

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 410 263**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2009 E 09734424 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2271744**

54 Título: **Nueva cepa de Lactobacillus paracasei subespecie paracasei dotada de propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras**

30 Prioridad:

**18.04.2008 FR 0802158**

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

**01.07.2013**

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)  
17, Boulevard Haussmann  
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**CHAMBAUD, ISABELLE;  
KHLEBNIKOV, ARTEM;  
VILLAIN, ANNE-CATHERINE;  
GROMPONE, GIANFRANCO;  
SAINT DENIS, THIERRY;  
DRUESNE, ANNE y  
SMOKVINA, TAMARA**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Luis Alfonso**

**ES 2 410 263 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* dotada de propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras

5 La invención se refiere a una nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* dotada de propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras.

10 Numerosos estudios científicos han informado sobre los efectos beneficiosos para la salud de ciertos microorganismos presentes en los alimentos fermentados, en particular en los productos lácteos. Estos microorganismos son comúnmente denominados "probióticos". Según la definición generalmente admitida actualmente, los probióticos son "unos microorganismos vivos, que cuando se consumen en cantidades adecuadas, tienen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedante" (Informe FAO/OMS sobre la evaluación de las propiedades sanitarias y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluyendo la leche en polvo que contiene unas bacterias lácticas vivas; Cordoba, Argentina; 1-4 de octubre de 2001).

15 Se ha demostrado que el consumo de productos alimenticios que contienen bacterias probióticas puede producir efectos favorables sobre la salud, en particular por medio del reequilibrio de la flora intestinal, de la mejora de la resistencia a las infecciones, y de la modulación de la respuesta inmunitaria.

20 Los microorganismos probióticos utilizados en la alimentación humana son generalmente unas bacterias lácticas, que pertenecen principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y, en particular, a la especie *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* (de la cual se describe una cepa en la solicitud de patente EP0794707).

25 Sin embargo, los efectos beneficiosos sobre la salud no son generalmente comunes al conjunto de las bacterias de un mismo género, ni siquiera de una misma especie. Muy a menudo, sólo se encuentran en algunas cepas; además, los efectos observados pueden variar cualitativa y/o cuantitativamente de una cepa probiótica a otra, incluso en el interior de una misma especie.

30 Para que un microorganismo pueda ser considerado como potencialmente utilizable como probiótico, debe satisfacer al menos uno, e idealmente varios, de los criterios siguientes:

35 - presentar una actividad inhibidora frente a microorganismos patógenos, que pueden estar presentes en la flora intestinal, pudiendo esta actividad resultar bien de la capacidad para adherirse a las células intestinales, excluyendo o reduciendo así la adherencia de los patógenos, o bien de la capacidad para producir unas sustancias que inhiben los patógenos, o bien la combinación de estas dos características;

40 - presentar propiedades inmunomoduladoras, y en particular inmunoestimulantes y/o anti-inflamatorias.

Además, si este microorganismo está destinado a ser incorporado en un producto lácteo, preferiblemente, debe presentar un crecimiento satisfactorio en la leche.

45 Finalmente, debe conservar una buena viabilidad durante la producción y la conservación del alimento en el que se incorpora, así como después de la ingestión de este alimento por el consumidor, de manera que pueda alcanzar el intestino y sobrevivir en el medio intestinal.

50 Sin embargo, se debe señalar que a pesar de que la viabilidad sea esencial para responder a la definición actual de "probiótico", se ha demostrado que algunos de los efectos beneficiosos asociados a unas cepas probióticas podían ser obtenidos incluso en ausencia de bacterias vivas, y eran atribuibles a ciertas fracciones bacterianas o a fracciones activas de sus sobrenadantes de cultivo. Por ejemplo, la solicitud PCT WO2004093898 describe una preparación inmunomoduladora obtenida por fraccionamiento del sobrenadante de cultivo de la cepa CNCM I-2219.

55 Los inventores han conseguido aislar una nueva cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*, que responde a los criterios indicados anteriormente.

60 La presente invención tiene por objeto esta cepa, que ha sido depositada según el Tratado de Budapest, en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, 25 rue du Docteur Roux, Paris), el 9 de noviembre de 2006, bajo el número I-3689.

La cepa CNCM I-3689 posee las características siguientes:

65 - Morfología: microorganismo Gram-positivo, pequeños bacilos finos, aislados o cadenas cortas.  
- Fermentación de los azúcares siguientes (resultados obtenidos en una galería api 50 CH - Medio MRS API a 37°C durante 48h): ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, manitol, N-acetilglucosamina, arbutina, celobiosa,

maltosa, lactosa, trehalosa, melezitosa, D-turanosa, D-tagatosa, gluconato.

- Presencia de un solo locus CRISPR de secuencia SEC ID nº 1, que contiene una secuencia repetida representada por la secuencia nucleotídica SEC ID nº 2.

5 Posee, por otra parte, unas propiedades antimicrobianas, que se traducen por una fuerte capacidad para inhibir el crecimiento, en cultivo, de microorganismos patógenos, en particular *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocitogenes*.

