BOGOTÁ, COLOMBIA

## REPRESENTACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

## REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)  
SCA HYGIENE PRODUCTS AB

of/domicillado (s) en: 405 03 Goteborg,  
SWEDEN

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a Power of Attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy  
Gothenburg 19 February 1999

In/en

Signature

Bengt Forshult  
Head of Patent Department

Firma

SCA Hygiene Products AB

CAVELIER ABogados

COPIA CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE AL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA  
BOGOTÁ D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

TRADUCCION No. 174

10 JUN. 2003

AMPARO QUINTERO  
NOTARIA

Traductor e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
BOGOTÁ 2879 Min. Justicia

LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un certificado consular sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

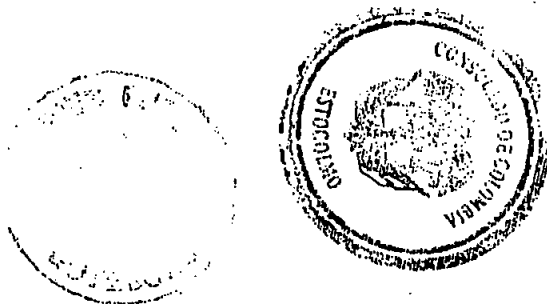
The Colombia Consul must issue a consular certifi. on (1) the legal existence of the company, which grants the Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).

TRADUCCION No: 1707/99  
MARIA ELVIRA MARTELO  
Traductora e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Res. No. 2879 Min. Justicia

RESPONSE BY MAIL  
H O SE ASME  
05:11 A 11:50  
LEGALIZACIONES  
05:11 A 11:50

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES  
that **Bengt Forshult**  
has personally signed this document overleaf, and  
that according to a Power of Attorney, dated 1998-08-11, signed by GUNNAR ANDERSSON and SVEN-ERIK WINLÖF, who are duly authorized to sign jointly for and on behalf of  
**SCA HYGIENE PRODUCTS AKTIEBOLAG - Org.No. 556007-2356**  
According to a Swedish Certificate of Registration, dated 1998-07-20, Bengt Forshult is duly authorized to sign such a document on behalf of the company.  
Gothenburg, this 25th day of February 1999  
-Ex officio:  
**RICKARD STRÖM**

Exp.No.: 79234  
Fee: SEK 350:-



PAGADO  
Impuesto de Timbre  
Derechos Consulares  
Cien  
dólares US\$ 7  
Papeles US\$ 100

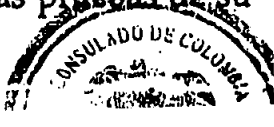
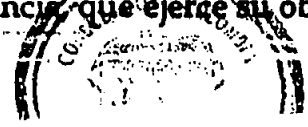
NO. 3066  
The Ministry for Foreign Affairs in Stockholm, hereby certifies that  
Mr **Rickard Ström**  
*Notary Public of Gothenburg*  
has issued and signed the

foregoing attestation in his official capacity.  
Fee Stockholm this 25th day of March 1999  
Kr 1200 PAID  
**AMPARO QUINTERO ARTURO**  
NOTARIA  
Inger Högberg

Fecha: 1999-03-05  
No: 022  
MARIA SMITH RUEDA  
Encargada de las Funciones Consulares

que el señor **Bengt Forshult**  
quien firma el documento se encuentra  
ejerciendo su cargo de representante de la Sociedad **SCA Hygiene Products Aktiebolag**  
que emite en cumplimiento de las leyes de Suecia  
según se me acredita en los documentos que tuve a la vista.

NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.



MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

Mario Smith Rueda  
2028133  
CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPEÑA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

079530

99 JUL 20 1999

CUYA FIRMA APARECE EN EL  
DOCUMENTO DESEMPEÑA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

TRADUCCION No. 1707  
MARIA DEL VIVA MARTINO  
Traductora e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Res. No. 2079 Min. Justicia

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA  
D.C. DEBO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE  
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA  
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA  
10 JUN. 2009  
AMPARO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA



EL CONSULADO DE COLOMBIA EN  
ESTOCOLMO, SUECIA

Fecha.....1999-07-01..... No:.....001329

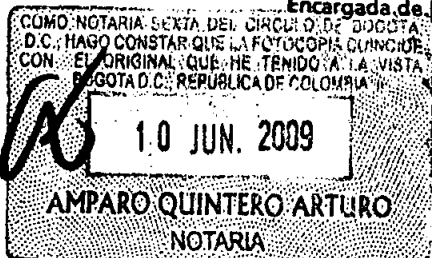
Previo la confrontación correspondiente DA  
FE de que la firma que aparece en este docu-  
mento es similar a la REGISTRADA aquí por

*Inger Höigberg, Relaciones  
Exteriores, Suecia*

*M. Smith*

MARIA SMITH RUEDA

Encargada de las Funciones Consulares



|                     |                                      |
|---------------------|--------------------------------------|
| PAGADO              |                                      |
| Impuesto de Timbre  | <i>Siete</i> dólares US\$ <i>7</i>   |
| Derechos Consulares | <i>Quince</i> dólares US\$ <i>15</i> |



TRADUCCION No.: 1709199  
MARIA ELVIRA MARTELO  
Traductora e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Res. No. 2879 Min. Justicia

6

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 17.07/99 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial aprobada por el Ministerio de Justicia por Resolución 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

(A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español, por el cual SCA HYGIENE PRODUCTS AB otorga poder a EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y GERMAN CAVELIER). Dado y firmado el 19 de febrero de 1999 en Gothenburg. (Firma ilegible) Bengt Forshult, Jefe del Departamento de Patentes.

\*\*\*\*\*

Yo, el abajo firmante RICKARD STRÖM, Notario Público de Gothenburg, Suecia, por el presente certifico,

que Bengt Forshult

ha firmado personalmente el documento anterior y

que de acuerdo con el poder de fecha 1998-07-20 por

GUNNAR ANDERSSON y SVEN-ERIK WINLÖF, quienes debidamente

autorizados para firmar conjuntamente por y a nombre de SCA

HYGIENE PRODUCTS AKTIEBOLAG - Org. No. 556007-2356, según

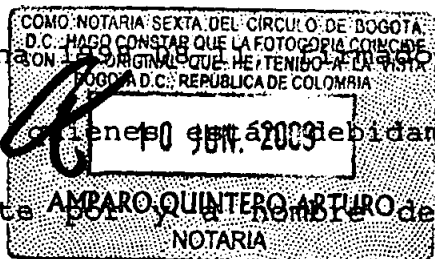
Certificado de Registro Sueco de fecha 1998-07-20, Bengt Forshult está debidamente autorizado para firmar dicho documento a nombre de la compañía.

Gothenburg, 25 de febrero de 1999.

Ex officio: (Firma ilegible), RICKARD STRÖM (Sello notarial).

Exp. No.: 79234

Derechos: SEK 350:--



7  
NO. 3066

El Ministerio de Relaciones Exteriores en Estocolmo por el presente certifica que el Sr. Rickard Ström, Notario Público de Goteborg, ha expedido y firmado la declaración anterior en su capacidad oficial.

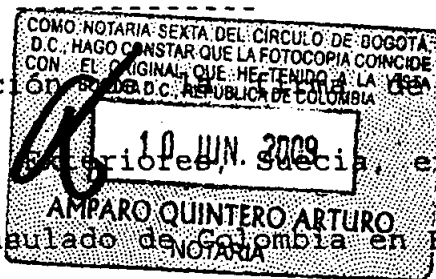
Derechos Estocolmo, 25 de marzo

Kr. 120 PAGADOS de 1999

(Firma ilegible) Inger Högberg. (Sello en tinta) Ministerio de Relaciones Exteriores.

-----  
(En español) Certificación de la capacidad legal de Bengt Forshult y de la existencia legal de SCA HYGIENE PRODUCTS AKTIEBOLAG expedida el 5 de marzo 1999 por el Consulado de Colombia en Estocolmo bajo el No. 022. (Firma) M. Smith. MARÍA SMITH RUEDA, Encargada de las Funciones Consulares. Sello consular en tinta. Pagados impuesto de timbre y derechos consulares.

(En español) Certificación de la capacidad legal de Inger Högberg, Ministerio de Relaciones Exteriores, Suecia, expedida el 01 de julio de 1999 por el Consulado de Colombia en Estocolmo bajo el No. 001329. (Firma) M. Smith. MARÍA SMITH RUEDA, Encargada de las Funciones Consulares. Sello consular en tinta. Pagados impuesto de timbre y derechos consulares.



-----  
(Al anverso) Legalización de la firma que antecede expedida por

el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 119916 del 14 de febrero del 2000, firmado por el Jefe de Legalizaciones.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 11256-801-014-7

Id. 108

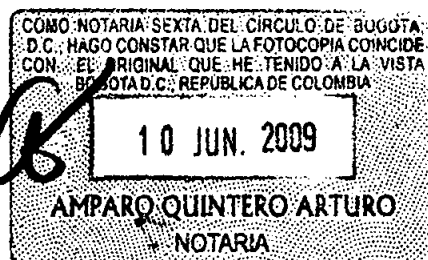
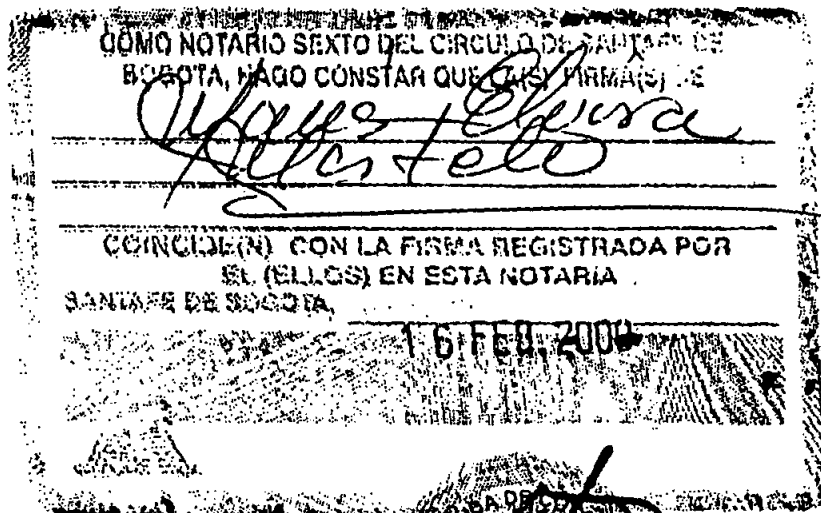
Feb. 15/00

*Maria Elvira Martelo*  
TRADUCCION No. 110799  
MARIA ELVIRA MARTELO  
Traductora e Interprete Oficial  
Inglés - Español - Inglés  
Res. No. 2879 Min. Justicia

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES  
220552  
C/ J. R. A. MARTELO  
C/ J. R. A. MARTELO  
C/ J. R. A. MARTELO  
C/ J. R. A. MARTELO  
C/ J. R. A. MARTELO

COMO NOTARIA: SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA  
D.C. HA CONSTATADO QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE  
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA  
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA  
10 JUN. 2009  
AMPARO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO  
2000 FEB 16/00 12/02  
Jefe de LEGALIZACIONES  
SANTAFÉ DE BOGOTÁ



2418  
9

## APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suecia

El presente documento oficial

2. ha sido firmado por Anne-Marie Bonde

3. en su calidad de Notario Público

4. y lleva el timbre/sello de Notario Público  
en Estocolmo

Lo cual se certifica

5. en Estocolmo

6. el 23.04.2009

7. por Björn Sandin

Notario Público

8. No 1756

9. Timbre/Sello:

10. Firma:

*[Handwritten signature]*



P 11014 ESS I

CAVELIER

374

ABOGADOS  
EDIFICIO SISKI  
CALLE 4a N° 72-35  
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

CESION

(nosotros) abajo firmado (s)

Ulrika HUSMARK  
Ulla FORSGREN BRUSK  
Eva GRAHN HAKANSSON  
Daniel RONNOVIST

niciado(s) en  
Skogsvägen 6, 435 38 Mölnlycke, Suecia  
Plommonvägen 35, 435 43 Pixbo, Suecia  
Nygatan 74, 903 31 Umea, Suecia  
Rågängen 1B, 903 37 Umea, Suecia

laro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)  
la invención:  
CTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 Y SU  
O PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCION DE CAN-  
DIASIS E INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

laro(amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin  
itación, a favor de la sociedad

SCA Hygiene Products AB

stituida y existente de conformidad con las leyes de  
Suecia

niciada en Göteborg, Suecia

os los derechos inherentes a dicha invención y que la citada  
mpañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de  
ención correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned  
Ulrika HUSMARK  
Ulla FORSGREN BRUSK  
Eva GRAHN HÅKANSSON  
Daniel RÖNNQVIST

of  
Skogsvägen 6, 435 38 Mölnlycke, Sweden  
Plommonvägen 35, 435 43 Pixbo, Sweden  
Nygatan 74, 903 31 Umeå, Sweden  
Rågängen 1B, 903 37 Umeå, Sweden

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:  
LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 AND ITS  
USE FOR THE TREATMENT AND/OR PREVENTION OF  
CANDIDIASIS AND URINARY TRACRINFECTIONS

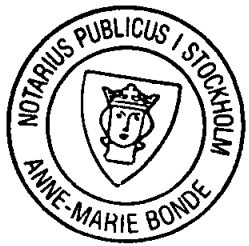
state as well, that assign, without reservations or limitations in favour  
of

SCA Hygiene Products AB

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of  
Sweden

domiciled in Göteborg, Sweden

all rights inherent to said invention and that the above mentioned  
company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding  
patent invention, in the Republic of Colombia



Dado y firmado hoy/Given and  
signed this  
en/in

Por/by

Ulrika Husmark

Ulla Forsgren Brusck

Eva Grahn Håkansson

Eva Grahn Håkansson

Daniel Rönqvist

Daniel Rönqvist

### CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 23 días del mes de abril

de 200 9 Ante mí, Notario Público de

compareció(eron) personalmente U. Husmark,  
U. Forsgren Brusck, E. Grahn Håkansson  
Daniel Rönqvist

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)  
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)  
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

Anne-Marie Bonde

NOTARIO PÚBLICO-NOTARY PUBLIC

### NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

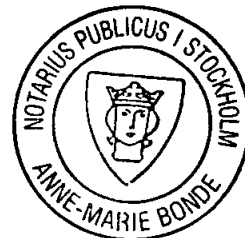
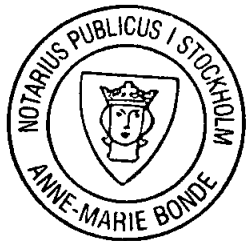
On this 23 day of April

200 9 before me, a Notary Public of

personally appeared U. Husmark, U. Forsgren  
Brusck, E. Grahn Håkansson and  
D. Rönqvist

to me known, and known to me to be the person(s) who executed  
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to  
execute it.

Anne-Marie Bonde



### APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- Country: .....  
This public document
- has been signed by .....
- acting in the capacity of .....
- bears the seal/stamp of .....

### Certified

- at .....
- by .....
- No. ....
- Seal/stamp
6. the .....
10. Signature

12

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
22 May 2008 (22.05.2008)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 2008/060198 A1**

(51) International Patent Classification:  
*C12N 1/20* (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)  
*A61K 35/74* (2006.01)

(74) Agent: UNGE, Annika; Valca AB, P O box 7086, S-103 87 stockholm (SE).

(21) International Application Number:  
PCT/SE2006/001311

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date:  
17 November 2006 (17.11.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(84) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (*for all designated States except US*): SCA HYGIENE PRODUCTS AB [SE/SE]; S-405 03 Göteborg (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): HUSMARK, Ulrika [SE/SE]; Skögsvägen 6, S-435 38 Mölnlycke (SE). FORSGREN BRUSK, Ulla [SE/SE]; Plommonvägen 35, S-435 43 Pixbo (SE). GRAHN HÅKANSSON, Eva [SE/SE]; Nygatan 74, S-903 31 Umeå (SE). RÖNNQVIST, Daniel [SE/SE]; Rågängen 1B, S-903 37 Umeå (SE).

Published:

— with international search report  
— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description



WO 2008/060198 A1

(54) Title: LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 AND ITS USE FOR THE TREATMENT AND/OR PREVENTION OF CANDIDIASIS AND URINARY TRACRINFECTIONS

(57) Abstract: The present invention relates to a novel strain of Lactobacillus fermentum, denoted strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851. Lactobacillus fermentum, strain Ess-1, has shown valuable properties in the inhibition of Candida. The invention therefore also relates to the medical use of Lactobacillus fermentum strain Ess-1, in particular for the treatment and/or prevention of candidiasis and urinary tract infections. The invention also relates to pharmaceutical products and articles comprising this novel bacterial strain.

*Lactobacillus fermentum* Ess-1, DSM17851 and its use for the treatment and/or prevention of candidiasis and urinary tract infections.

#### Technical field

The present invention relates to the field of probiotic bacteria having a beneficial effect on *Candida* yeast infections, i.e. candidiasis, and bacterial infections. The invention also relates to pharmaceutical compositions and products for personal care comprising such bacteria, and the medical use of such bacteria.

#### Background art

The usual flora in the urogenital region is constituted by a complex ecosystem comprising more than 50 different bacterial species (Hill *et al.*, Scand. J. Urol. Nephrol. 1984(86 (suppl.)):23-29). The normal flora is dominated by bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* (LB) which are Gram positive rods adapted to the environment in the vagina of the fertile woman. These bacteria also contribute to the maintenance of the specific milieu and the ecological balance in the vagina. The surrounding pH in the vagina is lower than 4.5. Yeast and enterobacteria are scanty or absent (Redondo-Lopez *et al.*, Rev. Inf. Dis. 1987(12):856-872).

Some LB strains inhibit growth of potentially pathogenic bacteria by various mechanisms. The metabolism of LB results in formation of organic acids, in particular lactic acid and acetic acid, which contribute to the low pH of vaginal fluid, which is unfavorable for many other microbial species. LB may also produce soluble substances which directly inhibit growth of potentially pathogenic bacteria and yeast. They can also produce hydrogen peroxides, which is toxic to bacteria and fungi. These inhibiting characteristics may vary considerably between different LB strains (Hooton *et al.*, JAMA 1990(265):64-69).

Similarly to the urogenital area, the skin is colonized by an array of organisms, which forms its normal flora. The numbers and identity of the organisms vary between different skin sites, with moist and lipid skin areas harbouring more microorganisms per skin area. This, together with the skin's structural barrier, provides the host with an excellent defense against invading microbes. The number of bacteria on the skin varies from a few hundred per cm<sup>2</sup> on the arid surfaces of the forearm and back, to tens of thousands per cm<sup>2</sup> on the moist areas such as the axilla and groin. This normal flora plays an important role in preventing 'foreign' organisms from colonizing the skin, but it needs to be kept in check, in order to avoid skin infections.

The gastro intestinal (GI) tract, from mouth to anus, harbors a rich flora of more than 500 different bacterial species, some of which have important health functions. The GI flora consists of about 10<sup>14</sup> bacteria and a low number of commensally yeast. Due to a changed general health state, *Candida* species may overgrow and cause superficial infections. Furthermore,

overgrowth of *Candida* species among immunocompromised patients can lead to a systemic infection which is a very serious condition.

Weakness of or imbalance in the natural defense system may allow potentially pathogenic micro-organisms to cause clinical infection, for example in connection with medication, inferior personal care, or shifts in the microflora or mucous membranes. Shifts in the micro-flora can also be found in connection with different pathogenic conditions.

Yeast organisms are always present in humans, but are usually prevented from overgrowth by the indigenous microbial flora. Candidiasis is an infection caused by *Candida* yeast organisms that affects a wide variety of organ systems. Most commonly, the infection is caused by *Candida albicans*, and *C. glabrata*. Less commonly, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. krusei* cause the infection and rarely, other *Candida* species are the causative agent. Candidiasis is often triggered by hormonal changes, such as during pregnancy, menstruation and the use of birth control pills. Other common causes are imbalances in the pH in the vagina, diabetes mellitus, and antibiotic cures, disturbing the delicate microbiological balance of the body. The natural host defense against *Candida* infections include mechanical barriers, non-specific antimicrobial substances (polypeptides, basic proteases), phagocytosis, and specific immune response (T- and B-lymphocytes, delayed-type hypersensitivity).

In immunocompetent persons, any warm, moist part of the body exposed to the environment is susceptible to infection causing vaginitis; vulvar rash; oral thrush; conjunctivitis; endophthalmitis; diaper rash; and infections of the nail, rectum, and other skin folds. In immunocompromised patients, systemic illnesses such as myocarditis, hepatosplenic abscess, pulmonary infection, CNS infection, and chronic disease may occur. Candidiasis may spread from a local infection to cause a systemic infection with serious complications, such as myocarditis, endophthalmitis and hepatosplenic abscess. It is therefore of great importance to find effective cures and preventive treatments for candidiasis, to avoid this serious condition in subjects.