10 Igualmente, la cepa CNCM I-3689 posee unas propiedades inmunomoduladoras, y, en particular, anti-inflamatorias.

La presente descripción tiene igualmente por objeto unas cepas de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*, susceptibles de ser obtenidas por mutagénesis o por transformación genética de la cepa CNCM I-3689. Preferiblemente, estas cepas conservan las propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de la cepa CNCM I-3689. Puede tratarse de cepas en las que uno o varios de los genes endógenos de la cepa CNCM I-3689 ha(n) mutado, por ejemplo a fin de modificar algunas de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, la capacidad de esta cepa para metabolizar unos azúcares, su resistencia al tránsito intestinal, su resistencia a la acidez, su post-acidificación, o su producción de metabolitos). Puede tratarse, igualmente, de cepas que resultan de la transformación genética de la cepa CNCM I-3689 por uno o varios genes de interés, que permiten, por ejemplo, conferir a dicha cepa unas características fisiológicas suplementarias, o expresar unas proteínas de interés terapéutico o vaccínico, que se desea administrar por medio de dicha cepa.

25 Estas cepas se pueden obtener a partir de la cepa CNCM I-3689, mediante las técnicas clásicas de mutagénesis aleatoria o dirigida, y de transformación genética de lactobacilos, tales como las descritas, por ejemplo, por GURY y otros (Arch Microbiol., 182, 337-45, 2004) o por VELEZ y otros (Appl Environ Microbiol., 73, 3595-3604, 2007), o mediante la técnica denominada "mezcla de genomas" (PATNAIK y otros Nat Biotechnol, 20, 707-12, 2002; Wang Y. y otros, J Biotechnol., 129, 510-15, 2007). Estas cepas poseen, en particular, un locus CRISPR de la secuencia SEC ID nº 1.

30 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de obtención de una cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei*, que posee unas propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras, que comprende una etapa de mutagénesis o de transformación genética de la cepa CNCM I-3689.

35 La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de obtención de una fracción celular, que posee unas propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras a partir de una cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* conforme a la invención. Se trata, en particular, de preparaciones de ADN o de preparaciones de paredes bacterianas obtenidas a partir de cultivos de dicha cepa. Puede tratarse asimismo de sobrenadantes de cultivo o de fracciones de estos sobrenadantes.

40 La presente invención tiene igualmente por objeto unas composiciones que comprenden una cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* conforme a la invención, o una fracción celular obtenida a partir de ésta.

45 Estas composiciones pueden ser, en particular, unos fermentos lácticos, que asocian una cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* conforme a la invención, con una o varias otras cepas de bacterias lácticas, probióticas o no. A título de ejemplo de cepas de bacterias lácticas, se pueden citar las cepas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

50 Puede tratarse igualmente de productos alimenticios y, en particular, de productos lácteos, o de productos farmacéuticos o cosméticos que comprenden una cepa de *Lactobacillus paracasei* subespecie *paracasei* conforme a la invención, o una fracción celular obtenida a partir de ésta.

55 Cuando dicha cepa está presente en forma de bacterias vivas, estas estarán preferentemente presentes a razón de al menos  $10^5$  ufc por gramo, ventajosamente al menos  $10^6$  ufc por gramo de producto, más ventajosamente al menos  $10^7$  ufc por gramo y aún más ventajosamente al menos  $10^8$  ufc por gramo.

La presente invención se entenderá mejor con la lectura del complemento de descripción que sigue, que se refiere a unos ejemplos que ilustran las propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y anti-infecciosas de la cepa CNCM I-3689, así como la tipificación molecular de esta cepa.

60 **EJEMPLO 1: COMPARACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA CEPA CNCM I-3689 CON LAS DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS CONOCIDAS**

Las propiedades de la cepa CNCM I-3689 se han comparado con las de diferentes cepas de la técnica anterior, conocidas por sus propiedades probióticas.

65 La lista de estas cepas se da en la tabla I siguiente.

Tabla I

Género	Especie	Denominación(es)	Número de publicación de solicitudes de patente
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533 = La1 = CNCM I-1225	EP0577903
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	WO2004032639
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC 55544	
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	US4839281
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	WO9910476
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	WO9391823
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 = ATCC55730	WO2004034808
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = CNCM I-2219	EP1189517
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subespecielactis</i>	BB12 = ATCC 27536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subespecielactis</i>	HN019 = NM97/01925	WO9910476

**1. Actividad antimicrobiana**

5 La investigación de actividades antimicrobianas se ha efectuado contra tres bacterias patógenas diana: *Escherichia coli* E1392-75-2A, *Salmonella enteritidis* NIZO B1241 y *Listeria monocytogenes* 4B. Las bacterias lácticas se pusieron en cultivo, en cajas de Petri, en dos medios diferentes: medio Elliker (ELLIKER y otros, J. Dairy Sci., 39, 1611-1612, 1956), y medio TGV (Tryptone-Glucose-Meat Extract).

10 Las cajas son incubadas a 37°C hasta la aparición de colonias bacterianas. Los cultivos de *Bifidobacterium* se han efectuado bajo anaerobiosis. Una capa de agar que contiene el medio BHI (brain-heart infusion) y el patógeno se vierten entonces en la superficie de las cajas. Las cajas se incuban de nuevo a 37°C durante 24h. Después, alrededor de cada colonia de bacterias lácticas, se miden los diámetros de las zonas de inhibición del patógeno. La  
15 puntuación 1 corresponde a un diámetro de entre 1 y 3 mm. La puntuación 2 corresponde a un diámetro de entre 4 y 6 mm. La puntuación 3 corresponde a un diámetro superior a 6 mm. Cada experimento se realizó tres veces, independientemente, para cada cepa.

20 Las puntuaciones obtenidas sobre los patógenos diana en cada experimento se adicionaron, para obtener, para cada bacteria láctica, una puntuación global de actividad antimicrobiana.

Los resultados se dan en la tabla II siguiente.

25 Estos resultados muestran que entre las cepas ensayadas, la cepa CNCM I-3689 es, con la cepa ATCC 55544, la que posee la actividad antimicrobiana más elevada.

Tabla II

Género	Especie	Referencia	(1) <i>E. coli</i> Elliker	(2) <i>Listeria</i> Elliker	(3) <i>Listeria</i> TGV	(4) <i>Salmonella</i> /Elliker	(5) <i>Salmonella</i> /TGV	Puntuaciones antipatógenas (1+2+3+4+5)
<i>Lactobacillus</i>	<i>Paracasei</i> <i>subespecieparacasei</i>	DN 114121 = CNCM I-3689	3	3	2	3	2	13
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	2	3	3	3	2	13
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	2	1	2	3	3	11
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	2	1	2	3	2	10
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	2	3	1	1	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97109514	1	1	2	3	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	1	1	1	2	1	6
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	1	1	1	1	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	1	1	2	0	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	1	1	1	0	1	4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subespecie <i>lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	1	0	0	0	2	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	0	1	0	1	0	2
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subespecie <i>lactis</i>	HN019 = NM97/01925	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = 1-2219	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM 1-2618	0	0	0	0	0	0

## 2. Inmunomodulación

- 5 Las propiedades inmunomoduladoras de las diferentes bacterias lácticas se han evaluado mediante la medición de la proporción IL-10/IL-12.

10 Extracciones de sangre humana, obtenidas de sujetos sanos, se han diluido a una proporción 1:2 con PBS-CA (GIBCO) y purificado gracias a un gradiente de Ficoll (GIBCO). Después de una centrifugación a 400 g durante 30 minutos a 20°C, se han extraído las PBMC ("células mononucleares de sangre periférica"). Se han efectuado después tres etapas de lavado y, a continuación, se han resuspendido las PBMC en un medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado con el 1% de suero de ternera fetal, el 1% de L-glutamina (GIBCO) y 150 µg/ml de gentamicina (GIBCO). Las PBMC se han contado con microscopio y ajustadas a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml, y después se han distribuido (en alícuotas de 1ml) en unas placas de 24 pocillos de cultivos celulares (Corning, Inc.).

15 Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en medio MRS (DE MAN y otros, J. Appl. Bacteriol. 23, 130-135, 1960), y

las cepas de *Bifidobacterium* en medio MRS, suplementado con el 0,03% de L-cisteína (Sigma) bajo anaerobiosis. Todas las cepas se incubaron a una temperatura de 37°C. El crecimiento de las bacterias se detuvo en la fase estacionaria, y las bacterias se lavaron después y se resuspendieron a una concentración de 3 unidades MacFarlan en PBS, que contiene el 20% de glicerol.

5 Un volumen de 10 µl de preparación bacteriana fue añadido en cada pocillo de las placas que contienen las PBMC (proporción bacterias: célula 10:1). Las placas se incubaron durante 24h a 37°C bajo una atmósfera que contiene el 5% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante se aspiró después, se centrifugó a 2000 rpm y se almacenó a -20°C.

10 Las cepas bacterianas control, con propiedades inmunomoduladoras conocidas, se incluyeron en el ensayo. Se utilizó también PBS al 20% de glicerol, sin bacterias, como control negativo. El experimento se realizó para cada cepa sobre unas PBMC procedentes de tres donantes diferentes.

15 La expresión de las citoquinas se midió mediante los ensayos ELISA utilizando unos kit comerciales (Pharmingen, BD Biosciences). Se han estudiado dos citoquinas: IL-10 e IL-12.

Para cada cepa ensayada, se ha calculado la media de la proporción IL-10/IL-12. Estos resultados son reunidos en la tabla III siguiente.

20

Tabla III

Género	Especie	Referencia	Proporción IL-10/IL-12
<b>Lactobacillus</b>	<b><i>paracasei subespecie paracasei</i></b>	<b>DN 114121 = CNCM 1-3689</b>	<b>11,8</b>
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	12,7
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	23,5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	23,6
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	23,7
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	25,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	25,4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	26,4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subespecie lactis</i>	HN019 = NM97/01925	28,7
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subespecie lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	32,4
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	34,5
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	42,0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	51,4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = 1-2219	58,6
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	67,6
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	68,5
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM 1-2618	72,6
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	92,1
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	164,0

Estos resultados muestran que la cepa CNCM I-3689 presenta importantes propiedades antiinflamatorias en este modelo. Ninguna de las cepas de referencia ensayadas presenta tan buenas propiedades.

25 La figura 1 representa la proporción IL-10/IL-12 de cada cepa bacteriana en función de su puntuación anti-patógena (unidad arbitraria) determinada anteriormente. Esta figura muestra hasta qué punto la cepa CNCM I-3689 se diferencia con respecto a las demás cepas ensayadas.

**3. Supervivencia al estrés intestinal**

Se ha utilizado un modelo *in vitro* que refleja las condiciones de estrés intestinal.

5 Se realizan unos cultivos de bacterias lácticas en leche suplementada con el extracto de levadura. Los cultivos se incuban durante 24 a 48h, según las especies (hasta la fase estacionaria de cultivo).