Thrush is the common name for a mouth infection caused by the *Candida albicans* fungus that affects moist surfaces around the lips, inside the cheeks, and on the tongue and palate. Thrush is common in people with diabetes or irritation from dentures. Also people with diseases such as cancer and AIDS, which both suppress the immune system, are often affected by candidiasis.

A *Candida* infection of the mouth can spread to the esophagus, causing esophagitis. This infection is most common in people with AIDS and people receiving chemotherapy for cancer.

*Candida* infection are also common on moist skin parts, such as skin areas covered by diapers, the hands of people who routinely wear rubber gloves, the rim of skin at the base of the

15

finger nail, especially for hands that are exposed to moisture, areas around the groin and in the crease of the buttocks, and the skin folds under large breasts.

Vaginitis is an inflammation of the vaginal mucosa caused by bacteria or fungi. Vaginitis is in itself initially harmless but can lead to premature birth in pregnant women or infertility.

Vaginal candidiasis causes an itching and irritated vagina with whitish, limpy discharge that may resemble cottage cheese. It is often very discomforting for the woman experiencing the symptoms and in addition causes restrictions to normal activities, such as sport exercises and sexual activity.

Vaginal candidiasis is normally treated locally by creams, suppositories, gelatin capsules, vaginal tablets and ointments comprising antifungal agents. Orally administered cures are also available. One problem with antifungal agents is an increased resistance of the fungus to the agent if used repeatedly. In addition, such cures are often inefficient and require a doctor's prescription.

Home remedies, such as application of yoghurt, acidophilus tablets or vinegar douches are also used for treating candidiasis. However, the efficiency of these treatments has been low. Although yoghurt comprises lactobacilli, these are not especially adapted for killing or reducing the growth of fungi. As is understood by the person skilled in the art, such a treatment can only be effective to mitigate the symptoms of minor infections. It has also been suggested that lactic acid producing bacteria can be delivered via absorbent articles, such as diapers, sanitary napkins, panty liners and tampons, as described in e.g. WO97/02846, WO99117813, WO99/45099 and WO00/35502.

There is an increasing interest in finding probiotic microorganisms being able to restore a healthy microbial flora and/or prevent the uncontrolled growth of unwanted microorganisms. Administration of such probiotic bacteria do not have the negative side effects of antifungal agents and preferably are more efficient in the treatment and/or prevention of fungal infections. Previous attempts to find such microorganisms have had various successes though, due to problems such as low attachment and survival of the probiotics in the vagina, limited efficiency in the prevention of fungal growth, low survival during storage of the preparations etc. Other important features of a selected probiotic is ability to grow in the presence of oxygen and survive freeze-drying. Most importantly though, the probiotic bacterium selected must be efficient in the killing and/or prevention of growth of unwanted fungi and/or bacteria. Probiotic lactobacilli have previously been proven efficient in the treatment and prevention of bacterial vaginitis. However, success in the prevention and/or treatment of vaginal candidiasis has been very limited. Therefore, there is still a need for the development of efficient probiotics for the treatment of candidiasis, including vaginal candidiasis, that also may be effective against bacterial infections, such as urinary tract infections.

16

### Summary of the invention

The object of the invention is to provide a probiotic bacterium for the treatment and/or prevention of candidiasis and/or bacterial infections, such as urinary tract infections.

The above defined object is in a first aspect of the invention achieved by providing a novel *Lactobacillus fermentum* strain, referred to as Ess-1, which has been deposited as the Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851.

In another aspect the invention relates to the use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, for the use as a medicament.

In another aspect the invention relates to the use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of candidiasis.

In another aspect the invention relates to the use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of bacterial infections, such as urinary tract infection.

In yet another aspects the invention relates to a pharmaceutical composition comprising *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier, excipient and/or diluent.

In a yet further aspect, the invention relates to a sanitary article comprising *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1.

The invention also relates to a method of preparing a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of candidiasis comprising adding *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, to said pharmaceutical composition.

In addition, the invention relates to a method of preparing a sanitary article for the treatment and/or prevention of candidiasis comprising adding *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, to a sanitary article.

Since the novel strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, has been demonstrated to provide excellent inhibition of growth of *Candida* fungi, this novel bacteria strain has shown valuable properties for use in the preparation of a medicament for the treatment and/or prevention of candidiasis. In addition the invention solves the problem of providing products and articles for the delivery of this novel bacterial strain to body areas of interest for such a treatment and/or prevention.

### Definitions

In the present context an antifungal agent is a drug used to treat fungal infections, which drug is not a probioticum as defined below.

Probioticum/probiotics in the present context relates to live microorganisms that confer a health benefit when administered in adequate amounts to a host.

Candidiasis in the present context relates to an infection caused by *Candida* fungi present in or on any body part, such as the skin, urogenital region, mouth, oesophagus or intestines.

Oral supplement in the present context relates to a composition that is orally administered, such as a spray, a tablet, a chewing gum etc.

Biologically pure in the present context relates to a culture of a bacterium which only contains one specific bacterial strain.

The term "sanitary article" refers to products that are placed against the skin of the wearer to absorb and contain body exudates, like urine, faeces and menstrual fluid, and also to products that are used for cleaning and caring of the skin and the urogenital area and that also can be used to deliver probiotic bacteria to these areas. The invention mainly refers to disposable sanitary articles, which means articles that are not intended to be laundered or otherwise restored or reused as a sanitary article after use. Examples of disposable sanitary articles include wet wipes, dry wipes, feminine hygiene products such as sanitary napkins, panty liners, sanitary panties and tampons; feminine inserts; diapers and pant diapers for infants and incontinent adults; incontinence pads; diaper inserts and the like.

The term "absorbent article" refers to products that are placed against the skin of the wearer to absorb and contain body exudates, like urine, faeces and menstrual fluid. Examples of disposable sanitary articles include feminine hygiene products such as sanitary napkins, panty liners, sanitary panties and tampons; feminine inserts; diapers and pant diapers for infants and incontinent adults; incontinence pads; diaper inserts; and the like.

By "hygiene tissue" is meant any device for wiping skin, for instance a washcloth, patch, towelette, napkin, wet wipe, dry wipe and the like.

By "lipid" is in the present context meant substances that are insoluble in water but soluble in an organic solvent.

178

### Brief description of the drawings

**Figure 1** shows the mean inhibition of growth on three strains each of *C. albicans* and *C. glabrata*. ■ = *C. albicans*, □ = *C. glabrata*. \*dMRSs pH adjusted to the lowest registered pH of all filtrates (pH 3.7). 0 Indicates no visual growth, 5 indicates very good growth.

**Figure 2** shows the growth inhibition on *C. albicans* in 50 mM ascorbic acid (Fig. 2a) and 50 mM propionic acid (Fig. 2b), in Ess-1 filtrate and in Ess-1 filtrate with addition of 50 mM ascorbic acid (Fig. 2a) and 50 mM propionic acid (Fig. 2b). 0 indicates no visual growth, 5 indicates very good growth.

**Figure 3** shows production of succinic acid, acetic acid and propionic acid in five different *Lactobacillus* strains, including Ess-1. The strains were grown in MRS broth and the acid production was registered in the broth after the supernatant had been sterile filtered.

### Detailed description of the invention

The present invention is related to a novel strain of *Lactobacillus fermentum*, hereinafter called Ess-1, deposited according to the Budapest Treaty at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) and assigned accession number DSM17851 (depositor Essum AB, Box 3160, SE 90304 Umeå, Sweden, deposited on January 6, 2006). The strain has shown unique properties in the treatment/and or prevention of *Candida* infections, i.e. candidiasis, due to its inhibitory properties on growth of *Candida* yeast. Also the strain Ess-1 has shown valuable properties in the treatment and/or prevention of bacterial infections, such as urinary tract infections. In addition, Ess-1 survives long periods of storage which is important for convenience when handling products comprising the bacterium. Also, Ess-1 is not strictly anaerobic but can grow in the presence of oxygen and survives freeze-drying well. The Ess-1 strain of *Lactobacillus fermentum* of the invention is biologically pure.

As demonstrated in Example 1, Ess-1 exhibit a unique inhibition of growth of different strains of *Candida* yeast. In this experiment a large number of *Lactobacilli* strains were tested for their growth inhibitory properties of *Candida*. The 23 best strains were chosen for further studies. The growth inhibition of Ess-1 is more than twice than can be demonstrated for the best out of these 23 different *Lactobacillus* strains used for comparison. Also, Ess-1 was demonstrated to inhibit growth of a number of different bacterial strains known to cause urinary tract infection. In addition, Ess-1 was demonstrated to be able to colonize and survive in the vagina when administered to the vagina. Importantly, Ess-1 survives in the vagina also during menstruation. Colonization and survival *in vivo* after administration to a subject is an important factor for the success of a probioticum to perform its intended tasks. However, lack of, or limited, colonization and survival *in vivo* often limit the practical usefulness of probiotic lactic acid producing bacteria. In addition, limited survival during storage and handling of products comprising lactic acid producing bacteria often result in the use of ineffective products.

79

In a first aspect the present invention relates to a novel *Lactobacillus fermentum* strain, denoted strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851.

Due to strain Ess-1's inhibitory properties on growth of *Candida* and bacteria causing urinary tract infections, the present invention also relates to the medical use of this strain. In particular the invention relates to the use of strain Ess-1 for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of candidiasis preferably of a mammal subject, more preferably a human subject. The invention in another preferred embodiment relates to the use of strain Ess-1 for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of candidiasis in the urogenital region, such as vaginal candidiasis. In another preferred embodiment, the present invention relates to the use of strain Ess-1 for the preparation of a pharmaceutical composition for prevention and/or treatment of esophagitis. Another preferred embodiment of the present invention relates to the use of strain Ess-1 for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of thrush.

As the novel Ess-1 strain of the present invention was experimentally (see "Experimental section") shown to inhibit growth of a number of different bacteria causing infection, such as urinary tract infection, another aspect of the invention relates to the use of strain Ess-1 for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of bacterial infections, such as urinary tract infection.

In one aspect the present invention relates to the use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for oral administration.

In one preferred embodiment the pharmaceutical composition comprising *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, also comprises one or more pharmaceutically acceptable carriers, excipients and/or diluents. Generally such agents should be non-toxic to the recipients at the concentrations and dosages used. Examples of such agents are buffers, thickening agents of gel forming agents such as glycerine, polyethylene glycol, antioxidants (e.g. ascorbic acid), polypeptides of low molecular weight (less than about 10 residues), proteins, carbohydrates including glucose, sucrose and dextrans. Examples of carriers include sugars, such as lactose, glucose and sucrose; starches, such as corn starch and potato starch; cellulose and its derivatives such as sodium carboxymethylcellulose, ethylcellulose and cellulose acetates; trehalose; powdered tragacanth, malt; gelatin; talc; stearic acids; magnesium stearate; calcium sulfate; polyols such as propylene glycol, glycerine, sorbitol, mannitol, and polyethylene glycol; agar; alginic acids; pyrogen-free water; isotonic saline; and phosphate buffer solution. In one preferred embodiment of the invention, a carrier providing an anhydrous environment is used as a carrier for the probiotic bacteria. Such an anhydrous environment prolongs the survival of the

bacteria during manufacture, transport and storage. One example of such carriers are lipid carriers including petroleum-derived lipids, such as paraffinum liquidum (mineral oils, paraffin oils, and other oils), petrolatum (Vaseline and petroleum jelly), cera microcrystalline, ozokerite, ceresine and paraffins. Alternatively, synthetic lipids, such as dimethicone, cyclomethicone and silicone esters, such as cetearyl methicone can be used. A third alternative is to use animal- or plant-derived lipids, which usually are triglycerides. The animal- and plant-derived lipids are often mixtures of mono-, di- and triglycerides and free fatty acids. The lipids may be purified, hydrogenated, refined, modified and used alone or in different mixtures. Examples of suitable, original animal-derived lipids include beeswax, emu oil, lactic lipids, lanolin, shark liver oil and tallow. Examples suitable of plant-derived original lipids include apricot kernel oil, arachis oil, avocado oil/wax, bayberry wax, black currant seed oil, borage seed oil, brazil nut oil, camelia sinensis oil, candelilla wax, canola oil, carnauba wax, castor oil, cocoa butter, coco- nut oil, corn oil, cotton seed oil, dog rose seed oil, evening primrose seed oil, grape seed oil, illipe butter, jasmine wax, jojoba wax, lavender wax, linseed oil, mango seed oil, olive oil, orange wax, palm oil, palm kernel oil, peanut oil, rice wax, safflower oil, sesame seed oil, shea butter, soybean oil, sunflower seed wax, sweet almond oil, oil of theobroma and wheat germ oil. The use of lipid carriers has the additional advantage of increasing the transfer of bacteria to the user, for example when the pharmaceutical composition is administered via a sanitary product, such as an absorbent product or a hygiene tissue (see e.g. WO 04/060416). Examples of preferred lipids include petrolatum and silicon wax. Wetting agents and lubricants such as sodium lauryl sulfate, and coloring agents, lubricants, tableting agents, stabilizers and preservatives can also be present. Preferred pharmaceutically acceptable carriers are trehalose or a lactobacillus growth factor, e.g. inulin and/or oligofructose, polydextrose, lactitol or resistant starch, in powder or other form. A pharmaceutical composition according to the present invention may in one preferred embodiment also comprise, in addition to *Lactobacillus fermentum* Ess-1 cells, an organic acid and/or a salt thereof, such as acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid, valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof, preferably acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid or succinic acid and/or a salt thereof, most preferably ascorbic acid, acetic acid, propionic acid, succinic acid and/or a salt thereof. A synergistic effect may be obtained by combining the probiotic Ess-1 with organic acids and/or salts thereof, which organic acid has a pKa value not exceeding 5.5. The organic acids or the corresponding salts should be of such nature that when applying them onto a sanitary article they should not cause any skin irritation to the wearer of the sanitary article, therefore the pKa of the organic acid, when the measurement are performed in water at 25 °C, should preferably not be lower than 2. If the pKa values instead are too high, the organic acids or the salts thereof will mainly be in their acid forms. This means that the additive will not be sufficiently dissociated into a hydrogen ion and its deprotonated, anionic form, which is believed to be a prerequisite for said effect with the probiotic bacteria or the extracellular product thereof. Therefore at least one of the pKa values for the organic acid suitable for the present invention should be lower than 5.5, preferably lower than 5. In addition, nutrients for bacterial propagation, such as amino acids, peptides, nucleic acid derivatives,

28

vitamins, salts, fatty acids, glucose, fructose, ribose, maltose and lactose can be added to the pharmaceutical composition, alone or in different combinations.

A pharmaceutical composition according to the present invention is preferably administered in the form of a spray, cream, powder, suppository, liquid for oral administration, capsule, tablet, vaginal insert or oral supplement. Compositions for dermal treatment may e.g. be prepared according to US 2006/0171936.

Other examples of products comprising strain Ess-1 are a powder in a glove, lozenge, chewing gum, mouth wash or mouth spray.

In addition, a pharmaceutical composition according to the present invention may also comprise a substance that reduces odors, such as zeolites, silica, cyclodextrin and activated carbon. Also, substances which have the ability to increase the attachment of lactobacilli and/or substances that decrease the attachment of pathogenic microorganisms may be comprised in a pharmaceutical composition according to the invention.

The pharmaceutical composition according to the present invention can be administered as a single dose, but is preferably administered in multiple doses. The pharmaceutical composition may also preferably be administered in connection with the administration of antifungal agent(s).

In one preferred embodiment the pharmaceutical composition according to the invention comprises dried bacterial cells, such as freeze dried cells, spray dried cells or air dried cells. Such cells have good survival abilities during storage (see the experimental section of a study of survival of freeze dried cells).

The pharmaceutical composition according to the invention comprises preferably  $10^4$  to  $10^{11}$  colony forming units (cfu), more preferably  $10^6$  to  $10^{10}$  cfu, even more preferably  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU, of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 per dose.

The pharmaceutical composition or product according to the invention may, in addition to Ess-1, comprise other bacteria with probiotic properties in order to obtain a broader clinical effect. Preferred such bacteria for the object of the present invention include lactic acid producing bacteria, e.g. from the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, non-pathogenic members of the *Bacillus* genus, all members of the *Bifidobacterium* genus, and *Pseudomonas limbergii*. Preferred members of the *Lactobacillus* genus include *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cereale*, *Lactobacillus delbrukei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasei*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus papacasai* sp. *paracasai*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis* and the like. More preferably the selected bacterium used is from the species *Lactococcus lactis*,

*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus curvatus* or *Lactobacillus plantarum*. Other preferred examples include non-pathogenic species of *Coccus* species, such as *S. naltivarius*, *S. oralis* and *S. mitis*. One even more preferred example of such a lactic acid producing bacterium include, but is not limited to, *Lactobacillus plantarum*, strain LB931 (EP 1060240, accession number DSM 11918 with the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen).

The pharmaceutical composition according to the invention may be incorporated in a variety of different products. For example, a powder comprising Ess-1 may be provided in different types of protection gloves. Such gloves often provide a humid environment for the hands which may facilitate the growth of fungus resulting in fungal infections of the skin and nails of hands.

The present invention in another aspect relates to a sanitary article comprising *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851. Such a sanitary article may be an absorbent article such as a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, a panty liner, a sanitary panty or tampon; feminine insert; a diaper and pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert. Also, a sanitary article may be a hygiene tissue such as a washcloth, patch, towelette, napkin, wet wipe or dry wipe. A hygiene tissue suitable for the present invention has previously been described in WO 04/060416. The lactic acid producing bacteria were there "encapsulated" in a lipid in an anhydrous environment in order to protect the bacteria from moisture during storage and to facilitate transfer to the user of the hygiene tissue. Such a hygiene tissue may also optionally comprise one or more cleaning additives such as emollients, emulsifiers, moisturizers, pH-regulating agents, chelating agents, viscosity modifiers, antimicrobial agents, preservatives and fragrances, as disclosed in WO 04/060416. Further details on suitable agents commonly added to skin cleaning products are given in Woodruff's Ingredients and Formulary Handbook, John Woodruff, First ed., 1997, Miller Freeman FJK Ltd. An absorbent product or hygiene tissue according to the invention may also further comprise acids, salts, odour inhibitors, substances that affect the adhesion of probiotics and unwanted microorganisms as discussed above. Such an absorbent product may include a permeable outer sheet which is intended to be in close contact with the skin of the wearer, a preferably liquid-impermeable backing sheet which is intended to lie distal from the wearer in use, and an absorbent structure arranged between the outer sheet and the backing sheet. In some cases, an additional sheet in the form of e.g. wadding or like material, may be placed between the outer sheet and the absorbent structure. The backing sheet is preferably breathable. The probiotic bacteria may be arranged in different parts of the absorbent article, for instance in the outer sheet, in the absorbent structure, between two of the layers of the absorbent article, in a loose insert product in the absorbent product, or in some other way. An absorbent product according to the present invention may also preferably comprise a superabsorbent polymer (SAP).

A sanitary article according to the invention may in addition to *Lactobacillus fermentum* Ess-1 cells further comprise an organic acid and/or a salt thereof, such as acetic acid, propionic acid,

23

lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid, valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof, preferably acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid or succinic acid and/or a salt thereof, most preferably ascorbic acid, acetic acid, propionic acid, succinic acid and/or a salt thereof, which acid has a pKa value not exceeding 5.5. A synergistic effect may be obtained by combining the probiotic Ess-1 cells with organic acids and/or salts thereof.

A sanitary article according to the invention preferably comprises  $10^4$  to  $10^{11}$  colony forming units (cfu), more preferably  $10^6$  to  $10^{10}$  cfu, even more preferably  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU, of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 per sanitary article.

The probiotic bacteria of the present invention can be directly applied to a sanitary article according to the invention or provided in a pharmaceutical composition as disclosed herein applied to the product. In one preferred embodiment the bacteria are dried bacteria, as disclosed above, are applied directly to the sanitary article, alone or in a pharmaceutical composition according to the above. In another preferred embodiment the bacteria can be applied to the sanitary article first, e.g. in a suspension comprising the bacteria, whereafter the sanitary product is dried, thereby providing a product with bacteria dried in thereon, optionally in combination with additional pharmaceutical agents as disclosed above. In another preferred embodiment, the dried bacterial powder are provided in a lipid added to the sanitary article. In order to reduce exposure of the bacteria to moisture during manufacture, transport and storage of articles comprising the probiotic Ess-1, in one preferred embodiment the sanitary article is packed in a water impermeable package.

In another aspect the invention relates to the use of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for producing a sanitary article such as a wet wipe, dry wipe, a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, panty liner, sanitary panty and tampon; a feminine insert; a diaper or pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert. The sanitary article is preferably an absorbent article such as a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, a panty liner, a sanitary panty or tampon; a feminine insert; a diaper and pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert. The sanitary article may also preferably be a hygiene tissue such as a washcloth, patch, towelette, napkin, wet wipe or dry wipe.

The invention also relates to the use of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for producing a pharmaceutical composition such as a suspension, spray, cream, powder, suppository, capsule, tablet, oral supplement or a vaginal insert etc., according to the above.