10 Se realiza un jugo intestinal artificial compuesto de sales biliares de cerdo (en 3,3 g/l) y de tampón carbonato NaHCO<sub>3</sub> (en 16,5 g/l). El pH se ajusta a 6,3. Se añade 1 ml de este jugo intestinal a 100 µl de cultivo bacteriano. Los cultivos se incuban después durante 5 horas. Después, se evalúan sobre las cajas las poblaciones bacterianas antes y después del estrés.

Los valores son expresados de la manera siguiente: estrés intestinal = log (ufc5h/ufc0h).

15 Siendo ufcXmin la concentración en bacterias expresada en Unidades que Forman Colonias (UFC) después de X minutos de incubación.

Para el estrés intestinal, la supervivencia es buena cuando el valor es superior a -0,5, medianamente buena cuando el valor está comprendido entre -0,5 y -1,5 y mala cuando el valor es inferior a -1,5.

20 Los resultados son dados en la tabla IV siguiente.

Tabla IV

Género	Especie	Referencia	Estrés intestinal
<b>Lactobacillus</b>	<b><i>paracasei</i> subespecie <i>paracasei</i></b>	<b>DN 114121 = CNCM I-3689</b>	<b>-0,40</b>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subespecie <i>lactis</i>	HN019 = NM97/01925	3,40
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	2,79
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	1,00
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	0,69
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subespecie <i>lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	0,07
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	0,04
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	0,00
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	-0,07
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	-0,14
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM 1-2618	-0,22
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	-0,23
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	-0,79
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	-0,91
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	-1,04
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	-1,12
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	-1,45
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	-1,50
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	-1,91

25 **4. Conclusión**

Los resultados ilustrados en las tablas II, III y IV anteriores muestran que, entre las diferentes cepas ensayadas, la cepa CNCM I-3689 es la única en presentar, al mismo tiempo, unas propiedades antimicrobianas y unas propiedades anti-inflamatorias importantes, acompañadas además de buenas propiedades de resistencia al estrés intestinal.

30

**EJEMPLO 2: CRECIMIENTO SOBRE LECHE DE LA CEPA CNCM I-3689**

Las propiedades de crecimiento sobre leche de la cepa CNCM I-3689 se han ensayado utilizando el protocolo siguiente:

- 5 - Un medio constituido de leche desnatada, reconstituida por agua adicionada de polvo de leche desnatada, ha sido inoculado con la cepa CNCM I-3689 ( $5, 6 \times 10^6$  ufc/g o  $1, 1 \times 10^7$  ufc/g).
- 10 - la actividad fermentaria de esta cepa, relacionada a su crecimiento, se mide siguiendo de manera continua el pH del medio de crecimiento.

Los resultados se ilustran por la gráfica presentada en la figura 2.

- 15 Estos resultados muestran que la cepa CNCM I-3689 es capaz de crecer eficazmente sobre la leche y que, por lo tanto, se puede utilizar en la fabricación de productos lácteos fermentados.

**EJEMPLO 3: TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE LA CEPA CNCM I-3689**

20 Numerosos organismos procariotas poseen uno o varios loci CRISPR -acrónimo para " Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats" (Jansen y otros, 2002, OMICS, Vol. 6, Nb 1, 23-33). Un locus CRISPR se caracteriza por unas secuencias repetidas (o DR) no contiguas, generalmente de 21 a 37 pares de bases (pb), separadas por unas secuencias únicas, generalmente de 20 a 40 pares de bases, denominadas secuencias variables ("*spacers*"). De una cepa bacteriana a otra, es posible observar diferencias sobre:

- 25 - el número de loci CRISPR,
- la posición de los loci CRISPR en el genoma,
- el número de secuencia repetidas, y/o
- 30 - la naturaleza y/o el tamaño de las secuencias variables.

**1. Identificación del locus CRISPR de la cepa CNCM I-3689**

35 Se ha secuenciado la cepa CNCM I-3689. El análisis de su genoma, con la ayuda de la sucesión de programas ERGO<sup>TM</sup>, ha permitido identificar un solo locus CRISPR en esta cepa. Este locus, de un tamaño de 3323 pbs, se sitúa a 20 pares de bases más abajo del ORF RDBK00370. Su secuencia de ADN genómico está representada mediante la secuencia SEC ID nº 1. Está compuesto de una unidad repetitiva (GTTTTCCCCGCACATGCGGGGTGATCC; SEC ID nº 2) que es idéntica a la del locus CRISPR de la cepa ATCC 40 334 (*LActobacillus casei*), y de 54 secuencias variables ("*spacers*").

**2. Construcción de cebadores para la amplificación PCR, específicos de la cepa CNCM I-3689**

45 Se han definido varios pares de cebadores oligonucleotídicos a partir de las secuencias variables del locus CRISPR de la cepa CNCM I-3689. Se han ensayado estos cebadores mediante amplificación PCR sobre varias cepas bacterianas, a fin de verificar su especificidad para la cepa CNCM I-3689.

Se ha retenido un par de cebadores:

- 50 - cebador OFF2486 (CTCAACAGGATAAGTGCCAC; SEC ID nº 3), situado en la 33ª secuencia variable del locus CRISPR, en las posiciones 2049-2068; TM = 60°C;
- cebador OFF2488 (GGTTGGCTGGGTTTAACGC; SEC ID nº 4), situado en la 37ª secuencia variable del locus CRISPR, en las posiciones 2093-2110; TM = 60°C.

55

# ES 2 410 263 T3

Las condiciones de PCR retenidas son las siguientes:

Mezcla de reacción:

ADN:	1 µl
dNTPs:	4 µl
Tampón 10X:	5 µl
Cebador OFF24 86:	0,3 µl
Cebador OFF24 88:	0,3 µl
ADN polimerasa Ex taq™ :	0,2 µl
Agua:	39,2 µl

5  
ciclos:

95 °C	5'	} x 30
95 °C	30''	
61 °C	30''	
72 °C	45''	
72 °C	10'	
10 °C		

10 El tamaño esperado del producto de PCR a partir de la cepa CNCM I-3689 es de 263 pbs.

15 El par de cebadores OFF2486/OFF2488 se ha ensayado sobre la cepa CNCM I-3689 y sobre otras 18 cepas de *Lactobacillus casei* diferentes, entre ellas las cepas CNCM I-1518 y ATCC 334. Las cepas CNCM I-1518 y ATCC 334 representaban los controles negativos, ya que dichos cebadores no pueden hibridarse a la secuencia de ADN genómico de estas cepas en las condiciones de PCR descritas anteriormente.

20 Los resultados se ilustran mediante la electroforesis sobre gel de agarosa de los productos de amplificación PCR, representada en la figura 3, en la que "121" representa la cepa CNCM I-3689, "001" representa la cepa CNCM I-1518, "S3" a "S18" representan respectivamente 16 cepas diferentes de *Lactobacillus casei* y "SL" representa un marcador de peso molecular (SmartLadder ; Eurogentec).

25 Estos resultados muestran que el par de cebadores OFF2486/OFF2488 es bien específico de la cepa CNCM I-3689, en la medida en la que se han obtenido unos productos de amplificación PCR del tamaño esperado (es decir, de aproximadamente 260 pbs) únicamente para esta cepa.

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> COMPAÑÍA GERVAIS DANONE CHAMBAUD, Isabelle KHLEBNIKOV, Artem VILLAIN, Anne-Catherine GROMPONE, Gianfranco SAINT DENIS, Thierry DRUESNE, Anne SMOKVINA, Tamara
- 30 <120> NUEVA CEPA DE LACTOBACILLUS PARACASEI SUBESPECIE PARACASEI DOTADA DE PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS E INMUNOMODULADORAS
- <130> F191PCT233
- <160>4
- <170> PatentIn versión 3.3
- 35 <210> 1
- <211> 3323
- <212> ADN
- <213> *Lactobacillus paracasei*
- <400> 1

ES 2 410 263 T3

gttttccccg	cacatgcggg	ggtgatcctt	acaagctgaa	tggtacgcca	cagccagcgc	60
tgttttcccc	gcacatgcgg	gggtgatccc	tacatcaacg	aaacgctgat	aacgcgatca	120
gcgtttttccc	cgcacatgcg	gggggtgatcc	tgagatcagg	gtttatccaa	ctaccgtcct	180
caagtttttcc	ccgcacatgc	gggggtgatc	cctgatctca	aagccttatc	cagcatcaga	240
tattgtttttc	ccccgcacatg	cggggggtgat	cctggatcag	gcaaaaggcg	atcttgataa	300
ctacagttttt	ccccgcacat	gcgggggtga	tcctgttta	gcctaatacat	taagcgcttc	360
aacgttgtttt	tccccgcaca	tgcgggggtg	atccctgtat	gaaccatta	cgcttgccat	420
gcttgctggt	ttccccgcac	atgcgggggt	gatcctatca	agcccgatta	tttggttcac	480
gattctaagt	ttttccccgca	catgcggggg	tgatccttat	gtcattagga	acgaatgcct	540
atcaacatag	ttttccccgc	acatgcgggg	gtgatcctaa	ccgtttagaa	gggatcacta	600
gccagctgaa	gttttccccg	cacatgcggg	ggtgatcctg	taaatgtccg	cgcccgatgg	660
ttcgtccgcc	ggttttcccc	gcacatgcgg	gggtgatcct	ggtaaattgc	aggctcaata	720
taccagcta	aagttttccc	cgcacatgcg	gggggtgatcc	cgccccctcc	cgcataacct	780
gtgttgctta	aacgtttttcc	ccgcacatgc	gggggtgatc	caaaccaaga	gcaacaaaat	840
gttattaagc	cattgtttttc	ccccgcacatg	cggggggtgat	cctacgctca	atctgcagct	900
tgctggtatt	gttcagtttt	ccccgcacat	gcgggggtga	tccttggtt	atcaagcgac	960
acagaccca	caaacagttt	tccccgcaca	tgcgggggtg	atcccagaat	aatgttctta	1020
aagctgtcct	tggtgaggtt	ttccccgcac	atgcgggggt	gatcccgcgg	ccgtaacagc	1080
ggcagaacag	cttggtgtgt	ttttccccgca	catgcggggg	tgatcctaag	gtgagtgcac	1140
atgtctaaaa	aaattgatcg	ttttccccgc	acatgcgggg	gtgatcctat	ggcagctaat	1200
acggatgcca	tttttagctgg	gttttccccg	cacatgcggg	ggtgatcccc	gactgctagt	1260