21

Pharmaceutical compositions and products comprising *L. fermentum* strain Ess-1 comprise a therapeutically effective amount of this bacterial strain.

The present invention also relates to a method for treating and/or preventing a candidiasis comprising the administration of a therapeutically effective amount of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to a subject in need thereof. The invention also relates to a method for treating and/or preventing bacterial infections, such as urinary tract infection, comprising the administration of a therapeutically effective amount of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to a subject in need thereof. In such methods, strain Ess-1 is administered to the subject via any of the pharmaceutical compositions or products, which have been disclosed above. For administration via a sanitary article, such as an absorbent product, it is important that the absorbent product is placed in close contact with the skin of said subject.

One important objective of the present invention is the oral administration of Ess-1. One aspect of the invention therefore relates to a pharmaceutical composition for oral administration. This oral administration in a first aspect leads to the suppression of growth of fungi and/or bacteria in the gastrointestinal tract and an improvement of the balance in the microbial flora. However, fungi and bacteria present in the gastrointestinal tract may also be transferred to the urogenital area via the anus. Suppression of fungal and/or bacterial growth in the gastrointestinal tract may therefore have a beneficial effect both on the gastrointestinal tract itself, but also on the urogenital area due to a reduced spreading of pathogenic fungi and/or bacteria to this region. A systemic effect may also be achieved, such as triggering of immune response substances. Oral administration can e.g. be provided via Ess-1 being comprised in capsules, tablets, troches, lozenges, pastilles, liquid suspensions, dry oral suspensions, liquid oral suspensions, chewing gums, mouth washes, pastilles, mouth sprays, vials etc. Oral administration may also be achieved via food products, such as yoghurt, milk, fresh cheese, ice cream, products made of fermented milk, products made of fermented cereals, milk powder etc, and childrens' products, such as gruel.

In another aspect the present invention relates to products for the topical and/or oral administration of strain Ess-1 to an animal for improving animal health, e.g. in a pharmaceutical composition according to the above or in feedstuff or a feed supplement for an animal. Also Ess-1 may be used to improve the quality of the animal feedstuff, such as silage, in itself by inhibiting growth of fungi and bacteria therein.

The present invention also relates to a method of preparing a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of candidiasis comprising adding *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to said pharmaceutical

composition. The present invention also relates to a method of preparing a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of bacterial infections, such as urinary tract infections, comprising adding *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to said pharmaceutical composition.

Also, the present invention relates to a method of preparing a sanitary article, such as an absorbent product or a hygiene tissue, for the treatment and/or prevention of candidiasis comprising adding *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to said sanitary article. Also, the present invention relates to a method of preparing a sanitary article, such as an absorbent product or a hygiene tissue, for the treatment and/or prevention of bacterial infections, such as urinary tract infections, comprising adding *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to said sanitary article.

The invention will now be described in more detail in the following experimental section. The examples are however only illustrative and not intended to limit the scope of the present invention.

## Experimental section

### Example 1: Isolation and typing of Ess-1

#### Aim

The initial purpose of this study is to isolate and type a *Lactobacillus* strain that inhibit the growth of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to a large extent compared to other *Lactobacillus* strains.

#### Method

##### Yeast strains

Clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata* were used as test strains. These were isolated from the vagina of women with vaginal candidiasis and from healthy females.

##### Screening I.

About 140 *Lactobacillus* strains, originating from human skin, throat, teeth, baby faeces, vegetables and seeds were cultured in MRS broth and stamped onto MRS agar plates. The agar plates were incubated under anaerobic conditions at 37°C. Additionally, SAB (Sabouraud) agar (LAB M, Bury, UK) was poured onto the MRS agar and was allowed to congeal. *C. albicans* culture was seeded onto the agar and the plates were incubated aerobically at 37°C. A visual evaluation of the inhibition was done. Strains inhibiting *C. albicans* equally or to a greater extent

than the reference strain *Lactobacillus plantarum* LB931 were selected for further screening (screening II).

### Screening II.

Suspensions of lactobacilli grown in dMRSs broth (MRS broth without addition of sodium acetate) were centrifuged and sterile filtered. The filtrate is henceforth called *Lactobacillus* Cell-free Filtrate, LCF. A specified volume was transferred to wells of a micro titre plate and was let to air dry and thereafter resuspended in sterile distilled water to a concentration three times higher and transferred to 96-wells micro titre plates. *Candida* was added to all vials (three isolates of *C. albicans* and *C. glabrata*, respectively, were used). The inhibition was evaluated by visual observation of turbidity and graduated by two persons using a template on a scale from five to zero. The wells containing strong growth of *Candida* sp. in pure dMRSs-broth were graduated as five, while wells with no visual growth were graduated as zero.

### API typing and genetic typing

Identification to the species level was done using the API 50 CHL system (bioMérieux, France), following the manufacturer's instructions. Data from the fermentation tests were analysed using API Lab Plus software. Genetic typing was done by DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) by partial sequence analysis of the 16S rRNA.

### Results

All strains were evaluated according to the growth inhibition capacity against *C. albicans* in screening I. 23 *Lactobacillus* strains with results comparable or exceeding the one for LB931 were selected for screening II. Out of those 23 *Lactobacillus* strains, three were reference strains and a majority of the strains had been isolated from the oral tract. Figure 1 illustrates the growth inhibition for each *Lactobacillus* strain, where each bar represents the mean growth of three *C. albicans* strains and three *C. glabrata* strains respectively.

"Other 1" proved to have a comprehensive capacity to inhibit growth of *Candida*. No one of the tested *Lactobacillus* strains was similar to the activity of Other 1 regarding the effect on both *C. albicans* and *C. glabrata*. Other 1 was designated Ess-1 and its carbohydrate fermentation pattern and the genetic typing showed that it belongs to the *Lactobacillus fermentum* species.

### Characterization of Ess-1

16S rDNA from strain Ess-1 (DSM 17851) was analysed by DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) by direct sequencing of about 450 nucleotides of PCR-amplified 16S rDNA. Genomic DNA extraction, PCR mediated amplification of the 16S rDNA and purification of the PCR product was carried out as previously described (Rainey, F.A. *et al.* Int. J. Sys. Bacteriol. 1996(46):1088-1092). Purified PCR products were sequenced using the CEQ™DTCS-Quickstart Kit (Beckman Coulter) following the manufacturers instructions.

Sequence reaction products were electrophoresed using the CEQ™8000 Genetic Analysis System.

The resulting sequence data was put into the alignment editor ae2 (Maidak, B.L. *et al.* Nucl. Acids Res. 1999(27):171-173), aligned manually and compared with representative 16S rRNA gene sequences of organism belonging to the *Firmicutes* (Maidak, B.L. *et al.*). For comparison 16S rRNA sequences were obtained from the EMBL data base or RDP (Maidak, B.L. *et al.*).

As a result of this analysis the following table 1 lists those organisms, whose 16S rRNA gene sequences show the highest similarity values compared to the 16S rDNA sequence of Ess-1.

**Table 1**

| Strain                                         | % 16S rRNA gene sequence similarity to Ess-1 |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931      | 99.3                                         |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> KRM             | 99.0                                         |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> DSM 5705   | 85.5                                         |
| <i>Lactobacillus rossiae</i> ATCC BAA-822      | 88.9                                         |
| <i>Lactobacillus suebicus</i> DSM 5007         | 86.9                                         |
| <i>Lactobacillus vaccinnostercus</i> DSM 20634 | 87.2                                         |

The partial 16S rDNA gene sequence of strain Ess-1 shows highest similarity to *Lactobacillus fermentum*. Consequently strain Ess-1 may represent a strain of *Lactobacillus fermentum*, but may as well represent a new species within the genus *Lactobacillus*.

#### **Example 2: Heat treatment**

##### *Aim*

The aim of this experiment is to study the heat resistance for the Candida growth inhibiting substances produced by strain Ess-1.

##### *Method*

LCF was heat treated for 20 minutes at 90°C. *C. albicans* and *C. glabrata* were added to a final concentration of approximately  $5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. The plates were incubated for 20 hours at 37°C and the candida growth in the vials was visually evaluated and graduated from five to zero. Här nämns plates och vials i samma mening.

##### *Results*

The heat treated filtrate of strain Ess-1 was as successful in inhibiting growth of yeast as the non-treated filtrate used as a comparison. Therefore, heat treatment of the filtrate did not destroy the active substance of this bacterium.

**Example 3: Inhibition of *C. albicans* with LCF with addition of salts and acids***Aim*

The purpose of this study is to determine whether salts and acids affects growth of *Candida* and if an improved growth inhibition can be achieved when they are added to the LCF of strain Ess-1.

*Method - salts*

Aliquots of LCF were pH adjusted to the pKa-value for each salt and air dried until they were completely dry and thereafter resuspended in 0.3% sodium acetate and sodium propionate. *C. albicans* was added to a final concentration of approximately  $5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. The fractions were incubated for 20 hours at 37°C. The inhibition was evaluated by visual observation of turbidity and graduated by two persons using a template on a scale from five to zero. The wells containing strong growth of *Candida* sp. in pure dMRSs-broth were graduated as five, while wells with no visual growth were graduated as zero.

*Methods - acids*

Succinic acid, acetic acid, propionic acid and ascorbic acid were added to a final concentration of 50 mM to tubes containing LCF. The filtrate was pH adjusted to the pKa-value for the respective acid. *C. albicans* and *C. glabrata* were added to a final concentration of approximately  $5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. The plates were incubated for 20 hours at 37°C and the candida growth in the wells was visually evaluated and graduated from five to zero.

*Results*

Different acids and acid salts proved to have an effect on the growth of *C. albicans*. Initial results showed that a concentration of 50 mM in the filtrates was the lowest concentration required to see an effect of some acids and 0.1-0.3% to see an effect of salt additives. Sodium propionate and propionic acid had the most extended effect on *C. albicans*. As illustrated in Figure 2a and b, an addition of the growth inhibiting effect was achieved when ascorbic acid (50mM, pKa and pH: 4,2) or propionic acid (50mM, pKa and pH: 4.87) was added to the Ess-1 LCF. This demonstrates that a synergistic effect may be obtained by combining the Ess-1 LCF with organic acids and/or salts thereof. Therefore a combination of Ess-1 cells with organic acids and/or salts thereof is predicted to result in a similar synergistic effect.

**Example 4: Acid analysis***Aim*

The aim of this study is to investigate whether strain Ess-1 produces acids, which are not produced or produced at a lower level, by other *Lactobacillus* strains, and which could explain the strong growth inhibitory capacity of this bacterial strain on yeast.

*Method*

Ess-1 and other *Lactobacillus* strains were cultured in 45 ml dMRSs broth (MRS broth without addition of sodium acetate) for 18 h, centrifuged at 10°C , 3000 rpm for 15 minutes, The

supernatant was sterile filtered (0.22 µm, Millex, Billerica, MA, USA) and frozen at -55°C until sent to Steins Laboratorium A7S (Löddeköping, Sweden) for analysis using liquid chromatography.

*Results*

As can be seen in Figure 3, strain Ess-1 produces more succinic acid and more acetic acid than the other tested bacterial strains, which could be one reason for the excellent inhibitory capacity of this strain on yeast growth.

**Example 5: Survival of Ess-1 through freeze-drying and during storage**

*Aim*

The purpose of this experiment is to determine whether Ess-1 survives freeze-drying and remains viable after storage thereafter.

*Method*

Ess-1 was grown in MRS, concentrated ten times in a 20% trehalose suspension. The suspension was frozen at -55°C in a plastic jar. After 24 h the jar was put into a freeze drying machine (Hetosicc, Heto Birkerød, Denmark) and processed for 48 h. The end product was pulverized and placed in an air-tight container for storage. To increase the stress the container was placed at 37°C. Samples were taken at week 0, 2, 5 and 11. Viable bacteria were counted by suspending the powder in sodium chloride solution and see in onto agar plates.

*Results*

Strain Ess-1 survived freeze-drying well and was stable for 11 weeks with only one log decrease in survival during this time period. After 17 weeks storage the survival was down by 4.5 log. This indicates a very good survival of the bacterium, as normally storage takes place at room temperature or in a fridge, at which temperatures the decrease in survival is even slower.

**Example 6: Survival of strain Ess-1 after administration to the vagina of capsules comprising freeze-dried bacteria**

*Aim:*

To study the survival and colonization of Ess-1 after administration to the vagina.

*Method*

Ess-1 was grown in MRS, concentrated ten times in a 20% trehalose suspension and freeze-dried as described above. After pulverization of the material the powder was filled into gelatine capsules (size 2, Apoteket AB, Gothenburg, Sweden) to a concentration of approximately  $1 \times 10^9$  CFU per capsule. Four voluntary subjects participated in the study by using one capsule per week for one menstrual period, starting the administration the days prior to menses. The subjects took vaginal samples by themselves once a week prior to capsule administration by rotating a sterile cotton pin 5 times 3 cm inside the vagina. The samples were cultured on agar

plates and vancomycin resistant lactobacilli morphologically similar to Ess-1, and therefore considered to be Ess-1, were counted.

Results

No women had strong growth of vancomycin resistant lactobacilli at study start. All women were colonized with Ess-1 at the second sample taken the days following menses. Ess-1 was further found throughout the study in some women and in specific samples in others. Thus, vaginal capsules can be used to colonize the vagina throughout the menstrual cycle. The data are presented in Table 2.

**Table 2.** Amount of Ess-1 found in vaginal samples in women participating in the study. Four women were included in the study and no one was colonized with vancomycin resistant *Lactobacillus* strains at study start (Before). Data is presented as Log<sub>10</sub> CFU ml<sup>-1</sup>. Samples marked "-" are missing.

|         | Before<br>start of<br>study | Sample 2 | Sample 3 | Sample 4 | Sample 5 | Sample 6 |
|---------|-----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Woman 1 | 0                           | 6.22     | 6.52     | 4.95     | 5.43     | 2.00     |
| Woman 2 | 0                           | 4.70     | 0.00     | -        | 4.54     | 4.28     |
| Woman 3 | 0                           | 1.30     | -        | 4.22     | 3.85     | -        |
| Woman 4 | 0                           | 2.41     | 0.00     | -        | -        | -        |

**Example 7: Inhibition of bacteria causing infections such as urinary tract infections**

Aim

The purpose of the study was to explore whether Ess-1 produces substances that inhibit growth of bacteria causing infections, such as urinary tract infections.

Method

A modified agar-overlay method was used. Ess-1 was grown in MRS broth for 20h. 1 ml of bacterial culture was mixed with 2 ml 7.5M sodium acetate solution and 22 ml MRS agar at 50°C and flooded into a petri dish and let to congeal. The plate was anaerobically incubated at 37°C for 20h. An additional layer of 24 ml M17 agar mixed with 0.75 ml 6.5 M potassium dihydrogen phosphate solution was flooded on top of the MRS layer and let to congeal. A Steer's steel pin replicator was dipped into wells of a Bertrani tray containing over night cultures of the pathogens and stamped onto the top agar layer. The plates were left to dry for 30 minutes and incubated at 37°C for 24 h before reading. Sterile MRS broth was used as control. pH was registered on the top agar layer after incubation and the growth was categorized to "growth" or "no growth". The pathogenic strains (a total of 23 strains) were isolated from women with

urinary tract infections; they included *E. coli* (4), *Klebsiella sp.* (4), *E. faecalis* (3), *Enterobacter* (4), Group B *Streptococcus* (3), *S. aureus* (2), *S. saprophyticus* (1) and *P. mirabilis* (2).

#### Results

Ess-1 inhibited growth of all pathogens and all pathogens grew well on the control plate. The pH was 6.0 on the top agar layer and would thus not impact growth in any way.

**Claims**

1. *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851.
2. *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for medical use.
3. Use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of candidiasis.
4. Use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of vaginal candidiasis.
5. Use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of thrush.
6. Use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of esophagitis.
7. Use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of bacterial infection, such as urinary tract infection.
8. Use of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for oral administration.
9. A pharmaceutical composition comprising *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier, excipient and/or diluent.
10. A pharmaceutical composition according to claim 9, wherein said pharmaceutically acceptable carrier is trehalose or a lactobacillus growth factor in powder or other form.
11. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-10, wherein the *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 cells are dried, such as freeze dried, spray dried or air dried.

12. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-11 comprising  $10^4$  to  $10^{11}$  colony forming units (cfu), more preferably  $10^6$  to  $10^{10}$  cfu, even more preferably  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU, of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 per dose.
13. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-12, further comprising other probiotic bacteria.
14. A pharmaceutical composition according to claim 13, wherein the other probiotic bacteria are lactic acid producing bacteria, such as *Lactobacillus plantarum* LB931.
15. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-14, which is a suspension, spray, cream, powder, suppository, capsule, oral supplement or a vaginal insert.
16. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-15 for oral administration.
17. A sanitary article comprising *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851.
18. A sanitary article according to claim 17, further comprising an organic acid and/or a salt thereof, such as acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid, valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof.
19. A sanitary article according to any of claims 17-20, further comprising other lactic acid producing bacteria, such as *Lactobacillus plantarum* LB931.
20. A sanitary article according to claim 17-19, comprising  $10^4$  to  $10^{11}$  colony forming units (cfu), more preferably  $10^6$  to  $10^{10}$  cfu, even more preferably  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU, of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 per product.
21. A sanitary article according to any of claims 17-20, which sanitary article is an absorbent article such as a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, a panty liner, a sanitary panty or tampon; a feminine inserts; a diaper and pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert.
22. A sanitary article according to any of claims 17-20, which sanitary article is a hygiene tissue such as a washcloth, patch, towelette, napkin, wet wipe or dry wipe.
23. Use of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for producing a sanitary article such as a wet wipe, dry wipe, a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, panty liner, sanitary panty and tampon; a feminine inserts; a diaper or pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert.
24. Use according to claim 23, which sanitary article is an absorbent article such as a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, a panty liner, a sanitary panty or tampon; a feminine insert; a diaper and pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert.
25. Use according to claim 23, which sanitary article is a hygiene tissue such as a washcloth, patch, towelette, napkin, wet wipe, or dry wipe.
26. Use of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for producing a pharmaceutical composition such as a

suspension, spray, cream, powder, suppository, capsule, tablet, oral supplement or a vaginal insert.

27. A method for treating and/or preventing candidiasis comprising the administration of a therapeutically effective amount of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to a subject in need thereof.
28. A method for treating and/or preventing a bacterial infection, such as urinary tract infection, comprising the administration of a therapeutically effective amount of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to a subject in need thereof.
29. The method according to any of claims 27-28, wherein said *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 is administered to said subject via a pharmaceutical composition according to any of claims 9-16.
30. The method according to any of claims 27-29, wherein said *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 is administered to said subject by placing a sanitary article according to any of claims 17-22 in close contact with the skin of said subject.
31. A method of preparing a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of candidiasis and/or bacterial infections comprising adding *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to said pharmaceutical composition.
32. A method of preparing a sanitary article for the treatment and/or prevention of candidiasis and/or bacterial infections comprising adding *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to said sanitary article.

35

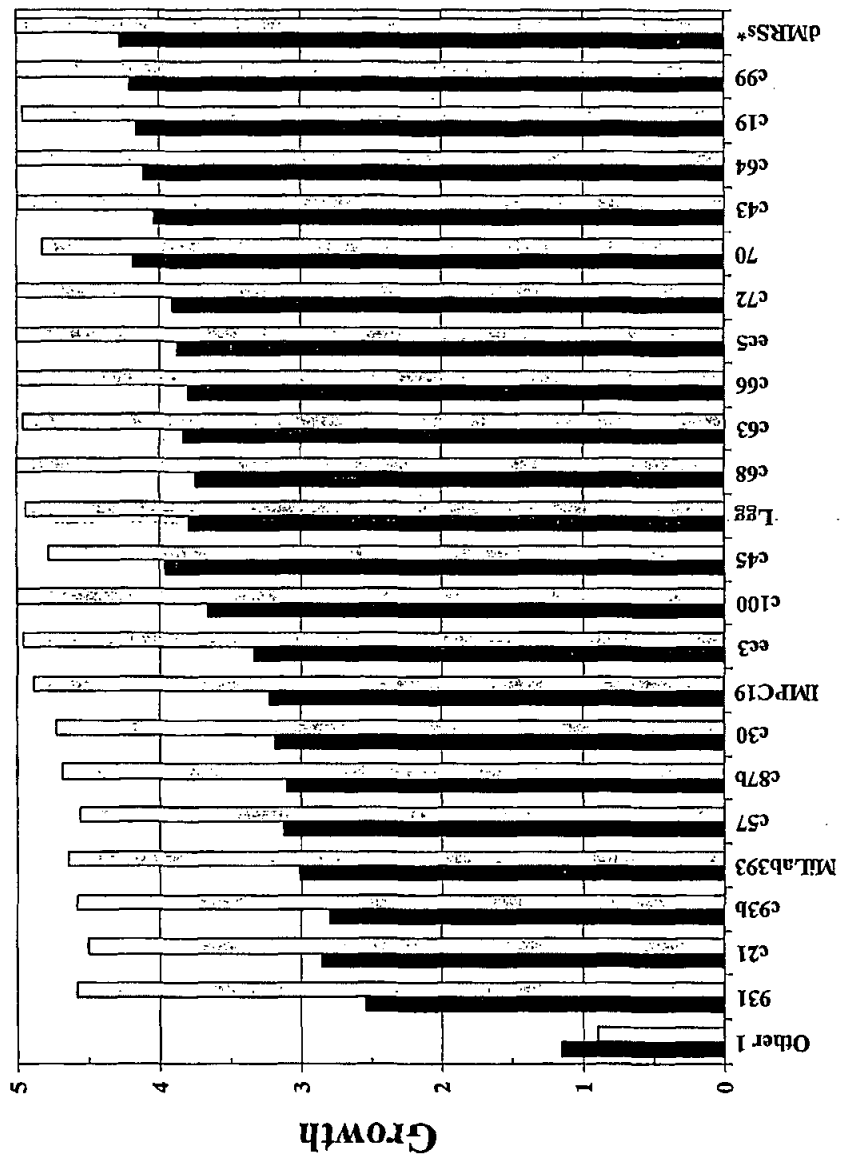


Fig. 1

36

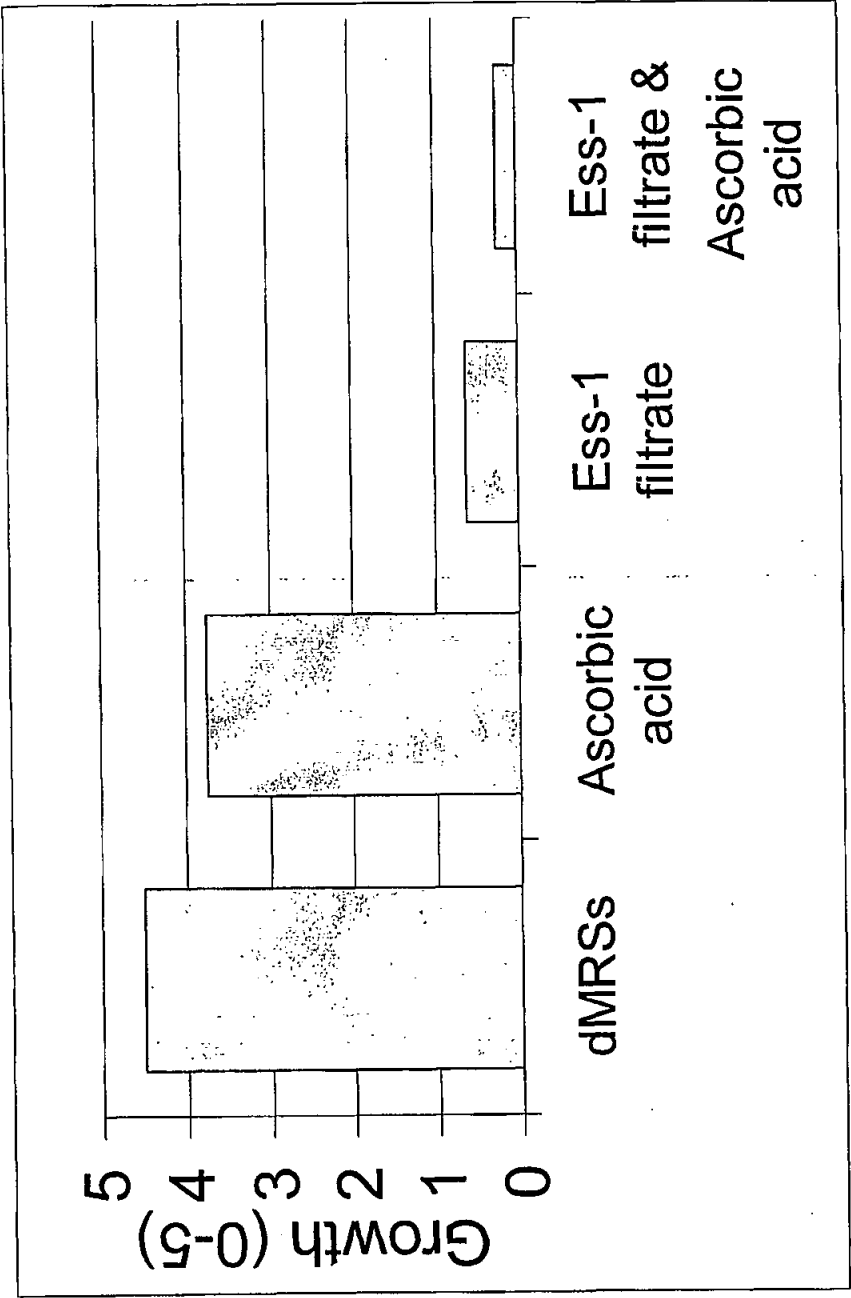


Fig. 2A

37

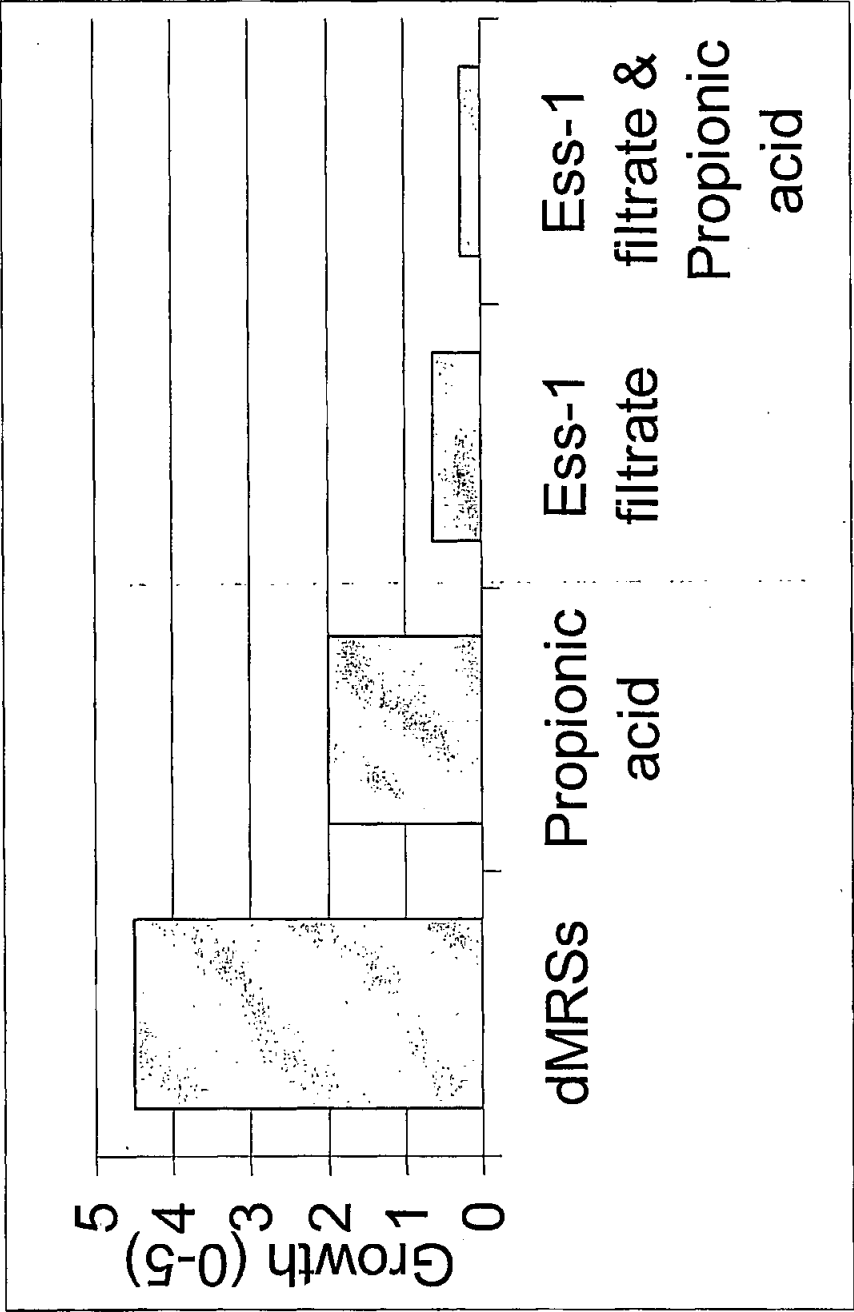


Fig. 2B

38

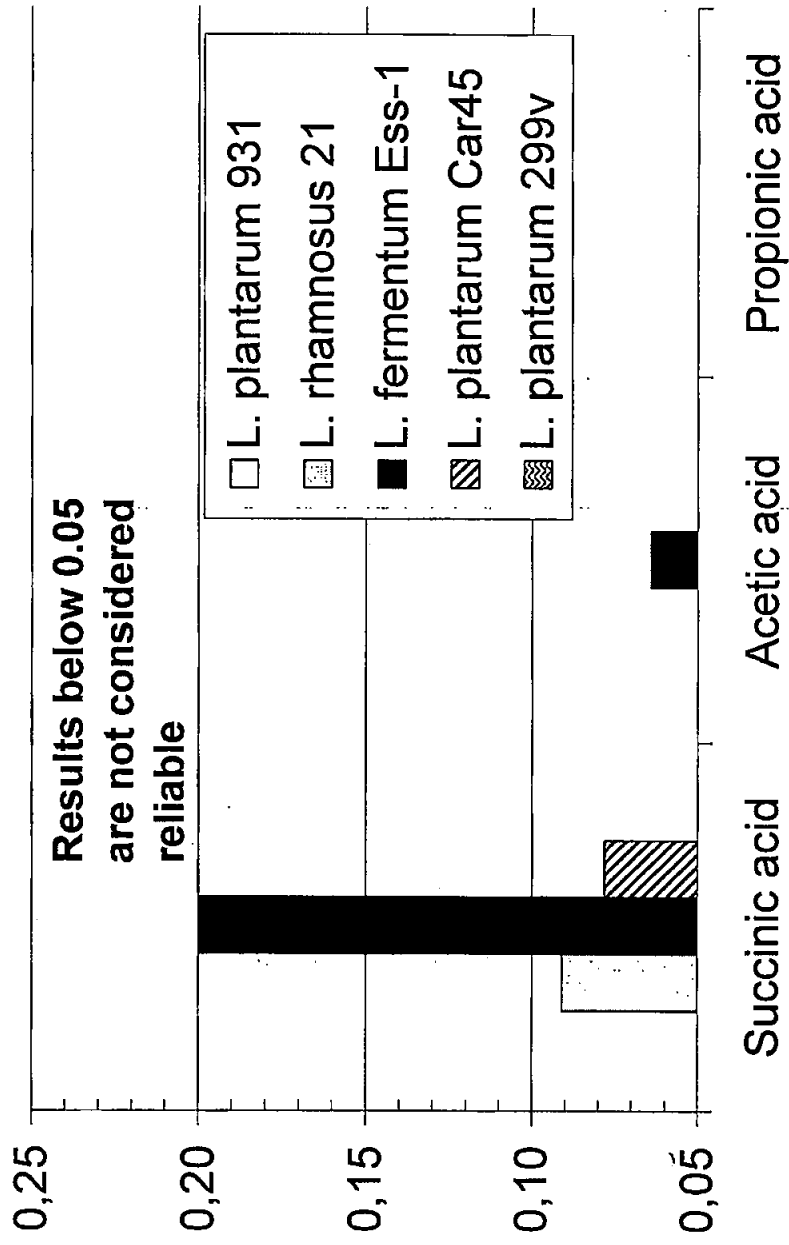


Fig. 3

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM  
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 6 , line 18-28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                               |
| B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT <span style="float: right;">Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                               |
| Name of depositary institution<br>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                               |
| Address of depositary institution (including postal code and country)<br>Mascheroder Weg 1b<br>D-38124 Braunschweig<br>Germany                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                               |
| Date of deposit<br>2006-01-06                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Accession Number<br>DSM 17851 |
| C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) <span style="float: right;">This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/></span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                               |
| Receipt in the case of an original deposit (copy enclosed with Request form)<br><br>Viability statement (copy enclosed with Request form)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                               |
| D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                               |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                               |
| E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                               |
| The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")<br><br>Statement that the depositor has authorized the Applicant to refer to the deposited biological material in the application and has given his unreserved and irrevocable consent to the deposited material being made available to the public in accordance with Rule 28(1)(d) of the European Patent Convention (EPC). |                               |

|                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div>For receiving Office use only</div> <div><input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application</div> <div>Authorized officer</div> | <div>For International Bureau use only</div> <div><input type="checkbox"/> This sheet was received by the International Bureau on:</div> <div>Authorized officer</div> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 Y SU USO PARA EL**  
**TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE CANDIDIASIS E INFECCIONES DEL**  
**TRACTO URINARIO**

**5    Campo Técnico**

La presente invención se relaciona con el campo de bacterias probióticas que tienen un efecto benéfico sobre infecciones de la *levadura Candida*, es decir, candidiasis, e infecciones bacterianas. La invención también se relaciona con  
10 composiciones farmacéuticas y productos para el cuidado personal que comprenden tales bacterias, y el uso médico de tales bacterias.

**Técnica anterior**

15 La flora usual en la región urogenital está constituida por un ecosistema complejo que comprende más de 50 diferentes especies de bacterias (Hill *et al.*, Scand. J. Urol. Nephrol. 1984(86 (suppl.)):23-29). La flora normal está dominada por bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* (LB) que son barras gram  
20 bacterias también contribuyen al mantenimiento del medio específico y el balance ecológico de la vagina. El pH circundante en la vagina es inferior de 4.5. La levadura y las enterobacterias son escasas o ausentes (Redondo-Lopez *et al*, Rev. Inf. Dis. 1987(12):856-872).

25 Algunas cepas LB inhiben el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas mediante varios mecanismos. El metabolismo del LB resulta en la formación de ácidos orgánicos, en particular ácido láctico y ácido acético, que contribuye al pH

41

bajo del fluido vaginal, que es desfavorable para muchas otras especies microbianas. El LB también puede producir sustancias solubles que inhiben directamente el crecimiento de las bacterias y levaduras potencialmente patógenas. Ellas también pueden producir peróxidos de hidrógeno, que es tóxico a las bacterias y los hongos. Estas características inhibitorias pueden variar considerablemente entre diferentes cepas LB (Hooton et al., JAMA 1990(265):64-69).

De manera similar al área urogenital, la piel está colonizada por una disposición de organismos, que forman su flora normal. Los números e identidad de los organismos varía entre diferentes sitios de la piel, con áreas de piel húmedas y grasas habitan más microorganismos por área de piel. Esto, junto con la barrera estructural de la piel, suministra al huésped una defensa excelente contra los microbios invasores. El número de bacterias sobre la piel varía desde pocos cientos por  $\text{cm}^2$  en las superficies áridas del brazo anterior y posterior, a decenas de miles por  $\text{cm}^2$  en las áreas húmedas tales como la axila y la pelvis. Esta flora normal juega un papel importante en evitar que organismos "extraños" colonicen la piel, pero necesita mantenerse en revisión, con el fin de evitar infecciones de la piel.

20

El tracto gastrointestinal (GI), desde la boca hasta el ano, es habitado por una flora rica de más de 500 diferentes especies de bacterias, algunas de las cuales tienen importantes funciones para la salud. La flora GI consiste de aproximadamente  $10^{14}$  bacterias y un número inferior de levaduras comensales. Debido a un estado de salud general cambiante, las especies de *Candida* pueden sobrecrecer y originar infecciones superficiales. Adicionalmente, el sobre crecimiento de las especies de

25

*Candida* entre los pacientes inmunocomprometidos puede conducir a infecciones sistémicas que es una condición muy seria.

La debilidad o el desbalance del sistema de defensa natural puede permitir que  
5 microorganismos potencialmente patógenos originen infecciones clínicas, por ejemplo en relación con medicamentos, cuidado personal inferior, o cambios en la microflora o las membranas de la mucosa. Los cambios en la microflora también se pueden encontrar en relación con diferentes condiciones patógenas.

10 Los organismos levaduras siempre están presentes en los humanos, pero usualmente se evita el sobrecrecimiento por la flora microbiana endógena. La candidiasis es una infección causada por organismos de levadura de *Candida* que afecta una amplia variedad de sistemas orgánicos. Más comúnmente, la infección se origina por *Candida albicans*, y *C. glabrata*. Menos comúnmente, *C. tropicalis*,  
15 *C. parapsilosis*, y *C. krusei* originan la infección y raramente, otras especies de *Candida* son el agente causante. La candidiasis es a menudo disparada por cambios hormonales, tales como durante el embarazo, la menstruación y el uso de píldoras para el control de la natalidad. Otras causas comunes son los desbalances en el pH de la vagina, diabetes mellitus, y curas antibióticas,  
20 afectaciones del balance microbiano delicado del cuerpo. La defensa general del huésped contra las infecciones de *Candida* incluye barreras mecánicas, sustancias antimicrobianas no específicas (polipéptidos, proteasas básicas); fagocitosis, y la respuesta inmune específica (linfocitos B y T, hipersensibilidad del tipo retrasado.

25

En personas inmunocompetentes, cualquier parte del cuerpo húmeda o con calor expuesta al ambiente es susceptible de infección originando vaginitis; sarpullido

vulvar; estomatitis oral; conjuntivitis; endoftalmitis; sarpullido por pañal; e infecciones de la uña, recto, y otros pliegues del cuerpo. En pacientes inmunocomprometidos, pueden ocurrir enfermedades sistémicas tales como la miocarditis, los abscesos hepatoesplénicos, la infección pulmonar, la infección del SNC, y enfermedad crónica. La candidiasis puede esparcirse desde una infección local para originar una infección sistémica con serias complicaciones, tales como la miocarditis, la endoftalmitis, y los abscesos hepatoesplénicos. Por lo tanto es de gran importancia encontrar curas efectivas y evitar tratamientos para candidiasis, para evitar esta condición seria en sujetos.

10

La estomatitis es el nombre común de una infección de la boca originada por el hongo *Candida albicans* que afecta las superficies húmedas alrededor de los labios, dentro de las mejillas, y la lengua y el paladar. La estomatitis es común en personas con diabetes o irritación de la dentadura. También las personas con enfermedades tales como el cáncer y el SIDA, ambas con supresión del sistema inmune, están a menudo afectadas por candidiasis.

15

Una infección por *Candida* de la boca se puede regar al esófago, originando esofagitis. Esta infección es más común en personas con SIDA y personas que reciben quimioterapia para cáncer.

20

La infección por *Candida* también es común en las partes húmedas de la piel tales como las áreas de la piel cubiertas por pañales, las manos de las personas que rutinariamente portan guantes de caucho, el reborde de la piel en la base de la uña de los dedos, especialmente para las manos que están expuestas a la humedad, las áreas alrededor de la pelvis y el pliegue de las nalgas, y los dobleces de la piel bajo senos grandes.

25

La vaginitis es una inflamación de la mucosa vaginal originada por bacterias u hongos. La vaginitis es en si misma inicialmente dañina pero puede conducir a nacimientos prematuros en mujeres embarazadas o infertilidad.

5

La candidiasis vaginal origina una vagina con picazón e irritada con descarga blancuzca, blanda y puede semejar requesón. Es a menudo muy incómodo para las mujeres experimentar los síntomas y además tener restricciones en actividades normales, tales como ejercicios deportivos y actividad sexual.

10

La candidiasis vaginal se trata normalmente localmente mediante cremas, supositorios, cápsulas de gelatina, comprimidos vaginales y ungüentos que comprenden agentes antifúngicos. Las curas administradas oralmente también están disponibles. Un problema con los agentes antifúngicos es una resistencia creciente del hongo al agente si se usa repetidamente. Además, tales curas a menudo son ineficientes y requieren la prescripción del doctor.

15

Remedios caseros, tales como la aplicación de yogurt, comprimidos de acidophilus o lavados vaginales con vinagre también se utilizan para tratar la candidiasis. Sin embargo, la eficiencia de estos tratamientos ha sido baja. Aunque el yogurt comprende lactobacillus, estos no están especialmente adaptados para matar o reducir el crecimiento de los hongos. Como se entiende por la persona experta en la técnica, tal tratamiento solo puede ser efectivo para mitigar los síntomas de infecciones menores. También se ha sugerido que las bacterias que producen ácido láctico se puedan suministrar por vía de artículos absorbentes, tales como pañales, toallas sanitarias, recubrimientos de pantaloncito y tampones, como se

20

25

45

describe en por ejemplo, la WO97/02846, WO99117813, WO99/45099 y WO00/35502.