ES 2 410 263 T3

agtatcaaaa tacatgatga ggTTTTCCCC gcacatgcgg gggTgatccc gacaagtTcg 1320  
 gaatttctca gattggcggT tagTTTTCCC cgcaCATgcg gggTgatcc ccaagataaaa 1380  
 tctatatctt tgcaataaat agcgtTTTTcc ccgcacatgc gggggTgatc ccggtggTat 1440  
 cccaaacttt tgacataccc tttggttttc cccgcacatg cggggTgat cctaaatgtt 1500  
 cccttaatcc tcaaaaggcc tttcggtttt ccccgcacat gcggggTga tccccaatga 1560  
 cattatTTTT ataatcagtc atttctgttt tccccgcaca TgcggggTg atccccaaaT 1620  
 gccgaaggTc acaaaaaatg gtgatccgtt tccccgcac atgcggggT gatcccaatg 1680  
 catcaaAcac catttCgaag ggCattaggt tttccccgca catgcggggT tgatcccaac 1740  
 agatgatgtc aaaatcccag caagtgattg ttttccccgc acatgcgggg gtgatccccg 1800  
 ctgaaatAtc gctaatcatg ccatcaatga gttttccccg cacatgcggg gTgatcccc 1860  
 attcaggaga tctcgaatac gcttttcttt agTTTTCCCC gcacatgcgg gggTgatccc 1920  
 cagccactgg taaacctgat cggtgttgat tagTTTTCCC cgcaCATgcg gggTgatcc 1980  
 Tggtcattga tgattaaaa caagccaatg gcagTTTTcc ccgcacatgc gggggTgatc 2040  
 ctaactggct caacaggata agtgccacca ttatgttttc cccgcacatg cggggTgat 2100  
 cccatcgtct tctgtataag aagacggatc agatggTTTT ccccgcacat gcggggTga 2160  
 tccttactTg tccgactaat ggactgactg agaatggttt tccccgcaca TgcggggTg 2220  
 atcctaaAgc Tggttacaag gtaccggcca acatggggTt tccccgcac atgcggggT 2280  
 gatcctacca taggtTggct gggTttaacg caatgtgagT tttccccgca catgcgggg 2340  
 tgatcccaac aatttcaaaa acgccattca agaaagTtag ttttccccgc acatgcgggg 2400  
 gtgatcctca gacttagccg aatccacctt cttgtctttg gtttccccg cacatgcggg 2460  
 gTgatcccc agtcagagta atgtgggggc cagacgaaat agTTTTCCCC gcacatgcgg 2520  
 gggTgatccc gagatcattc aacacatata ttcacctcca cagTTTTCCC cgcaCATgcg 2580  
 gggTgatcc tactagtcca tatcagctgg agatcagcgc ctagTTTTcc ccgcacatgc 2640  
 gggggTgatc ccacctaaag atgtggaagc atgaccatgg agacgTTTTc cccgcacatg 2700  
 cggggTgat cctggcaagt gacgctaaag gatcacacca atactgtttt ccccgcacat 2760  
 gcggggTga tcccagtagt tactatgcgt caaacaagca gatTTTgttt tccccgcaca 2820  
 TgcggggTg atccctacaa agacaagtac gcgTTTgttc gcaagatgtt tccccgcac 2880  
 atgcggggT gatcctacta agggagacgg cggtAagtat ggacattTg tttccccgc 2940  
 acatgcgggg gtgatcctaa caacattaaa gTgAatgcc gccactgcaa gTTTTccccg 3000  
 cacatgcggg gTgatcctg gtcaagctcg gcaagatttc gccagcgtgg gTtttcccc 3060  
 gcacatgcgg gggTgatccc aatcggtgca cgTccggctg ttggtaagtc gggTTTTccc 3120  
 cgcaCATgcg gggTgatcc ttgtcgccat tctttgacgg agTTTgacc tgagTTTTcc 3180  
 gcgcacatgc gggggTgatc ccatggctag cgatggTatt atttctgggg ctgagTTTTc 3240  
 cgcgcacatg cggggTgat cctatcagcc ggaagcggTg aagctggcgc gTttggTTTT 3300  
 ccccgcacat gcggggTga tcc 3323

# ES 2 410 263 T3

<210> 2

<211> 28

<212> ADN

<213> *Lactobacillus paracasei*

5 <400> 2

gtttcccccg cacatgcggg ggtgatcc 28

<210> 3

<211> 20

10 <212> ADN

<213> *Lactobacillus paracasei*

<400> 3

ctcaacagga taagtccac 20

15 <210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> *Lactobacillus paracasei*

<400> 4

20 ggttgctgg gttaacgc 19

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, que posee propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, caracterizada porque es la cepa depositada en la CNCM bajo el número I-3689.
- 10 2. Cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, que posee propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras, caracterizada porque es susceptible de ser obtenida a partir de una cepa, según la reivindicación 1, por mutagénesis o transformación genética, y porque posee las propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras de la cepa CNCM I-3689 y/o posee un locus CRISPR de la secuencia SEC ID nº 1.
- 15 3. Procedimiento de obtención de una cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, que posee propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras, caracterizado porque comprende una etapa de mutagénesis o de transformación genética de la cepa CNCM I-3689.
- 20 4. Procedimiento de obtención de una fracción celular que posee propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras, caracterizado porque dicha fracción celular se obtiene a partir de una cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque dicha fracción celular se selecciona del grupo constituido por: una preparación de ADN, una preparación de paredes bacterianas, un sobrenadante de cultivo y una fracción de dicho sobrenadante.
- 30 6. Composición que comprende una cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una fracción celular obtenida según el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5.
- 35 7. Composición, según la reivindicación 6, caracterizada porque se trata de un producto alimenticio.
- 40 8. Composición, según la reivindicación 6, caracterizada porque se trata de un producto farmacéutico.
9. Composición, según la reivindicación 6, caracterizada porque se trata de un producto cosmético.
10. Utilización de una cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o una fracción celular obtenida según el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, para la obtención de una composición seleccionada del grupo constituido por un grupo alimenticio, un producto farmacéutico y un producto cosmético.
11. Cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para su utilización como agente inmunomodulador.
12. Cepa de *Lactobacillus paracasei subespecie paracasei*, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, para su utilización como agente antimicrobiano.

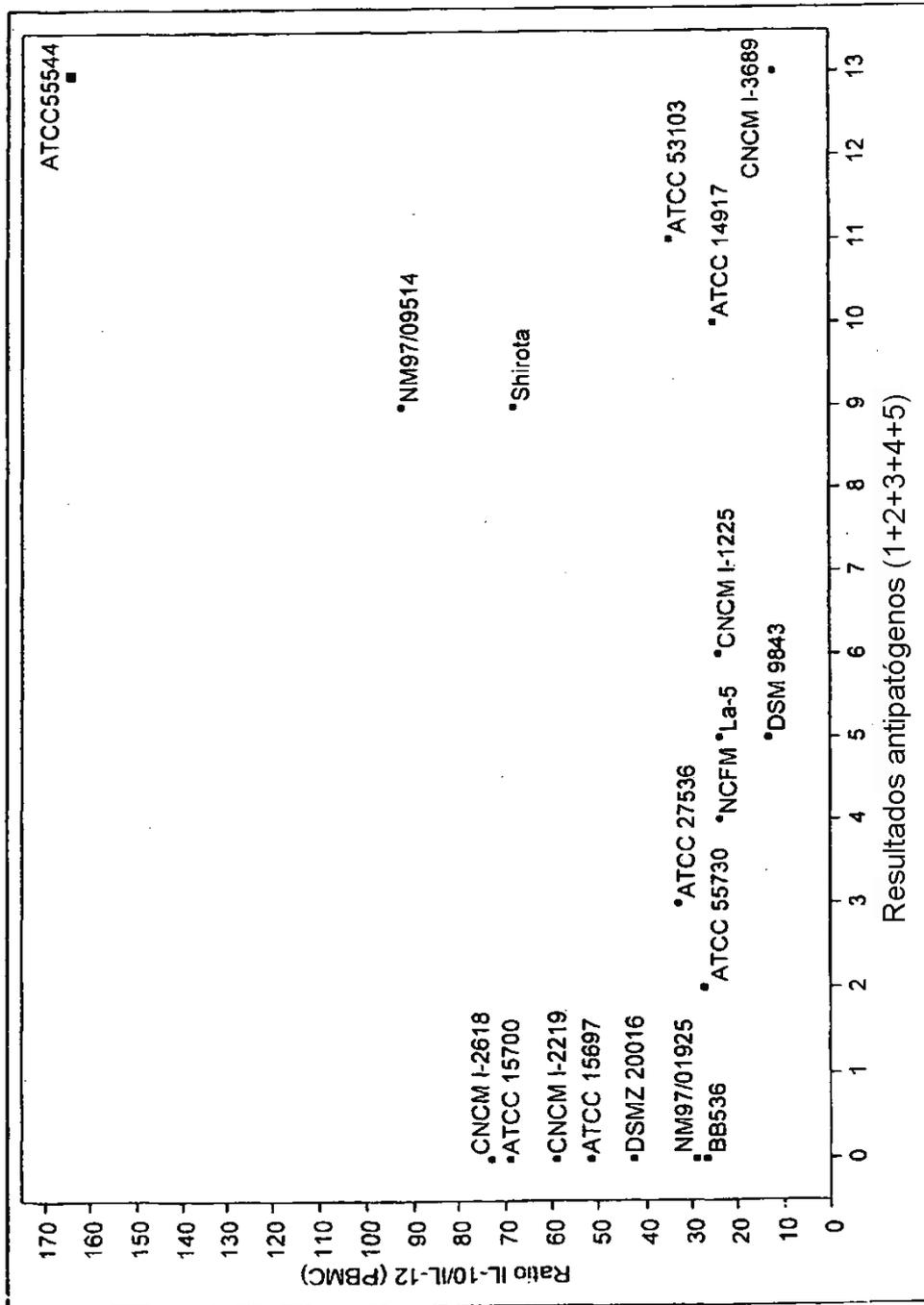


Figura 1

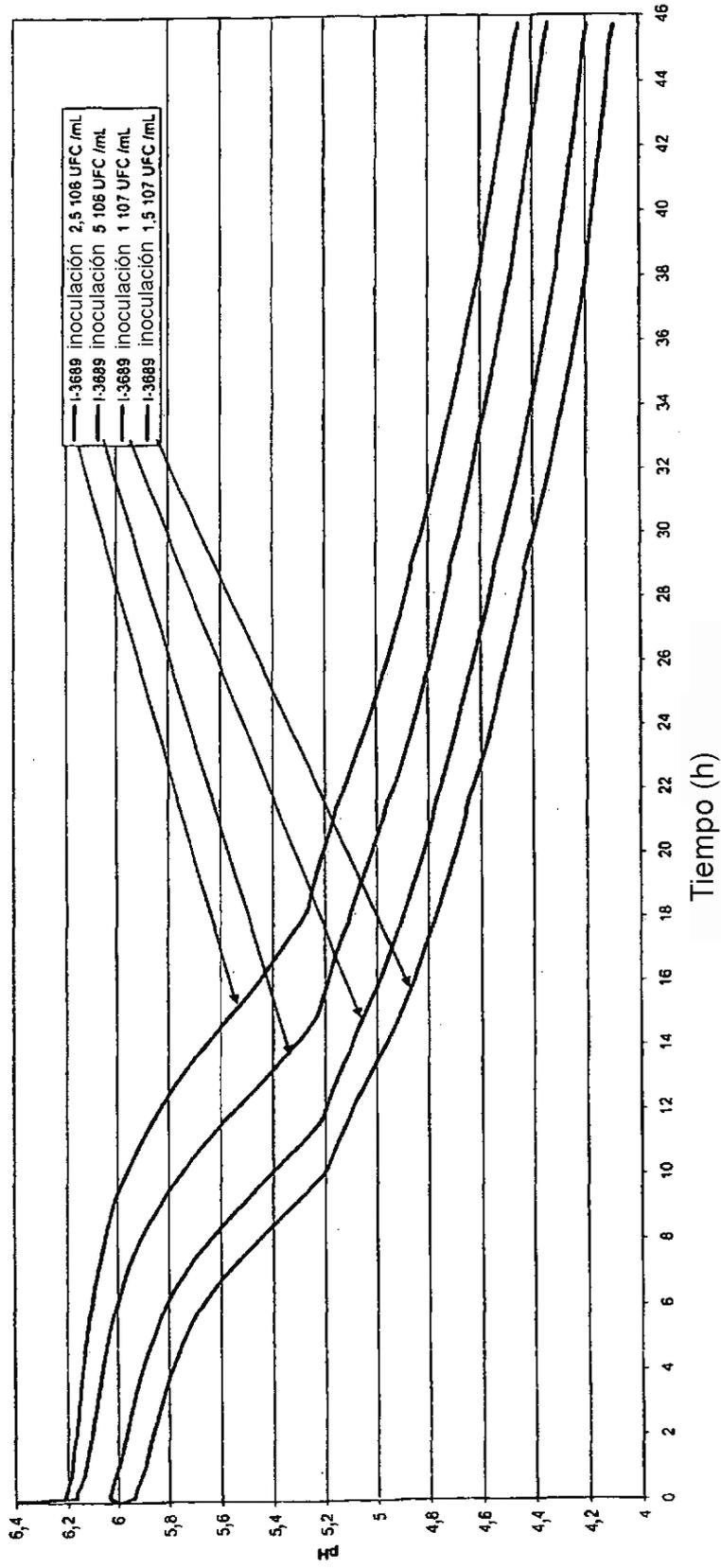


Figura 2

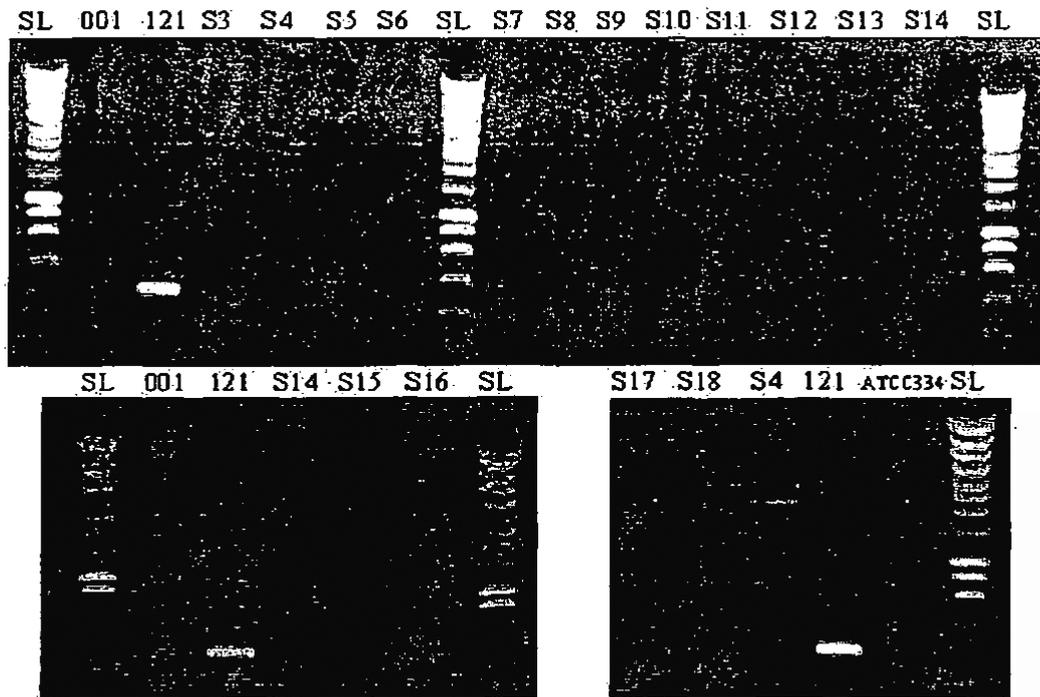


Figura 3