Existe un interés creciente en hallar microorganismos prebióticos que sean capaces de reestablecer una flora microbiana saludable y/o evitar un crecimiento descontrolado de microorganismos no deseados. La administración de tales bacterias probióticas no tiene efectos colaterales negativos de los agentes antifúngicos y preferiblemente son más eficientes en el tratamiento y/o prevención de infecciones fungosas. Previos intentos para encontrar tales microorganismos han tenido varios éxitos aunque, debido a problemas tales como la baja adhesión y supervivencia de los probióticos en la vagina, la eficiencia limitada en la prevención del crecimiento de los hongos, la baja supervivencia durante el almacenamiento de las preparaciones, etc. Otras características importantes de un probiótico seleccionado es la capacidad de crecer en presencia de oxígeno y sobrevivir el secado por congelamiento. Aunque mucho más importante, las bacterias probióticas seleccionadas deben ser eficientes para matar y/o prevenir el crecimiento de hongos no deseados y/o bacterias. Los lactobacillus probióticos han probado previamente ser eficientes en el tratamiento y prevención de la vaginitis bacteriana. Sin embargo, el éxito en la prevención y/o tratamiento de la candidiasis vaginal ha sido muy limitado. Por lo tanto, subsiste aún la necesidad del desarrollo de probióticos eficientes para el tratamiento de candidiasis, incluyendo la candidiasis vaginal, que también puede ser efectiva contra las infecciones bacterianas, tales como las infecciones del tracto urinario.

## Resumen de la invención

El objeto de la invención es suministrar una bacteria probiótica para el tratamiento y/o la prevención de candidiasis y/o infecciones bacterianas, tales como  
5 infecciones del tracto urinario.

El objeto definido anteriormente es un primer aspecto de la invención logrado al suministrar una cepa de *Lactobacillus fermentum* novedosa, denominada como Ess-1, que se ha depositado como el Sammlung von Mikroorganismen und  
10 Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851.

En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, para el uso como un medicamento.

15 En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis.

En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de *Lactobacillus fermentum*,  
20 cepa Ess-1, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas, tales como infección del tracto urinario.

En aún otros aspectos la invención se relaciona con una composición  
25 farmacéutica que comprende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o diluyente.

En aún otro aspecto adicional, la invención se relaciona con un artículo sanitario que comprende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1.

La invención también se relaciona con un método para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de candidiasis que comprende  
5    agregar la cepa de *Lactobacillus fermentum* Ess-1, a dicha composición farmacéutica.

Además, la invención se relaciona con un método para preparar un artículo  
10    sanitario para el tratamiento y/o la prevención de candidiasis que comprende agregar *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, a un artículo sanitario.

En razón a que la cepa novedosa de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, ha demostrado suministrar excelente inhibición de crecimiento del hongo *Candida*,  
15    esta cepa de bacteria novedosa ha mostrado propiedades valiosas para uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de candidiasis. Además la invención resuelve el problema de suministrar productos y artículos para el suministro de esta cepa bacteriana a áreas del cuerpo de interés para tal tratamiento y/o prevención.

20

### Definiciones

En el presente contexto un agente antifúngico es un fármaco utilizado para tratar infecciones fungosas, cuyo fármaco no es un probiótico como se define adelante.

25

Probioticum/probióticos en el presente contexto se relaciona con microorganismos vivos que confieren un beneficio saludable cuando se administran en cantidades adecuadas a un huésped.

- 5 La candidiasis en el presente contexto se relaciona con una infección originada por el hongo *Candida* presente en o sobre cualquier parte del cuerpo, tal como la piel, la región urogenital, la boca, el esófago o los intestinos.

- 10 El suplemento oral en el presente contexto se relaciona con una composición que se administra oralmente, tal como un pulverizado, una tableta, una goma de mascar, etc.

Biológicamente puro en el presente contexto se relaciona con un cultivo de una bacteria que solo contiene una cepa bacteriana específica.

15

- El término "artículo sanitario" se refiere a productos que se colocan contra la piel del portador para absorber y contener exudados del cuerpo, como la orina, heces y fluido menstrual, y también con productos que se utilizan para limpiar la piel y el área urogenital y que también se pueden utilizar para suministrar bacterias
- 20 probióticas a estas áreas. La invención se refiere principalmente a artículos sanitarios desechables, que significan artículos que no están destinados a ser lavados o restaurados de otra manera o reutilizados como un artículo sanitario después de uso. Ejemplos de artículos sanitarios desechables incluyen limpiones húmedos, limpiones secos, productos para la higiene femenina tales como toallas
- 25 sanitarias, recubrimientos interiores de pantaloncito, pantaloncitos sanitarios y tampones; insertos femeninos; pañales y pañales pantalón para niños y adultos incontinentes; almohadillas de incontinencia; insertos de pañal y similares.

JP

El término "artículo absorbente" se refiere a productos que se colocan contra la piel del portador para absorber y contener los exudados del cuerpo, como la orina, heces y fluido menstrual. Ejemplos de artículos sanitarios desechables incluyen  
5 productos para la higiene femenina tal como toallas sanitarias, recubrimientos interiores de pantaloncito, pantaloncitos sanitarios y tampones; insertos femeninos; pañales y pañales pantalón para infantes y adultos incontinentes; almohadillas de incontinencia; insertos de pañales; y similares.

- 10 Por "tisú de higiene" se significa cualquier dispositivo para limpieza de la piel, por ejemplo un paño de limpieza, parche, toallitas, toallas, secadores en húmedo, y secadores en seco y similares.

Por "lípidos" en el presente contexto significa sustancias que son insolubles en  
15 agua pero solubles en disolventes orgánicos.

### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1** muestra la inhibición media del crecimiento de tres cepas cada una de *C. albicans* y *C. glabrata*. ■ = *C. albicans*, □ = *C. glabrata*. \*El pH del dMRS ajustado  
20 al pH registrado más bajo de todos los filtrados (pH 3.7). 0 indica sin crecimiento visual, 5 indica muy buen crecimiento.

**Figura 2** muestra la inhibición del crecimiento sobre *C. albicans* en 50 mM de  
25 ácido ascórbico (Fig. 2a) y 50 mM de ácido propiónico (Fig. 2b), en el filtrado Ess-1 y en el filtrado Ess-1 con adición de 50 mM de ácido ascórbico (Fig. 2a) y 50 mM

50

de ácido propiónico (Fig. 2b). 0 indica sin crecimiento visual, 5 indica muy buen crecimiento.

**Figura 3** muestra la producción de ácido succínico, ácido acético y ácido propiónico en cinco diferentes cepas de *Lactobacillus*, incluyendo Ess-1. Las cepas crecieron en un caldo MRS y la producción de ácido se registró en el caldo después de que el sobrenadante se había filtrado estéril.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se relaciona con una cepa novedosa de *Lactobacillus fermentum*, en lo sucesivo denominada Ess-1, depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) y designado con el número de acceso DSM17851 (depositor Essum AB, Box 3160, SE 90304 Umeå, Suecia, depositado en enero 6, 2006). La cepa ha mostrado propiedades únicas en el tratamiento y/o prevención de las infecciones de *Candida*, es decir, candidiasis, debido a sus propiedades inhibitorias sobre el crecimiento de la levadura de *Candida*. También la cepa Ess-1 ha mostrado propiedades valiosas en el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas, tales como infecciones del tracto urinario. Además, el Ess-1 sobrevive largos períodos de almacenamiento que es importante por conveniencia cuando se manejan productos que comprenden la bacteria. También, el Ess-1 no es estrictamente anaeróbico sino que puede crecer en presencia de oxígeno y sobrevive bien al secado por congelamiento. La cepa Ess-1 de *Lactobacillus fermentum* de la invención es biológicamente pura.

51

Como se demostró en el Ejemplo 1, el Ess-1 exhibe una inhibición única del crecimiento de diferentes cepas de levadura de *Candida*. En este experimento un gran número de cepas de *Lactobacillus* se probaron por sus propiedades inhibitorias del crecimiento de *Candida*. Las 23 mejores cepas se seleccionaron para estudios adicionales. La inhibición del crecimiento de Ess-1 es más de dos veces la que se puede demostrar para la mejor de estas 23 diferentes cepas de *Lactobacillus* utilizadas por comparación. También, la Ess-1 demostró inhibir el crecimiento de un número de diferentes cepas bacterianas conocidas por originar infección en el tracto urinario. Además, la Ess-1 demostró ser capaz de colonizar y sobrevivir en la vagina cuando se administró a la vagina. De manera importante, la Ess-1 sobrevive en la vagina también durante la menstruación. La colonización y supervivencia *in vivo* después de la administración a un sujeto es un factor importante para el éxito de un probiótico para ejecutar sus tareas pretendidas. Sin embargo, la falta de, o limitada, colonización y supervivencia *in vivo* a menudo limita la utilidad práctica de las bacterias que producen ácido láctico probiótico. Además, la supervivencia limitada durante el almacenamiento y el manejo de productos que comprenden bacterias que producen ácido láctico a menudo resultan en el uso de productos no efectivos.

En un primer aspecto la presente invención se relaciona con una cepa novedosa de *Lactobacillus fermentum*, denotada como cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851.

Debido a las propiedades inhibitorias de la cepa Ess-1 sobre el crecimiento de *Candida* y bacterias que originan infecciones en el tracto urinario, la presente invención también se relaciona con el uso médico de esta cepa. En particular la

invención se relaciona con el uso de la cepa Ess-1 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis preferiblemente en un sujeto mamífero, más preferiblemente un sujeto humano. La invención en otra modalidad preferida se relaciona con el uso de la cepa Ess-1 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de candidiasis en la región urogenital, tal como la candidiasis vaginal. En otra modalidad preferida, la presente invención se relaciona con el uso de la cepa Ess-1 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o el tratamiento de esofagitis. Otra modalidad preferida de la presente invención se relaciona con el uso de la cepa Ess-1 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de estomatitis.

Como la cepa Ess-1 novedosa de la presente invención mostró experimentalmente (ver "Sección Experimental") que inhibía el crecimiento de numerosas diferentes bacterias que originan infección, tal como la infección del tracto urinario, otro aspecto de la invención se relaciona con el uso de la cepa Ess-1 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas, tal como infección del tracto urinario.

En un aspecto la presente invención se relaciona con el uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la administración oral.

En una modalidad preferida la composición farmacéutica que comprende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, también comprende uno o más portadores

farmacéuticamente aceptables, excipientes y/o diluyentes. En general tales agentes no deben ser tóxicos a los receptores a las concentraciones y dosis utilizadas. Ejemplos de tales agentes son amortiguadores, agentes espesantes de agentes formadores de gel tal como glicerina, polietilenglicol, antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico), polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa y dextrinas. Ejemplos de portadores incluyen azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetatos de celulosa; trehalosa; tragacanto en polvo, malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato de calcio; polioles tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; agar; ácidos algínicos; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica; y solución amortiguadora de fosfato. En una modalidad preferida de la invención, un portador que suministra un ambiente anhidro se utiliza como portador para las bacterias probióticas. Tal ambiente anhidro prolonga la supervivencia de las bacterias durante la elaboración, transporte y almacenamiento. Un ejemplo de tales portadores son portadores lípidos que incluyen lípidos derivados de petróleo, tales como líquido de parafina (aceites minerales, aceites de parafina, y otros aceites), petrolato (Vaselina y gelatina de petróleo), cera microcristalina, ozoquerita, ceresina y parafinas. Alternativamente, se pueden utilizar lípidos sintéticos, tales como dimeticona, ciclometicona y ésteres de silicona, tales como ceterail meticona. Una tercera alternativa es utilizar lípidos derivados de animal o planta, que son usualmente triglicéridos. Los lípidos derivados de animal o planta son a menudo mezclas de mono, di, y triglicéridos y de ácidos grasos libres. Los lípidos se pueden purificar, hidrogenar, refinar, modificar y utilizar solos o en diferentes mezclas. Ejemplos de lípidos derivados de animales adecuados originales

54

incluyen cera de abejas, aceite de emu, lápida láctica, lanolina, aceite de hígado de tiburón y cebo. Ejemplos adecuados de lípidos originales derivados de plantas incluyen aceite kernel de albaricoque, aceite de araquis, aceite/cera de aguacate, cera de arrayán, aceite de semilla de grosella negra, aceite de semilla de borraja, aceite de nuez del Brasil, aceite de camelia sinensis, cera de candelilla, aceite de canola, cera carnauba, aceite de ricino, manteca de cacao, aceite de nuez de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de rosa de perro, aceite de semilla de pringamosa nocturna, aceite de semilla de uva, mantequilla de illipe, cera de jasmín, cera de jojoba, cera de lavanda, aceite de linaza, aceite de semilla de mango, aceite de oliva, cera de naranja, aceite de palma, aceite kernel de palma, aceite de maní, cera de arroz, aceite de cártamo, aceite de semilla de sésamo, mantequilla de shea, aceite de soya, cera de semilla de gira sol, aceite de almendra dulce, aceite de teobroma y aceite de germen de trigo. El uso de portadores de lípido tiene la ventaja adicional de incrementar la transferencia de bacterias al usuario, por ejemplo cuando la composición farmacéutica se administra por vía de un producto sanitario, tal como un producto absorbente o un tisú de higiene (ver, por ejemplo, WO 04/060416). Ejemplos de lípidos preferidos incluyen cera de petrolato y silicio. También pueden estar presentes agentes humectantes y lubricantes tales como laurilsulfato de sodio, y agentes colorantes, lubricantes, agentes para formación de tableta, estabilizadores y preservantes. Los portadores farmacéuticamente aceptables preferidos son la trehalosa o un factor de crecimiento de *Lactobacillus*, por ejemplo, la inulina y/o oligofructosa, polidextrosa, lactitol o almidón resistente, en polvo o en otra forma. Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede en una modalidad preferida también comprender, además de las células Ess-1 de *Lactobacillus fermentum*, un ácido orgánico y/o una sal de éstas, tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico,

CS

ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de éstos, preferiblemente ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico y/o una sal de éstos, más preferiblemente ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de éstos. Se puede obtener un efecto sinérgico al combinar el Ess-1 probiótico con ácidos orgánicos y/o sales de éstos, cuyo ácido orgánico tiene un valor pKa que no excede 5.5. Los ácidos orgánicos o las sales correspondientes deben ser de tal naturaleza que cuando se aplican sobre un artículo sanitario ellos no deben originar ninguna irritación de la piel al portador del artículo sanitario, por lo tanto el pKa del ácido orgánico, cuando la medición se desarrolla en agua a 25°C, no debe ser preferiblemente inferior de 2. Si los valores pKa por el contrario son demasiado altos, los ácidos orgánicos o las sales de éstos estarán principalmente en sus formas ácidas. Esto significa que el aditivo no estará suficientemente dissociado en un ión hidrógeno y su forma aniónica desprotonada, que se cree que es un prerrequisito para dicho efecto con las bacterias prebióticas o el producto extracelular de éstas. Por lo tanto por lo menos uno de los valores pKa para el ácido orgánico adecuado para la presente invención debe ser inferior a 5.5, preferiblemente inferior de 5. Además, los nutrientes para la propagación bacteriana, tales como los amino ácidos, los péptidos, los derivados de ácido nucleico, las vitaminas, las sales, los ácidos grasos, la glucosa, fructosa, ribosa, maltosa y lactosa se pueden agregar a la composición farmacéutica, solos o en diferentes combinaciones.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administra preferiblemente en la forma de un rociado, crema, polvo, supositorio, líquido para la administración oral, cápsula, tableta, inserto vaginal o suplemento oral. Las

composiciones para el tratamiento dermatológico pueden ser preparadas por ejemplo de acuerdo con la US 2006/0171936.

Otros ejemplos de productos que comprenden la cepa Ess-1 son un polvo en un  
5 guante, pastilla, goma de mascar, lavado bucal o pulverizado para la boca.

Además, una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención también puede comprender una sustancia que reduce olores, tales como zeolita, sílica, ciclodextrina y carbón activado. También, las sustancias que tienen la  
10 capacidad de incrementar la adhesión de lactobacilli y/o sustancias que disminuyen la adhesión de microorganismos patógenos pueden estar comprendidas en una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se puede  
15 administrar como una dosis única, pero se administra preferiblemente en dosis múltiples. La composición farmacéutica también se puede administrar preferiblemente en relación con la administración de él o los agentes antifúngicos.

En una modalidad preferida la composición farmacéutica de acuerdo con la  
20 invención comprende células bacterianas secas, tales como células secadas por congelamiento, células secadas por rociado o células secadas al aire. Tales células tienen buenas capacidades de supervivencia durante el almacenamiento (ver la sección experimental de un estudio de supervivencia de células secadas por congelamiento).

25

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende preferiblemente  $10^4$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia (cfu), más

ST

preferiblemente  $10^6$  a  $10^{10}$  cfu, aún más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  CFU, de la cepa de *Lactobacillus fermentum* Ess-1 por dosis.

La composición o producto farmacéutico de acuerdo con la invención puede, además del Ess-1, comprender otras bacterias con propiedades probióticas con el fin de obtener un efecto clínico más amplio. Tales bacterias preferidas para el objeto de la presente invención incluyen bacterias que producen ácido láctico, por ejemplo, del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, miembros no patógenos del género *Bacillus*, todos los miembros del género *Bifidobacterium*, y *Pseudomonas limbergii*. Los miembros preferidos del género *Lactobacillus* incluyen *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cereale*, *Lactobacillus delbrukeii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gaserii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus thermophilus*, *Lactobacillus papacasai* sp. *paracasai*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis* y similares. Más preferiblemente la bacteria seleccionada utilizada es de las especies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus curvatus* o *Lactobacillus plantarum*. Otros ejemplos preferidos incluyen especies no patógenas de especies de *Coccus*, tal como *S. naltivarius*, *S. oralis* y *S. mitis*. Uno ejemplo aún más preferido de tal bacteria que produce ácido láctico incluye, pero no se limita a, *Lactobacillus plantarum*, cepa LB931 (EP 1060240, número de acceso DSM 11918 con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen).

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención se puede incorporar en una variedad de productos diferentes. Por ejemplo, un polvo que comprende Ess-1 se puede suministrar en diferentes tipos de guantes de protección. Tales guantes

SA

a menudo suministran un ambiente húmedo para las manos que puede facilitar el crecimiento de hongos que resultan en infecciones fungosas de la piel y las uñas de las manos.

- 5 La presente invención en otro aspecto se relaciona con un artículo sanitario que comprende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851. Tal artículo sanitario puede ser un artículo absorbente tal como un producto de higiene femenina tal como una toalla
- 10 sanitaria, un recubrimiento interior de pantaloncito, una toalla sanitario o tampón; un inserto femenino; un pañal o pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal. También, un artículo sanitario puede ser un tisú de higiene tal como un paño de lavado, parche, toallita, toalla, limpiador en húmedo o limpiador en seco. El tisú de higiene adecuado para
- 15 la presente invención se ha descrito previamente en la WO 04/060416. Las bacterias que producen ácido láctico se “encapsularon” allí en un lípido en un ambiente anhidro con el fin de proteger las bacterias de la humedad durante el almacenamiento y facilitar la transferencia al usuario del tisú de higiene. Tal tisú de
- 20 higiene también puede opcionalmente comprender uno o más aditivos de limpieza tales como emolientes, emulsificadores, humectantes, agentes reguladores del pH, agentes quelantes, modificadores de la viscosidad, agentes antimicrobianos, preservantes y fragancias, como se describe en la WO 04/060416. Detalles adicionales en agentes adecuados comúnmente agregados a productos de
- 25 limpieza de la piel se dan en Woodruff's Ingredients and Formulary Handbook, Jhon Woodruff, First ed., 1997, Miller Freeman fJK Ltd. Un producto absorbente o tisú de higiene de acuerdo con la invención también puede comprender además ácidos, sales, inhibidores de olor, sustancias que afectan la adhesión de

probióticos y microorganismos no deseados como se discutió anteriormente. Tal producto absorbente puede incluir una lámina exterior permeable que pretende estar en contacto cercano con la piel del portador, una lámina de respaldo preferiblemente impermeable a los líquidos que pretende descansar distante del usuario en uso, y una estructura absorbente dispuesta entre la lámina exterior y la lámina de respaldo. En algunos casos, la lámina adicional en la forma de por ejemplo, una almohadilla o material similar, se puede colocar entre la lámina exterior y la estructura absorbente. La lámina de respaldo es preferiblemente respirable. Las bacterias probióticas pueden estar dispuestas en diferentes partes del artículo absorbente, por ejemplo en la lámina exterior, en la estructura absorbente, entre dos de las capas del artículo absorbente, en un producto inserto suelto en el producto absorbente, o de alguna otra manera. Un producto absorbente de acuerdo con la presente invención también puede comprender preferiblemente un polímero superabsorbente (SAP).

Un artículo sanitario de acuerdo con la invención puede además de las células de *Lactobacillus fermentum* Ess-1 comprender también un ácido orgánico y/o una sal de éstas, tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de éstos, preferiblemente ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico o ácido succínico y/o una sal de éstos, más preferiblemente ácido ascórbico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico y/o una sal de éstos, cuyo ácido tiene un valor pKa que no excede 5.5. Un efecto sinérgico se puede obtener al combinar las células probióticas Ess-1 con ácidos orgánicos y/o sales de éstos.

Un artículo sanitario de acuerdo con la invención preferiblemente comprende  $10^4$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia (cfu), más preferiblemente  $10^6$  a  $10^{10}$  cfu, aún más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  CFU, de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por artículo sanitario.

5

Las bacterias probióticas de la presente invención se pueden aplicar directamente a un artículo sanitario de acuerdo con la invención o suministradas en una composición farmacéutica como se describió aquí aplicadas al producto. En una modalidad preferida las bacterias son bacterias secas, como se describió anteriormente, se aplican directamente al artículo sanitario, solas o en una composición farmacéutica de acuerdo con lo anterior. En otra modalidad preferida las bacterias se pueden aplicar al primer artículo sanitario, por ejemplo, en una suspensión que comprende las bacterias, posteriormente el producto sanitario se seca, suministrando de esta manera un producto con las bacterias secas sobre ésta, opcionalmente en combinación con agentes farmacéuticos adicionales como se describió anteriormente. En otra modalidad preferida, el polvo bacteriano seco se suministra en un líquido agregado al artículo sanitario. Con el fin de reducir la exposición de las bacterias a la humedad durante la elaboración, el transporte y el almacenamiento de artículos que comprenden los probióticos Ess-1, en una modalidad preferida el artículo sanitario se empaca en un empaque impermeable al agua.

10  
15  
20

25

En otro aspecto la invención se relaciona con el uso de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para producir un artículo sanitario tal como un limpiador en húmedo, limpiador en seco, un producto para la higiene femenina tal como una toalla

61

sanitaria, un recubrimiento interior de pantaloncito, un pantaloncito sanitario y  
tampón; un inserto femenino; un pañal o pañal pantalón para niños o adultos  
incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal. El artículo  
sanitario es preferiblemente un artículo absorbente tal como un producto para la  
5 higiene femenina tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento interior de  
pantaloncito, un pantaloncito sanitario o un tampón; un inserto femenino; un pañal  
o pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de  
incontinencia; o un inserto de pañal. El artículo sanitario también puede ser  
preferiblemente un tisú de higiene tal como un paño de lavado, parche, toallita,  
10 toalla, limpiador en húmedo o limpiador en seco.

La invención también se relaciona con el uso de *Lactobacillus fermentum* cepa  
Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und  
Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para  
15 producir una composición farmacéutica tal como una suspensión, pulverizado,  
crema, polvo, supositorio, cápsula, tableta, suplemento oral o inserto vaginal, etc.,  
de acuerdo con lo anterior.

Las composiciones farmacéuticas y los productos que comprenden el *L.*  
20 *fermentum* cepa Ess-1, comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de  
esta cepa bacteriana.

La presente invención también se relaciona con un método para tratar y/o evitar la  
candidiasis que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente  
25 efectiva de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el  
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha  
asignado el número de acceso DSM17851, a un sujeto necesitado de ello. La

62

invención también se relaciona con un método para tratar y/o evitar infecciones bacterianas, tales como la infección del tracto urinario, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von

5 Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a un sujeto necesitado de ello. En tales métodos, la cepa Ess-1 se administra al sujeto por vía de cualquiera de las composiciones o productos farmacéuticos, que se han descrito anteriormente. Para la administración por vía de un artículo sanitario, tal como un producto absorbente, es importante que el

10 producto absorbente se coloque en contacto cercano con la piel de dicho sujeto.

Un objetivo importante de la presente invención es la administración oral del Ess-1. Un aspecto de la invención se relaciona por lo tanto con una composición farmacéutica para la administración oral. Esta administración oral en un primer

15 aspecto conduce a la supresión del crecimiento de hongos y/o bacterias en el tracto gastrointestinal y una mejora del balance de la flora microbiana. Sin embargo, los hongos y las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal también se pueden transferir al área urogenital por vía del ano. La supresión del crecimiento de hongos y/o bacterias en el tracto gastrointestinal puede por lo tanto

20 tener un efecto benéfico tanto sobre el tracto gastrointestinal mismo, pero también sobre el área urogenital debido a un esparcimiento reducido de los hongos y/o bacterias patógenas a esta región. Un efecto sistémico también se puede lograr, tal como disparar las sustancias de respuesta inmune. La administración oral puede por ejemplo suministrarse por vía del Ess-1 que está comprendido en

25 cápsulas, tabletas, trociscos, tableta, pastillas, suspensiones líquidas, suspensiones orales secas, suspensiones orales líquidas, gomas de mascar, enjuagues para la boca, pastillas, pulverizados para la boca, ampolletas, etc. La

administración oral también se puede lograr por vía de productos alimenticios, tales como yogurt, leche, queso fresco, helado, productos hechos de leche fermentada, productos hechos de cereales fermentados, leche en polvo, etc., y productos para niños tal como papilla.

5

En otro aspecto la presente invención se relaciona con productos para la administración tópica y/u oral de la cepa Ess-1 a un animal para mejorar la salud del animal, por ejemplo en una composición farmacéutica de acuerdo con lo anterior o en un material de alimentación o un suplemento alimenticio para un animal. También el Ess-1 se puede utilizar para mejorar la calidad del material de alimentación animal, tal como el ensilaje, en si mismo al inhibir el crecimiento de los hongos y las bacterias en éste.

La presente invención también se relaciona con un método para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de candidiasis que comprende agregar *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicha composición farmacéutica. La presente invención también se relaciona con un método para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas, tal como infecciones del tracto urinario, que comprenden agregar *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicha composición farmacéutica.

25

También, la presente invención se relaciona con un método para preparar un artículo sanitario, tal como un producto absorbente o un tisú de higiene, para el

69

tratamiento y/o prevención de candidiasis que comprende agregar *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicho artículo sanitario. También, la presente invención se relaciona con un método para preparar un artículo sanitario, tal como un producto absorbente o un tisú de higiene, para el tratamiento y/o prevención de infecciones bacterianas tal como infecciones del tracto urinario que comprenden agregar *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicho artículo sanitario.

La invención se describirá ahora con más detalle en la siguiente sección experimental. Los ejemplos son sin embargo solamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

## Sección Experimental

### Ejemplo 1: Aislamiento y tipificación del Ess-1

#### Objetivo

El propósito inicial de este estudio es aislar y tipificar una cepa de *Lactobacillus* que inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y *Candida glabrata* en una gran proporción comparado con otras cepas de *Lactobacillus*.

#### Método

65

### Cepas de Levadura

Los aislados clínicos de *Candida albicans* y *Candida glabrata* se utilizaron como cepas de prueba. Estas se aislaron de la vagina de mujeres con candidiasis vaginal y de hembras saludables.

### Detección sistemática I

Aproximadamente 140 cepas de *Lactobacillus*, que se originan de la piel humana, garganta, dientes, heces de nenes, vegetales y semillas se cultivaron en un caldo MRS y estampadas sobre placas agar MRS. Las placas de agar se incubaron bajo condiciones anaeróbicas a 37°C. Adicionalmente, el agar SAB (Sabouraud)(LAB M, Bury, UK) se vertió en el agar MRS y se le permitió cuajar. El cultivo de *C. albicans* se sembró sobre el agar y las placas se incubaron aeróbicamente a 37°C.

Se hizo una evaluación visual de la inhibición. Las cepas que inhiben *C. albicans* igualmente o con mayor proporción que la cepa *Lactobacillus plantarum* LB931 se seleccionaron para detección sistemática adicional (Detección sistemática II)

### Detección Sistemática II

Las suspensiones de crecimiento de lactobacilli en el caldo dMRS (caldo MRS sin la adición de acetato de sodio) se centrifugaron y se filtraron estériles. El filtrado es en lo sucesivo denominado filtrado de Célula libre de *Lactobacillus*, LCF. Se transfirió un volumen específico a pozos de una placa de micro título y se le permitió secar al aire y posteriormente se resuspendió en agua destilada estéril a una concentración tres veces mayor y transferida a placas micro título con 96 pozos. La *Candida* se agregó a todos los frascos (se utilizaron tres aislados de *C.*

66

*albicans* y *C. glabrata*, respectivamente). La inhibición se evaluó mediante observación visual de turbidez y se graduó por dos personas que utilizan una plantilla sobre una escala de cinco a cero. Los pozos que contienen crecimiento fuerte de *Candida* sp. en caldo dMRS puro se graduaron como cinco, mientras que los pozos sin crecimiento visual se graduaron como cero.

### Tipificación de API y tipificación genética

La identificación a nivel de especie se hizo utilizando un sistema API 50 CHL (bioMérieux, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos de las pruebas de fermentación se analizaron utilizando un software API Lab Plus. La tipificación genética se hizo mediante DSMZ (Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH) mediante análisis de secuencia parcial de rARN 16S.

### Resultados

Todas las cepas se evaluaron de acuerdo con la capacidad de inhibición del crecimiento contra *C. albicans* en la detección sistemática I. 23 cepas de *Lactobacillus* con resultados comparables o que exceden aquel del LB931 se seleccionaron para la detección sistemática II. Fuera de las 23 cepas de *Lactobacillus*, tres fueron cepas de referencia y la mayoría de las cepas se habían aislado del tracto oral. La Figura 1 ilustra la inhibición del crecimiento de cada una de las cepas de *Lactobacillus*, donde cada barra representa el crecimiento medio de tres cepas de *C. albicans* y tres cepas de *C. glabrata* respectivamente.

67

El "Otro 1" probó tener una capacidad comprensiva para inhibir el crecimiento de *Candida*. Ninguna de las cepas de *Lactobacillus* probadas fue similar a la actividad del Otro 1 con relación al efecto tanto de *C. albicans* como *C. glabrata*. El Otro 1 se designó Ess-1 y su patrón de fermentación de carbohidrato y la tipificación genética mostró que éste pertenecía a las especies *Lactobacillus fermentum*.

### Caracterización del Ess-1

Los rADN 16S de la cepa Ess-1 (DSM 17851) se analizó mediante DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) mediante secuenciación directa de aproximadamente 450 nucleótidos de rADN 16S amplificado con PCR. La extracción de ADN genómico, la amplificación mediada por PCR del rADN 16S y la purificación del producto PCR se llevó a cabo como se describió previamente (Rainey, F.A. *et al.* Int. J. Sys. Bacteriol. 1996(46):1088-1092). Los productos PCR purificados se secuenciaron utilizando el Kit CEQ<sup>TM</sup>DTCS-Quickstart (Beckman Coulter) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de reacción de secuencia se electroforizaron utilizando el Sistema de Análisis Genético CEQ<sup>TM</sup>8000.

Los datos de secuencia resultantes fueron puestos en el editor de alineamiento ae2 (Maidak, B.L. *et al.* Nucl. Acids Res. 1999(27):171-173), alineados manualmente y comparados con las secuencias de genes rARN 16S representativos del organismo que pertenece al *Firmicutes* (Maidak, B.L. *et al.*). Para comparación se obtuvieron las secuencias rARN 16S de la base de datos EMBL o RDP (Maidak, B.L. *et al.*).

68

Como resultado de este análisis la siguiente tabla 1 lista aquellos organismos, cuyas secuencias de gen rARN 16S muestran los valores de similitud más altos comparados con la secuencia rADN 16S del Ess-1.

5

**Tabla 1**

| Cepa                                            | % de similitud de Secuencia del gen rARN 16S con el Ess-1 |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931       | 99.3                                                      |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> KRM              | 99.0                                                      |
| <i>Lactobacillus malefermentans</i> DSM 5705    | 85.5                                                      |
| <i>Lactobacillus rossiae</i> ATCC BAA-822       | 88.9                                                      |
| <i>Lactobacillus suebicus</i> DSM 5007          | 86.9                                                      |
| <i>Lactobacillus vaccinofermentum</i> DSM 20634 | 87.2                                                      |

La secuencia del gen rADN 16S parcial de la cepa Ess-1 muestra la similitud más alta con el *Lactobacillus fermentum*. Consecuentemente la cepa Ess-1 puede representar una cepa de *Lactobacillus fermentum*, pero también puede representar nuevas especies dentro del género *Lactobacillus*.

10

**Ejemplo 2: Tratamiento con calor**

*Objetivo*

15

El objetivo de este experimento es estudiar la resistencia al calor de las sustancias que inhiben el crecimiento de *Candida* producidas mediante la cepa Ess-1.

*Método*

20

El LCF se trató con calor durante 20 minutos a 90°C. Se agregaron *C. albicans* y *C. glabrata* a una concentración final de aproximadamente  $5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37°C y el crecimiento de candida en los frascos se evaluó visualmente y se graduó de cinco a cero. Här nämns plates och  
5 vials I samma mening.

### Resultados

El filtrado de la cepa Ess-1 tratado con calor fue exitoso en inhibir el crecimiento  
10 de levaduras como el filtrado no tratado utilizado como comparación. Por lo tanto, el tratamiento con calor del filtrado no destruyó la sustancia activa de esta bacteria.

### Ejemplo 3: Inhibición de *C. albicans* con LCF con adición de sales y ácidos

15

#### Objetivo

El propósito de este estudio es determinar si las sales y los ácidos afectan el crecimiento de *Candida* y si se puede lograr una inhibición mejorada del  
20 crecimiento cuando ellos se agregan al LCF de la cepa Ess-1.

#### Método – sales

Las alícuotas de LCF se le ajustó el pH al valor pKa para cada sal y se secaron al  
25 aire hasta que ellas se secaron completamente y posteriormente resuspendidas en 0.3% de acetato de sodio y propionato de sodio. Se agregó *C. albicans* a una concentración final de aproximadamente  $5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. Las fracciones se

70

incubaron durante 20 horas a 37°C. La inhibición se evaluó mediante observación visual de turbidez y graduada por dos personas utilizando una plantilla sobre una escala de cinco a cero. Los pozos que contienen crecimiento fuerte de *Candida* sp. en un caldo dMRS puro se graduaron como cinco, mientras que los pozos sin  
5 crecimiento visual se graduaron como cero.

#### Métodos – ácidos

Se agregaron ácido succínico, ácido acético, ácido propiónico y ácido ascórbico a  
10 una concentración final de 50 mM a tubos que contienen LCF. El filtrado se le ajustó el pH al valor pKa del respectivo ácido. Se agregaron *C. albicans* y *C. glabrata* a una concentración final de aproximadamente  $5 \times 10^4$  CFU ml<sup>-1</sup>. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37°C y el crecimiento de candida en los pozos se evaluó visualmente y se graduó de cinco a cero.

15

#### Resultados

Los diferentes ácidos y sales ácidas probaron tener un efecto sobre el crecimiento de *C. albicans*. Los resultados iniciales mostraron que una concentración de 50  
20 mM en los filtrados fue la concentración más baja requerida para ver un efecto de algunos ácidos y 0.1-0.3% para ver un efecto de aditivos de sal. El propionato de sodio y el ácido propiónico tuvieron el efecto más extendido sobre *C. albicans*. Como se ilustró en la Figura 2a y b, la adición del efecto inhibitor del crecimiento se logró cuando se agregaron ácido ascórbico (50 mM, pKa y pH: 4,2) o ácido  
25 propiónico (50mM, pKa y pH: 4.87) al Ess-1 LCF. Esto demuestra que se puede obtener un efecto sinérgico al combinar el Ess-1 LCF con ácidos orgánicos y/o

7)

sale de éstos. Por lo tanto una combinación de células Ess-1 con ácidos orgánicos y/o sales de éstas se predijo que resultaría en un efecto sinérgico similar.

#### Ejemplo 4: Análisis de ácido

5

##### *Objetivo*

El objetivo de este estudio es investigar si la cepa Ess-1 produce ácidos, que no se producen o que se producen a un bajo nivel, por otras cepas de *Lactobacillus*, y que podrían explicar la fuerte capacidad inhibitoria de crecimiento de esta cepa bacteriana sobre la levadura.

##### *Método*

El Ess-1 y otras cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en 45 ml de caldo dMRS (caldo MRS sin la adición de acetato de sodio) durante 18 h, centrifugado a 10°C, 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró estéril (0.22 µm, Millex, Billerica, MA, USA) y congelado a -55°C hasta que se envió a Steins Laboratorium A75 (Löddeköping, Suecia) para análisis utilizando cromatografía líquida.

20

##### *Resultados*

Como se puede ver en la Figura 3, la cepa Ess-1 produce más ácido succínico y más ácido acético que las otras cepas bacterianas probadas, que podrían ser una razón de la excelente capacidad inhibitoria de esta cepa sobre el crecimiento de la levadura.

25

72

### **Ejemplo 5: Supervivencia del Ess-1 a través de secado por congelamiento y durante almacenamiento**

#### *Objetivo*

5

El propósito de este experimento es determinar si el Ess-1 sobrevive al secado por congelamiento y permanece viable después de almacenamiento posterior.

#### *Método*

10

El Ess-1 creció en MRS, se concentró diez veces en una suspensión de trehalosa al 20%. La suspensión se congeló a -55°C en un recipiente plástico. Después de 24 h el recipiente se puso en una máquina de secado por congelamiento (Hetosicc, Heto Brikerød, Dinamarca) y se procesó durante 48 h. El producto final se pulverizó y se colocó en un recipiente hermético al aire para almacenamiento. Para incrementar la tensión del recipiente se colocó a 37°C. Las muestras se tomaron a la semana 0, 2, 5 y 11. Las bacterias viables se contaron al suspender el polvo en solución de cloruro de sodio y verlas en placas de agar.

#### *Resultados*

20

25

La cepa Ess-1 sobrevivió bien al secado por congelamiento y estuvo estable durante 11 semanas con solamente una disminución log en la supervivencia durante este período de tiempo. Después de 17 semanas de almacenamiento la supervivencia bajó a 4.5 log. Esto indica una muy buena supervivencia de la bacteria, en razón a que el almacenamiento normalmente tiene lugar a

temperatura ambiente o en un refrigerador, a cuyas temperaturas la disminución de la supervivencia es aún más lenta.

**Ejemplo 6: Supervivencia de la cepa Ess-1 después de la administración a la**  
5 **vagina de cápsulas que comprenden bacterias secadas por congelamiento**

*Objetivo:*

10 Estudar la supervivencia y colonización de Ess-1 después de la administración a la vagina.

*Método*

El Ess-1 creció en MRS, se concentró diez veces en 20% de suspensión de  
15 trehalosa y se secó por congelamiento como se describió anteriormente. Después de la pulverización del material el polvo se llenó en cápsulas de gelatina (tamaño 2, Apoteket AB, Gothenburg, Suecia) a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^9$  CFU por cápsula. Cuatro sujetos voluntarios participaron en el estudio al utilizar una cápsula por semana durante un período menstrual, iniciando la  
20 administración los días anteriores a la menstruación. Los sujetos tomaron muestra vaginales de ellos mismos una vez a la semana antes de la administración de la cápsula al rotar un pasador con algodón estéril de 3 cm 5 veces dentro de la vagina. Las muestras se cultivaron sobre placas de agar y vancomicina resistente a lactobacilos morfológicamente similar al Ess-1, y por lo tanto considerada por ser  
25 Ess-1, fueron contadas.

*Resultados*

JP

Ninguna mujer tuvo un crecimiento fuerte de lactobacilos resistentes a vancomicina al inicio del estudio. Todas las mujeres se sometieron a colonización con Ess-1 en la segunda muestra tomada los días siguientes a la menstruación. El

5 Ess-1 se encontró además a través de todo el estudio en algunas mujeres y en muestras específicas en otras. Así, las cápsulas vaginales se utilizan entonces para colonizar la vagina a través del ciclo menstrual. Los datos se presentan en la tabla 2.

10 **Tabla 2.** La cantidad de Ess-1 encontrado en las muestras vaginales en las mujeres que participan en el estudio. Cuatro mujeres se incluyeron en el estudio y ninguna se sometió a colonización con cepas de *Lactobacillus* resistentes a vancomicina al inicio del estudio (Antes). Los datos se presentan como el Log<sub>10</sub> CFU ml<sup>-1</sup>. Las muestras marcadas “-” están faltando.

15

|         | Antes de<br>iniciar el<br>estudio | Muestra 2 | Muestra 3 | Muestra 4 | Muestra 5 | Muestra 6 |
|---------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Mujer 1 | 0                                 | 6.22      | 6.52      | 4.95      | 5.43      | 2.004.70  |
| Mujer 2 | 0                                 | 4.70      | 0.00      | -         | 4.54      | 4.28      |
| Mujer 3 | 0                                 | 1.30      | -         | 4.22      | 3.85      | -         |
| Mujer 4 | 0                                 | 2.41      | 0.00      | -         | -         | -         |

**Ejemplo 7: Inhibición de bacterias que originan infecciones tales como infecciones del tracto urinario**

20 *Objetivo*



El propósito de este estudio fue examinar si el Ess-1 produce sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias que originan infecciones, tales como infecciones del tracto urinario.

## 5 Método

Se utilizó un método sobre puesto de agar modificado. El Ess-1 creció en un caldo MRS durante 20 h. Se mezcló 1 ml de cultivo bacteriano con 2 ml de 7.5M de solución de acetato de sodio y 22 ml de agar MRS a 50°C y se hizo fluir a una caja petri y se le permitió coagularse. La placa se incubó anaeróbicamente a 37°C durante 20 h. Una capa adicional de 24 ml de agar M17 se mezcló con 0.75 ml de solución de dihidrogen fosfato de potasio 6.5 M se hizo fluir hacia la parte superior de la capa MRS y se le permitió su coagulación. El replicador con pasador de Steer se sumergió en los pozos de la bandeja Bertrani que contenía los cultivos nocturnos de los patógenos y se estampó sobre una capa de agar superior. Las placas se dejaron secar durante 30 minutos y se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de lectura. El caldo MRS estéril se utilizó como control. El pH se registró sobre la capa de agar superior después de la incubación y el crecimiento se categorizó como "crecimiento" o "sin crecimiento". Las cepas patógenas (un total de 23 cepas) se aislaron de mujeres con infecciones en el tracto urinario; ellas incluyeron *E. coli* (4), *Klebsiella sp.* (4), *E. faecalis* (3), *Enterobacter* (4), *Streptococcus* Grupo B (3), *S. aureus* (2), *S. saprophyticus* (1) y *P. mirabilis* (2).

## Resultados



El Ess-1 inhibió el crecimiento de patógenos y todos los patógenos crecieron bien sobre la placa de control. El pH fue de 6.0 sobre la capa de agar superior y no impactará así el crecimiento de ninguna manera.

**REIVINDICACIONES**

1. *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha  
5 asignado el número de acceso DSM17851.
2. *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha  
10 asignado el número de acceso DSM17851, para uso médico.
3. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le  
15 ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis.
4. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le  
20 ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis vaginal.
5. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le  
25 ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de estomatitis.

78

6. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de esofagitis.

5

7. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de infección bacteriana, tal como infección del tracto urinario.

10

8. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la administración oral.

15

9. Una composición farmacéutica que comprende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o diluyente.

20

10. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 9, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable es trehalosa o un factor de crecimiento de *Lactobacillus* en polvo u otra forma.

25

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde las células de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1 se secan, tal como con secado por congelamiento, secado por rociado o secado al aire.

5

12. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-11 que comprende  $10^4$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia (cfu), más preferiblemente  $10^6$  a  $10^{10}$  cfu, aún más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  CFU, de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por dosis.

10

13. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que comprende además otras bacterias probióticas.

15

14. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 13, en donde las otras bacterias probióticas son bacterias productoras de ácido láctico, tal como *Lactobacillus plantarum* LB931.

20

15. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-14, que es una suspensión, pulverizado, crema, polvo, supositorio, cápsula, suplemento oral o inserto vaginal.

25

16. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-15, para la administración oral.

17. Un artículo sanitario que comprende *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851.

18. Un artículo sanitario de acuerdo a la reivindicación 17, que comprende además un ácido orgánico y/o una sal de éstos, tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de éstos.
19. Un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 19-20, que comprende además otras bacterias productoras de ácido láctico, tal como *Lactobacillus plantarum* LB931.
20. Un artículo sanitario de acuerdo a la reivindicación 17-19, que comprende  $10^4$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia (cfu), más preferiblemente  $10^6$  a  $10^{10}$  cfu, aún más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  CFU, de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por producto.
21. Un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 17-20, cuyo artículo sanitario es un artículo absorbente tal como un producto para la higiene femenina tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento interior de pantaloncito, un pantaloncito sanitario o tampón; unos insertos femeninos; un pañal y un pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal.
22. Un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 17-20, cuyo artículo sanitario es un tisú de higiene como un paño de lavado, parche, toallita, toalla, limpiador en húmedo o limpiador en seco.

75

23. Uso de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para producir un artículo sanitario tal como un limpiador en húmedo, limpiador en seco, un producto para la higiene femenina tal como una toalla sanitaria, recubrimiento interior de pantaloncito, pantaloncito sanitario y tampón; unos insertos femeninos; un pañal y un pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal.
24. Uso de acuerdo a la reivindicación 23, cuyo artículo sanitario es un artículo absorbente tal como un producto para la higiene femenina tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento interior de pantaloncito, un pantaloncito sanitario o un tampón; un inserto femeninos; un pañal y un pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal.
25. Uso de acuerdo a la reivindicación 23, cuyo artículo sanitario es un tisú de higiene tal como un paño de lavado, parche, toallita, toalla, limpiador en húmedo, o limpiador en seco.
26. Uso de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para producir una composición farmacéutica tal como una suspensión, pulverizado, crema, polvo, supositorio, cápsula, tableta, suplemento oral, o un inserto vaginal.

27. Un método para tratar y/o prevenir la candidiasis que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a un sujeto necesitado de ello.
28. Un método para tratar y/o prevenir una infección bacteriana, tal como una infección del tracto urinario que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a un sujeto necesitado de ello.
29. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 27-28, en donde dicha cepa de *Lactobacillus fermentum* Ess-1 se administra a dicho sujeto por vía de una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-16.
30. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en donde dicho *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 se administra a dicho sujeto al colocar un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 17-22 en contacto cercano con la piel de dicho sujeto.
31. Un método para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de candidiasis y/o infecciones bacterianas que comprenden agregar *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le

83

ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicha composición farmacéutica.

- 5 32. Un método para preparar un artículo sanitario para el tratamiento y/o prevención de candidiasis y/o infecciones bacterianas que comprende agregar *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicho artículo sanitario.



**LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 Y SU USO PARA EL**  
**TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE CANDIDIASIS E INFECCIONES DEL**  
**TRACTO URINARIO**

5    **RESUMEN**

La presente invención se relaciona con una cepa novedosa de *Lactobacillus fermentum*, denotada cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el

10    número de acceso DSM17851. El *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, ha mostrado propiedades valiosas en la inhibición de Candida. La invención por lo tanto también se relaciona con el uso médico de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, en particular para el tratamiento y/o prevención de candidiasis e infecciones del tracto urinario. La invención también se relaciona con productos farmacéuticos

15    y artículos que comprenden esta cepa bacteriana novedosa.

85

1/4

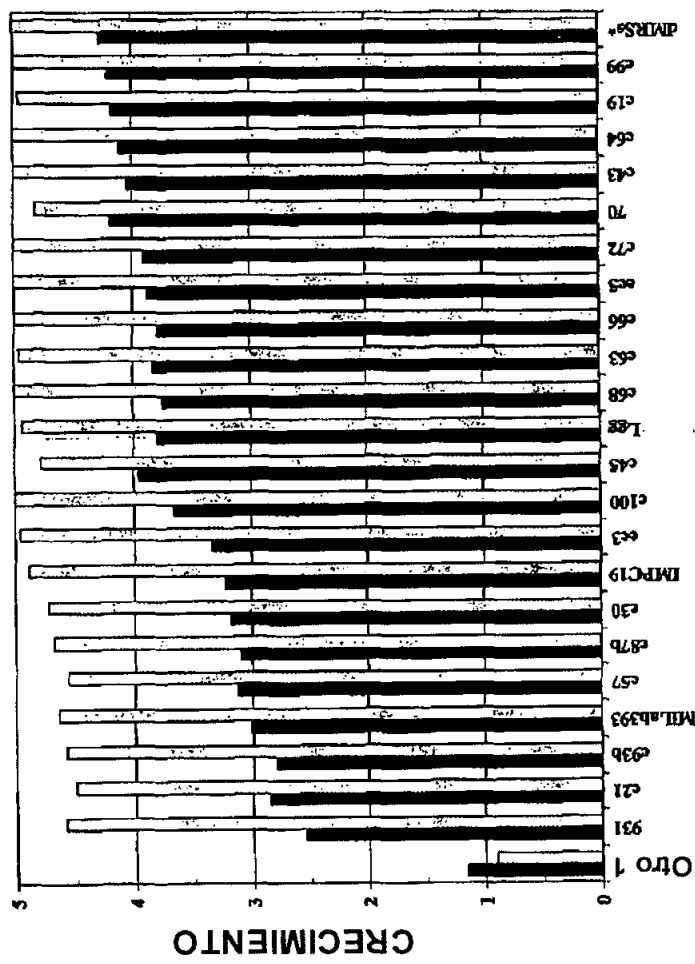


Fig. 1

86

2/4

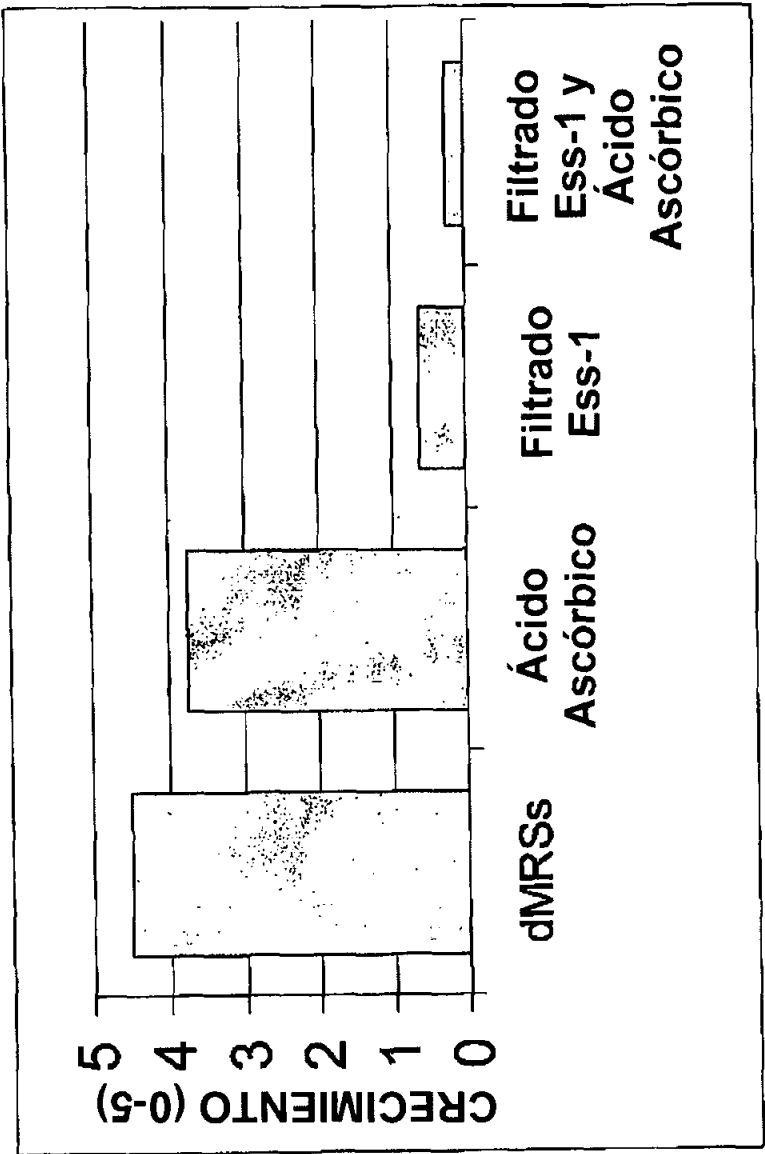


Fig. 2A

87

3/4

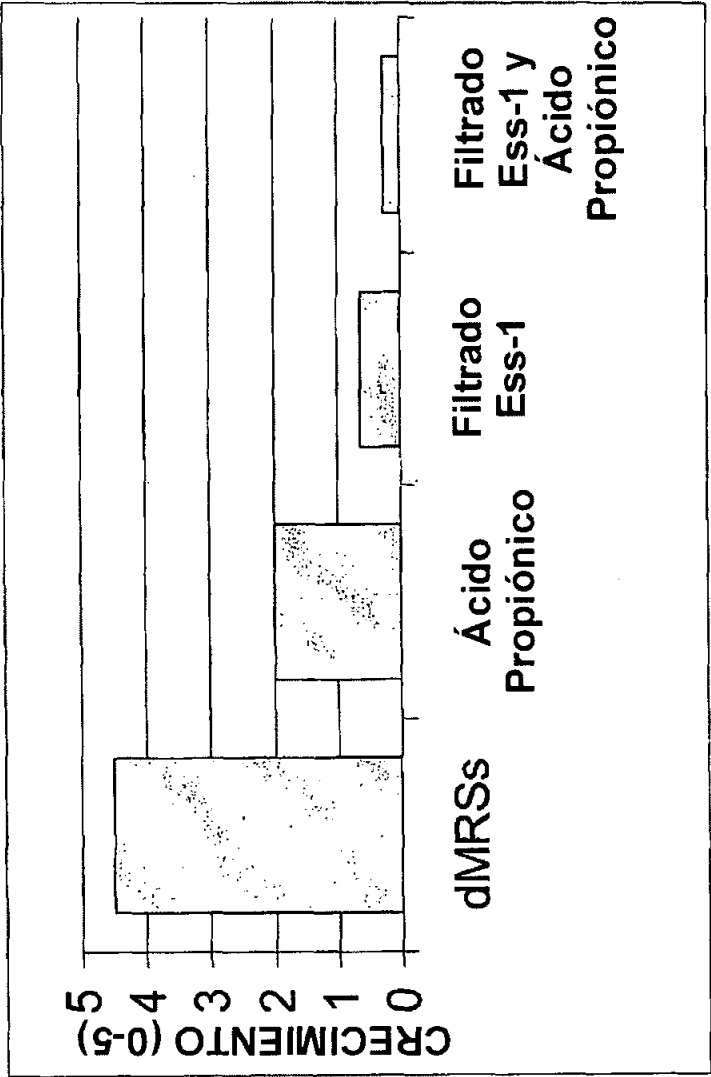


Fig. 2B

28

4/4

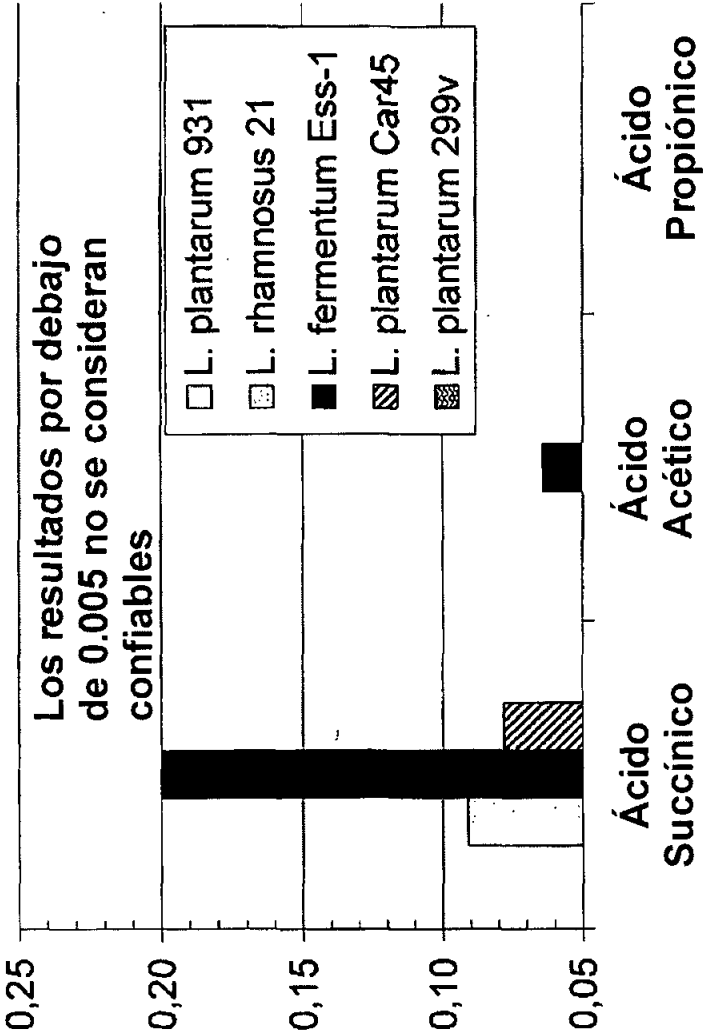


Fig. 3

40  
89

| <b>INDICACIONES RELACIONADAS A MICROORGANISMOS U OTROS MATERIAL BIOLÓGICO DEPOSITADO</b><br>(Regla PCT 13 bis)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A. Las indicaciones hechas adelante se relacionan con el microorganismo u otro material biológico depositado mencionado en la descripción en la página 6, línea 18-28                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                    |
| <b>B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITOS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Depósitos adicionales serán identificados en una hoja adicional <input type="checkbox"/>                                           |
| Nombre de la Institución Depositaria<br>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                    |
| Dirección de la institución Depositaria (incluyendo código postal y país)<br>Mascheroder Weg 1 b<br>D-38124 Braunschweig<br>Alemania                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                    |
| Fecha de Depósito<br>2006-01-06                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Número de Acceso<br>DSM 17851                                                                                                      |
| C. <b>INDICACIONES ADICIONALES</b> (dejar en blanco si no es aplicable)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Esta información se continua en una hoja adicional <input type="checkbox"/>                                                        |
| Recibo en el caso de un depósito original (copia adjunta con la forma de la Solicitud)<br>Afirmación de viabilidad (copia adjunta con la forma de Solicitud)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                    |
| D. <b>ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES LAS INDICACIONES SE HACEN</b> (si las indicaciones no son para todos los estados designados)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                    |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                    |
| E. <b>SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES</b> (dejar en blanco si no es aplicable)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                    |
| Las indicaciones dadas adelante serán entregadas a la Oficina Internacional después (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo; "Acceso del Número de Depósito")<br><br>La afirmación de que el depositario ha autorizado al solicitante referirse al material biológico depositado en la solicitud y que ha dado su consentimiento sin reserva e irrevocable del material depositado para que esté disponible al público de acuerdo con la regla 28 (1) (d) de la Convención de Patentes Europea (EPC) |                                                                                                                                    |
| Para uso solamente de la Oficina Receptora<br><input type="checkbox"/> esta hoja fue recibida con la solicitud Internacional                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Para uso solamente de la Oficina Internacional<br><input type="checkbox"/> esta hoja fue recibida por la Oficina Internacional el: |
| _____<br>Oficial Autorizado                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | _____<br>oficial autorizado                                                                                                        |

Forma PCT/RO/134 (Julio 1998; reimpressa en Enero 2004)

WPC11256/ID.152244

4150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: see extra sheet  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, CHEM.ABS DATA, NUTRICEUT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | WO 03038068 A1 (ELLEN AB), 8 May 2003<br>(08.05.2003), page 15, line 10 - line 35; page 24,<br>line 32 - line 33<br>--                                                                              | 1-32                  |
| X         | FALAGAS MATTHEW E. ET AL, "Probiotics for<br>prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a<br>review", Journal of Antimicrobial Chemotherapy<br>2006, Vol. 58, p. 266-272, see abstract<br>-- | 1-32                  |
| A         | US 20020044926 A1 (REID ET AL), 18 April 2002<br>(18.04.2002), page 3 paragraphs [0036] and [0037]<br>--                                                                                            | 1-32                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

|                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| * Special categories of cited documents:                                                                                                                                | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                                              |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                                                                | "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                                                                     |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date                                                                               | "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family                                                                                                                                                                                                    |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                  |

|                                                                                                                                |                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search<br>5 July 2007                                                       | Date of mailing of the international search report<br>06 -07- 2007         |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Swedish Patent Office<br>Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM<br>Facsimile No. +46 8 666 02 86 | Authorized officer<br>Yvonne Siösteen/ELY<br>Telephone No. +46 8 782 25 00 |

429

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001311

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                       |
|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
| A                                                     | WO 2004022727 A1 (VRI BIOMEDICAL LTD),<br>18 March 2004 (18.03.2004), page 2,<br>line 11 - line 12; page 16, line 33<br><br>--                                                                                                                                                                                | 1-32                  |
| A                                                     | National Library of Medicine (NLM), file Medline,<br>Medline accession no. 16130291, Strus Magdalena et<br>al: "Inhibitory activity of vaginal Lactobacillus<br>bacteria on causing vulvovaginal candidiasis";<br>& Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia 2005,<br>volume 57, no. 1, pages 7-17<br><br>----- | 1-32                  |

43  
92

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001311

International patent classification (IPC)

C12N 1/20 (2006.01)  
A61K 35/74 (2006.01)  
C12R 1/225 (2006.01)

Download your patent documents at [www.prv.se](http://www.prv.se)

The cited patent documents can be downloaded at [www.prv.se](http://www.prv.se) by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **HNWVMIQMZG**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/SE2006/001311

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27-30  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 27-30 relate to a method of treatment of the human or animal body by therapy /Rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compound.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

99

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

28/05/2007

International application No.  
PCT/SE2006/001311

|       |             |    |            |    |             |   |            |
|-------|-------------|----|------------|----|-------------|---|------------|
| WO    | 03038068    | A1 | 08/05/2003 | CA | 2459178     | A | 08/05/2003 |
|       |             |    |            | CN | 1308436     | C | 04/04/2007 |
|       |             |    |            | CN | 1556852     | A | 22/12/2004 |
|       |             |    |            | EP | 1427808     | A | 16/06/2004 |
|       |             |    |            | IL | 160937      | D | 00/00/0000 |
|       |             |    |            | JP | 2005507256  | T | 17/03/2005 |
|       |             |    |            | PL | 369201      | A | 18/04/2005 |
|       |             |    |            | SE | 521022      | C | 23/09/2003 |
|       |             |    |            | SE | 0103127     | A | 21/03/2003 |
|       |             |    |            | US | 20040253217 | A | 16/12/2004 |
|       |             |    |            | ZA | 200401315   | A | 10/03/2005 |
| <hr/> |             |    |            |    |             |   |            |
| US    | 20020044926 | A1 | 18/04/2002 | US | 6479051     | B | 12/11/2002 |
| <hr/> |             |    |            |    |             |   |            |
| WO    | 2004022727  | A1 | 18/03/2004 | AU | 2002951270  | D | 00/00/0000 |
|       |             |    |            | AU | 2003258366  | A | 00/00/0000 |
|       |             |    |            | BR | 0314060     | A | 19/07/2005 |
|       |             |    |            | CA | 2497989     | A | 18/03/2004 |
|       |             |    |            | CN | 1701116     | A | 23/11/2005 |
|       |             |    |            | EP | 1539927     | A | 15/06/2005 |
|       |             |    |            | JP | 2005537791  | T | 15/12/2005 |
|       |             |    |            | KR | 20050057259 | A | 16/06/2005 |
|       |             |    |            | US | 20060067921 | A | 30/03/2006 |
| <hr/> |             |    |            |    |             |   |            |

95

**PATENT COOPERATION TREATY**  
**PCT**  
**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY**  
 (Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)  
 (PCT Article 36 and Rule 70)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                 |                                                                                                                                                                               |                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Applicant's or agent's file reference<br><b>PD53784PC00</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>FOR FURTHER ACTION</b>                                       |                                                                                                                                                                               | See Form PCT/PEAA16 |
| International application No.<br><b>PCT/SE2006/001311</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | International filing date (day/month/year)<br><b>17.11.2006</b> | Priority date (day/month/year)                                                                                                                                                |                     |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC<br><b>INV. C12N1/20</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                 |                                                                                                                                                                               |                     |
| Applicant<br><b>SCA HYGIENE PRODUCTS AB</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                 |                                                                                                                                                                               |                     |
| <p>1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p>3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:</p> <p style="margin-left: 20px;">a. <input checked="" type="checkbox"/> sent to the applicant and to the International Bureau a total of <u>4</u> sheets, as follows:</p> <p style="margin-left: 40px;"><input checked="" type="checkbox"/> sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions);</p> <p style="margin-left: 40px;"><input type="checkbox"/> sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.</p> <p style="margin-left: 20px;">b. <input type="checkbox"/> (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).</p> |                                                                 |                                                                                                                                                                               |                     |
| <p>4. This report contains indications relating to the following items:</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. I      Basis of the report</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. II      Priority</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. III    Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. IV    Lack of unity of invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Box No. V      Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VI    Certain documents cited</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VII    Certain defects in the international application</p> <p><input type="checkbox"/> Box No. VIII   Certain observations on the international application</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                 |                                                                                                                                                                               |                     |
| Date of submission of the demand<br><br><b>2008-06-21</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                 | Date of completion of this report<br><br><b>29.04.2009</b>                                                                                                                    |                     |
| Name and mailing address of the international preliminary examining authority:<br> <b>European Patent Office</b><br><b>D-80298 Munich</b><br><b>Tel. +49 89 2399 - 0</b><br><b>Fax: +49 89 2399 - 4465</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                 | Authorized officer<br><br><b>Heckl, Konrad</b><br><br>Telephone No. +49 89 2399-8430<br> |                     |

96

# INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.  
PCT/SE2006/001311

## Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
  - ☒ the international application in the language in which it was filed
  - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
    - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
    - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
    - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))
2. With regard to the **elements**\* of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

### Description, Pages

1-19 as published

### Claims, Numbers

1-32 received on 21.06.2008 with letter of 21.06.2008

### Drawings, Sheets

1-4 as published

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:
  - ☐ the description, pages
  - ☒ the claims, Nos. 1-32
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):
  - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
  - ☐ the description, pages
  - ☐ the claims, Nos.
  - ☐ the drawings, sheets/figs
  - ☐ the sequence listing (*specify*):
  - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

97

# INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.  
PCT/SE2006/001311

## Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 27-30

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 27-30 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*).

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT  
ON PATENTABILITY**

International application No.  
PCT/SE2006/001311

**Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

|                               |             |                   |
|-------------------------------|-------------|-------------------|
| Novelty (N)                   | Yes: Claims | <u>1-26,31-32</u> |
|                               | No: Claims  |                   |
| Inventive step (IS)           | Yes: Claims | <u>1-26,31-32</u> |
|                               | No: Claims  |                   |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-26,31-32</u> |
|                               | No: Claims  |                   |

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY  
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/SE2006/001311

**Re Item III**

Reference is made to PCT Rule 67.1(iv) in the view of claims 27-30 which relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods. Accordingly, said claims are not subjected to IPE.

**Re Item V**

1. The following documents are considered relevant prior art:

D1: WO 03 038068 A1

D2: FALAGAS M.E. ET AL.: 'Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review' JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY vol. 58, 2006, pages 266 - 272, XP003013958

D3: US 2002 044 926 A1

D4: WO 2004 022727 A1

2. Their disclosure, Novelty and Inventive step (Art.33(2) and (3) PCT:

D1 discloses the probiotic bacterial strain *Lactobacillus fermentum* LN 99 which has stability upon lyophilization and survives in the vagina and is therefore used in the treatment and prophylaxis of urogenital infections (see D1, page 5, line 33 to page 9, line 36; page 24, lines 32-33).

Similarly, D2, D3 and D4 disclose *Lactobacillus fermentum* RC-14 (D2, Abstract and Introduction; D3, the claims) and *L.fermentum* VRI003 (D4, claim 2) and the use thereof. It is noted in this context that RC-14 of D2 is highly likely identical to *L.casei* strain GR-1 (see D2, the paragraph bridging pages 266 and 277).

As such, the bacterial strain of the present set of claims internally denominated Ess-1 and deposited under DSM 17851 is considered novel over those of the cited prior art.

Considering D1 closest prior art it was the problem underlying the present application to provide an alternative strain for the well known use according to D1.

The Applicant has selected a further *Lactobacillus fermentum* strain internally

**INTERNATIONAL PRELIMINARY  
REPORT ON PATENTABILITY  
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/SE2006/001311

denominated as Ess-1 and applied the same in the use according to D1. One skilled in the art could consider any selection from *L.fermentum* strains known in the art and speculate on the successful use thereof according to the prior art. However, already D2 points out that various strains have different properties and different effects on *Candida* and that results from studies testing one strain should not be extrapolated to other strains (see D2, page 271, second column, ll 10-13).

In addition, the Applicant has provided evidence that the strain selected (i.e. Ess-1) has superior properties over that of the prior art (see Example 1 and Fig.1) including D1 selected as closest prior art (unpublished technical information). Therefore, it was the objective problem underlying the claims to provide an alternative strain having better characteristics than that/those of the prior art. The problem has been solved in an inventive manner since there is neither suggestion or disclosure nor sufficient expectation that such a strain were detectable.

**Amended claims**

1. A biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851.
2. A biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for medical use.
3. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of candidiasis.
4. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of vaginal candidiasis.
5. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of thrush.
6. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of esophagitis.
7. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for the prevention and/or treatment of bacterial infection, such as urinary tract infection.
8. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for the preparation of a pharmaceutical composition for oral administration.
9. A pharmaceutical composition comprising a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum*, strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier, excipient and/or diluent.

102

10. A pharmaceutical composition according to claim 9, wherein said pharmaceutically acceptable carrier is trehalose or a lactobacillus growth factor in powder or other form.
11. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-10, wherein the biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 cells are dried, such as freeze dried, spray dried or air dried.
12. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-11 comprising  $10^4$  to  $10^{11}$  colony forming units (cfu), more preferably  $10^6$  to  $10^{10}$  cfu, even more preferably  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU, of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 per dose.
13. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-12, further comprising other probiotic bacteria.
14. A pharmaceutical composition according to claim 13, wherein the other probiotic bacteria are lactic acid producing bacteria, such as *Lactobacillus plantarum* LB931.
15. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-14, which is a suspension, spray, cream, powder, suppository, capsule, oral supplement or a vaginal insert.
16. A pharmaceutical composition according to any of claims 9-15 for oral administration.
17. A sanitary article comprising a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851.
18. A sanitary article according to claim 17, further comprising an organic acid and/or a salt thereof, such as acetic acid, propionic acid, lactic acid, ascorbic acid, phenylalanine, citric acid, butyric acid, valeric acid, capronic acid, succinic acid and/or a salt thereof.
19. A sanitary article according to any of claims 17-20, further comprising other lactic acid producing bacteria, such as *Lactobacillus plantarum* LB931.
20. A sanitary article according to claim 17-19, comprising  $10^4$  to  $10^{11}$  colony forming units (cfu), more preferably  $10^6$  to  $10^{10}$  cfu, even more preferably  $10^8$  to  $10^{10}$  CFU, of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 per product.
21. A sanitary article according to any of claims 17-20, which sanitary article is an absorbent article such as a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, a panty liner, a sanitary panty or tampon; a feminine inserts; a diaper and pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert.
22. A sanitary article according to any of claims 17-20, which sanitary article is a hygiene tissue such as a washcloth, patch, towelette, napkin, wet wipe or dry wipe.
23. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for producing a sanitary article such as a wet wipe, dry wipe, a feminine hygiene product such as a sanitary napkin,

p3

- panty liner, sanitary panty and tampon; a feminine inserts; a diaper or pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert.
24. Use according to claim 23, which sanitary article is an absorbent article such as a feminine hygiene product such as a sanitary napkin, a panty liner, a sanitary panty or tampon; a feminine insert; a diaper and pant diaper for infants or incontinent adults; an incontinence pad; or a diaper insert.
25. Use according to claim 23, which sanitary article is a hygiene tissue such as a washcloth, patch, towelette, napkin, wet wipe, or dry wipe.
26. Use of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, for producing a pharmaceutical composition such as a suspension, spray, cream, powder, suppository, capsule, tablet, oral supplement or a vaginal insert.
27. A method for treating and/or preventing candidiasis comprising the administration of a therapeutically effective amount of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to a subject in need thereof.
28. A method for treating and/or preventing a bacterial infection, such as urinary tract infection, comprising the administration of a therapeutically effective amount of a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to a subject in need thereof.
29. The method according to any of claims 27-28, wherein said biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 is administered to said subject via a pharmaceutical composition according to any of claims 9-16.
30. The method according to any of claims 27-29, wherein said biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1 is administered to said subject by placing a sanitary article according to any of claims 17-22 in close contact with the skin of said subject.
31. A method of preparing a pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of candidiasis and/or bacterial infections comprising adding a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned accession number DSM17851, to said pharmaceutical composition.
32. A method of preparing a sanitary article for the treatment and/or prevention of candidiasis and/or bacterial infections comprising adding a biologically pure strain of *Lactobacillus fermentum* strain Ess-1, which has been deposited at Deutsche

109

Printed: 06/11/2008

CLMSPAMD

SE2006001311

Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH and has been assigned  
accession number DSM17851, to said sanitary article.

(OS)

## REIVINDICACIONES MODIFICADAS

- PARA REALIZAR EL EXAMEN DE  
PATENTABILIDAD

### REIVINDICACIONES CORREGIDAS

1. Una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851.
2. Una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para uso médico.
3. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis.
4. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis vaginal.
5. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de estomatitis.

107

6. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de esofagitis.
7. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de infección bacteriana, tal como infección del tracto urinario.
8. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la administración oral.
9. Una composición farmacéutica que comprende una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o diluyente.

10. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 9, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable es trehalosa o un factor de crecimiento de *Lactobacillus* en polvo u otra forma.
11. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde la cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1 se secan, tal como con secado por congelamiento, secado por rociado o secado al aire.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-11 que comprende  $10^4$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia (cfu), más preferiblemente  $10^6$  a  $10^{10}$  cfu, aún más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  CFU, de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por dosis.
13. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que comprende además otras bacterias probióticas.
14. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 13, en donde las otras bacterias probióticas son bacterias productoras de ácido láctico, tal como *Lactobacillus plantarum* LB931.
15. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-14, que es una suspensión, pulverizado, crema, polvo, supositorio, cápsula, suplemento oral o inserto vaginal.
16. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-15, para la administración oral.

17. Un artículo sanitario que comprende una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851.
18. Un artículo sanitario de acuerdo a la reivindicación 17, que comprende además un ácido orgánico y/o una sal de éstos, tal como ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido ascórbico, fenilalanina, ácido cítrico, ácido butírico, ácido valérico, ácido caprónico, ácido succínico y/o una sal de éstos.
19. Un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 17-20, que comprende además otras bacterias productoras de ácido láctico, tal como *Lactobacillus plantarum* LB931.
20. Un artículo sanitario de acuerdo a la reivindicación 17-19, que comprende  $10^4$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia (cfu), más preferiblemente  $10^6$  a  $10^{10}$  cfu, aún más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  CFU, de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por producto.
21. Un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 17-20, cuyo artículo sanitario es un artículo absorbente tal como un producto para la higiene femenina tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento interior de pantaloncito, un pantaloncito sanitario o tampón; unos insertos femeninos; un pañal y un pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal.

22. Un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 17-20, cuyo artículo sanitario es un tisú de higiene como un paño de lavado, parche, toallita, toalla, limpiador en húmedo o limpiador en seco.
23. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para producir un artículo sanitario tal como un limpiador en húmedo, limpiador en seco, un producto para la higiene femenina tal como una toalla sanitaria, recubrimiento interior de pantaloncito, pantaloncito sanitario y tampón; unos insertos femeninos; un pañal y un pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal.
24. Uso de acuerdo a la reivindicación 23, cuyo artículo sanitario es un artículo absorbente tal como un producto para la higiene femenina tal como una toalla sanitaria, un recubrimiento interior de pantaloncito, un pantaloncito sanitario o un tampón; un inserto femeninos; un pañal y un pañal pantalón para niños o adultos incontinentes; una almohadilla de incontinencia; o un inserto de pañal.
25. Uso de acuerdo a la reivindicación 23, cuyo artículo sanitario es un tisú de higiene tal como un paño de lavado, parche, toallita, toalla, limpiador en húmedo, o limpiador en seco.

///

26. Uso de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para producir una composición farmacéutica tal como una suspensión, pulverizado, crema, polvo, supositorio, cápsula, tableta, suplemento oral, o un inserto vaginal.
27. Un método para tratar y/o prevenir la candidiasis que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a un sujeto necesitado de ello.
28. Un método para tratar y/o prevenir una infección bacteriana, tal como una infección del tracto urinario que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a un sujeto necesitado de ello.
29. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 27-28, en donde dicha una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 se administra a dicho sujeto por vía de una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-16.

30. El método de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en donde dicha cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 se administra a dicho sujeto al colocar un artículo sanitario de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 17-22 en contacto cercano con la piel de dicho sujeto.

31. Un método para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de candidiasis y/o infecciones bacterianas que comprenden agregar una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicha composición farmacéutica.

32. Un método para preparar un artículo sanitario para el tratamiento y/o prevención de candidiasis y/o infecciones bacterianas que comprende agregar una cepa biológicamente pura de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, a dicho artículo sanitario.

113

|                                                                                                                                                                                                                   |  |                                                                                                                                                                                                |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| <br><b>Industria y Comercio</b><br>SUPERINTENDENCIA                                                                              |  | <b>SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO</b><br><b>DIVISION DE NUEVAS CREACIONES</b><br><b>EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN</b><br><b>SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT</b>                    |  |
| (21) N° de solicitud:<br><br>22) Fecha de solicitud:<br><br>(30) Prioridad    (31) <b>Prioridad</b> (32) <b>Fecha</b> (33) <b>País</b>                                                                            |  | (51) Int Cl: <b>C12N 001/020</b><br><br>(71) Solicitante(s) <b>SCA HYGIENE PRODUCTS AB</b><br><br>(72) Inventor(es) <b>ULRIKA HUSMARK Y OTROS</b><br><br>(74) Apoderado: <b>EMILIO FERRERO</b> |  |
| (85) Fecha limite inicio fase nacional:    17/06/2009<br>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT<br>Fecha de presentación de la solicitud:    17/11/2006<br>No. de solicitud PCT/SE2006/001311 |  | (87) Publicación internacional.<br>Fecha:                    22/05/2008<br>N° publicación: <b>WO 2008/060198 A1</b>                                                                            |  |
| (54) Titulo: <b>LACTOBACILLUS FERMENTUM ESS-1, DSM17851 Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE CANDIDIASIS E INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO</b>                                                          |  |                                                                                                                                                                                                |  |

Reivindicación(es):

1. *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851.
2. *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para uso médico.
3. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis.
4. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de candidiasis vaginal.
5. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de estomatitis.
6. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de esofagitis.
7. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una

- composición farmacéutica para la prevención y/o tratamiento de infección bacteriana, tal como infección del tracto urinario.
8. Uso de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, para la preparación de una composición farmacéutica para la administración oral.
  9. Una composición farmacéutica que comprende *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1, que se ha depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y se le ha asignado el número de acceso DSM17851, opcionalmente junto con un portador farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o diluyente.
  10. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 9, en donde dicho portador farmacéuticamente aceptable es trehalosa o un factor de crecimiento de *Lactobacillus* en polvo u otra forma.
  11. Una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en donde las células de *Lactobacillus fermentum*, cepa Ess-1 se secan, tal como con secado por congelamiento, secado por rociado o secado al aire.
  12. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-11 que comprende  $10^4$  a  $10^{11}$  unidades formadoras de colonia (cfu), más preferiblemente  $10^6$  a  $10^{10}$  cfu, aún más preferiblemente  $10^8$  a  $10^{10}$  CFU, de *Lactobacillus fermentum* cepa Ess-1 por dosis.
  13. Una composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que comprende además otras bacterias probióticas.
  14. Una composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 13, en donde las otras bacterias probióticas son bacterias productoras de ácido láctico, tal como *Lactobacillus plantarum* LB931.

114

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 41,359  
FECHA : JUNIO 5 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062893- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:39:33 Dep. 2020 NUECREACIONI  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

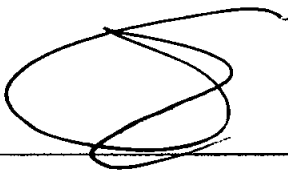
\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | Vr. PAGO   |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 111850502 | 05/06/2009 | 240,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT.   | RENTISTICO                                 | CONCEPTO           | TOTAL CONCEPTO |
|---------|--------------------------------------------|--------------------|----------------|
| 1       | 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I | 21 CERTIFICACIONES | 12,000.00      |
| TOTAL : |                                            |                    | \$ 12,000.00   |

SON: DOCE MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

COLO. 11256 - 841 - 224 - A.

115

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062893- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:39:33 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 39,886  
FECHA : JUNIO 1 DE 2009

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 111857745 | 01/06/2009 | 45,405,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO             | TOTAL CONCEPTO          |
|-------|-------------|----------------------|-------------------------|
| 1     | 50005-01-08 | PRORROGA DE TERMINOS | 31 PRORROGA DE TERMINOS |
|       |             |                      | 81,000.00               |
|       |             | TOTAL :              | \$ 81,000.00            |

SON: OCHENTA Y UNO MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

Colo: 11256-841-224-4.

116

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800178089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 36,663  
FECHA : MAYO 18 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062893- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:39:33 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PGO  | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 105601145 | 18/05/2009 | 59,725,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. | RENTISTICO  | CONCEPTO                                                             | TOTAL CONCEPTO |
|-------|-------------|----------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1     | 50005-01-09 | OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD 1 *** TASA ANUAL AÑOS 17 a 20 PARA MANT | 872,000.00     |

\*\*\*\*\*

TOTAL : \$ 872,000.00

SON: OCHOCIENTOS SETENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

colo: 11256-841-224-4



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE  
PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ]

INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA ☒

INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-062893- -00000-0000

Fecha: 2009-06-17 17:39:33 Dep. 2020 NUECREACIONE  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 116

Trerera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: [info@sic.gov.co](mailto:info@sic.gov.co)

[www.sic.gov.co](http://www.sic.gov.co)

Bogotá, D.C., Colombia

**REPUBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Folio 118

2020  
Bogotá D.C.,

Doctor(a)  
FERRERO EMILIO  
Apoderado(a) y/o Representante de  
SCA HYGIENE PRODUCTS A B.

|            |                            |                   |
|------------|----------------------------|-------------------|
| REFERENCIA | Radicación No.             | 9 62893           |
|            | Solicitud internacional    | PCT/SE2006/001311 |
|            | Fecha inicio fase nacional | 17/06/2009        |
|            | Trámite                    | 11                |
|            | Evento                     | 379               |
|            | Actuación                  | 416               |
|            | Oficio No.                 | 8419              |
|            | Folios                     | 1                 |

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase  
Dado en Bogotá DC,

02 JUL 2009

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL  
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand