

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 750**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2010** **E 10730508 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015** **EP 2435056**

54 Título: **Lactobacillus pentosus que produce bacteriocinas y uso del mismo en composiciones alimentarias y farmacéuticas**

30 Prioridad:

27.05.2009 IT RM20090270

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

28.04.2015

73 Titular/es:

PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)

Via E. Mattei 3

28100 Novara, IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI;

STROZZI, GIAN PAOLO y

MOGNA, LUCA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 534 750 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

Lactobacillus pentosus que produce bacteriocinas y uso del mismo en composiciones alimentarias y farmacéuticas

5 La presente invención se refiere a una cepa seleccionada de *Lactobacillus pentosus* para su uso como medicamento para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones debidas a bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

10 El documento WO2007/003917 da a conocer una cepa de *Lactobacillus pentosus* diferente, pero dicha cepa también es un probiótico que puede actuar como cultivo iniciador y muestra actividad protectora.

15 En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende dicha cepa de *Lactobacillus pentosus* para la preparación de una composición alimentaria o farmacéutica para combatir, reducir o inhibir la presencia de bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

20 Además, la presente invención se refiere al uso de dicha cepa seleccionada de *Lactobacillus pentosus* para la preparación de un medicamento para combatir, reducir o inhibir la presencia de bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*; en particular para el tratamiento de infecciones debidas a bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

25 Finalmente, la presente invención se refiere al uso de dicha cepa seleccionada de *Lactobacillus pentosus* para la preparación de un aditivo tecnológico que va a añadirse a un cultivo iniciador para la preparación de productos lácteos.

30 Se conoce que *E. coli* es un ejemplo de bacterias Gram-negativas extendidas responsables de un gran número de infecciones bacterianas, a veces también graves, tales como, por ejemplo, cistitis, gastroenteritis y gastroenterocolitis bacterianas.

35 En general, las infecciones debidas a bacterias Gram-negativas se tratan usando fármacos tales como, por ejemplo, antibióticos.

Sin embargo, a lo largo del tiempo algunas bacterias Gram-negativas han desarrollado un cierto grado de resistencia a los fármacos usados normalmente y esto algunas veces limita su uso y los resultados obtenidos.

40 Además, en la práctica médica común, las infecciones bacterianas se tratan enseguida basándose en una terapia farmacológica que sea tan eficaz como sea posible. Este enfoque a menudo se adopta sin poder esperar a pruebas microbiológicas que revelen qué bacteria está implicada y a qué antibiótico es vulnerable.

45 Por tanto, se procede empíricamente, administrando un antibiótico conocido que se supone que es el más eficaz para la familia de bacterias que se supone que constituye la base de la infección.

50 Sin embargo, el enfoque descrito anteriormente implica administrar una cantidad considerable de fármacos, por ejemplo antibióticos, sin conocer de antemano si una terapia de este tipo conducirá a la solución del problema y la consiguiente recuperación. Además, no deben pasarse por alto los posibles efectos secundarios relacionados con la administración de antibióticos, que, tal como se conoce bien, también actúan sobre la flora bacteriana que es positiva y útil para el organismo.

55 Por tanto, se desea disponer de una terapia para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones debidas a bacterias Gram-negativas que pueda usarse como alternativa a o en combinación con fármacos tradicionales con el fin de superar las desventajas que se derivan del uso indiscriminado, a veces, de antibióticos.

Se conoce que los microorganismos pueden activar una serie de sistemas de defensa, tales como por ejemplo, el regulado por la producción de bacteriocinas.

60 El término "bacteriocinas" se usa para indicar los compuestos proteicos producidos por bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas y dotados de una acción inhibidora frente a cepas bacterianas que son diferentes de la cepa productora, pero estrechamente relacionadas con la misma.

65 Las bacteriocinas son proteínas producidas por bacterias lácticas y muestran una actividad antimicrobiana notable en virtud de la que han suscitado un interés creciente, sobre todo en los sectores clínico y tecnológico/alimentario.

En lo que respecta a la aplicación en el sector clínico, las bacteriocinas representan una alternativa válida a los antibióticos.

En el sector alimentario, las bacteriocinas pueden usarse como bioconservantes para controlar y reprimir la población bacteriana indeseable responsable de intoxicaciones y deterioro de la matriz de los alimentos, por

ejemplo, en productos lácteos.

Por tanto, el uso de bacteriocinas en los sectores alimentario y farmacéutico puede ser una herramienta tecnológicamente correcta y eficaz, para usarse en la producción de lo que se define como productos de "alta calidad", que se conservan durante periodos de tiempo prolongados en ausencia de ninguna alteración y con seguridad completa, manteniendo así sus características sensoriales intrínsecas.

Finalmente, una aplicación válida de las bacteriocinas como sustancias antimicrobianas implicará el uso de cultivos bacterianos que producen bacteriocinas como probióticos dietéticos.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar y seleccionar cepas de bacterias lácticas que puedan combatir, a través de una acción bactericida, y/o reducir o inhibir, a través de una acción bacteriostática, la presencia de bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

En particular, sigue existiendo la necesidad de identificar y seleccionar cepas de bacterias lácticas que puedan combatir, reducir o inhibir un amplio espectro de bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*, permitiendo así que se usen de manera válida en el sector alimentario o farmacéutico como sustituto total o parcial de antibióticos tradicionales.

Además, sigue existiendo la necesidad de identificar y seleccionar cepas de bacterias lácticas que puedan usarse conjuntamente en una mezcla gracias a la ausencia, en cada cepa seleccionada, de una acción inhibidora frente a las otras bacterias incluidas en la mezcla o ya presentes en la flora bacteriana intestinal en los intestinos.

El solicitante ha identificado y seleccionado una cepa de *Lactobacillus pentosus* que puede proporcionar una respuesta adecuada a las necesidades mencionadas anteriormente.

Para este motivo, el objeto de la presente invención es una cepa de *Lactobacillus pentosus*, depositada en el instituto DSMZ en Alemania con número DSM 21980, para su uso como medicamento para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones debidas a bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

Un objeto adicional de la presente invención es una composición que comprende dicha *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 para la preparación de una composición alimentaria o farmacéutica para combatir, reducir o inhibir la presencia de bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de dicha cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 para preparar un medicamento para combatir, reducir o inhibir la presencia de bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*; en particular para el tratamiento de infecciones debidas a bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de dicha cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 para preparar un aditivo tecnológico que va a añadirse a un cultivo iniciador para la preparación de productos lácteos.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación.

La tabla 1 muestra una prueba experimental en la que se sometió a prueba la actividad inhibidora de un grupo de cepas bacterianas frente a *E. coli*. En la tabla 1 se muestra lo siguiente: (-) sin halo (sin inhibición); (+) halo de 1-2 mm → (*) numerosas colonias de *E. coli* en el interior de la mancha; (++) halo de 3-5 mm → (**) unas cuantas colonias de *E. coli* en el interior de la mancha; (+++) halo mayor de 5 mm → (***) sin colonias de *E. coli* (inhibición máxima).

La tabla 2 muestra una prueba de inhibición.

La tabla 3 muestra una prueba de gastrorresistencia.

La figura 1 muestra la prueba de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 8739 por la cepa de *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

La figura 2 muestra la prueba de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 10536 por la cepa de *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

La figura 3 muestra la prueba de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 35218 por la cepa de *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

La figura 4 muestra la prueba de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 por la cepa de *Lactobacillus*

pentosus LPS 01, DSM 21980.

El solicitante ha identificado y seleccionado una cepa de *Lactobacillus pentosus* a partir de maíz ensilado natural usando la técnica de aislamiento de lactobacilos, conocida por los expertos en el campo.

La cepa se depositó en la DSMZ en Alemania el 14.11.2008, por Probiotal S.p.A., Novara, Italia, con el siguiente número de presentación: *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01). La cepa DSM 21980 se depositó según el tratado de Budapest.

En una realización preferida, la *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) está indicada para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones que reaparecen (recurrentes) debidas a bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

En otra realización preferida, la *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) está indicada para el tratamiento preventivo o curativo de gastroenteritis o gastroenterocolitis, preferiblemente para el tratamiento preventivo o curativo de deposiciones diarreas y deshidratación consiguiente, náuseas, diarrea, cólicos abdominales acompañados por fiebre y debilidad física.

Se caracterizó y clasificó la cepa seleccionada y aislada basándose en el perfil de fermentación de azúcares (medio API 50 CHL de bioMérieux). Se confirmó la especie mediante amplificación por PCR específica de especie (Torriani S., Felis G. E., Dellaglio F., *Differentiation of Lactobacillus plantarum, L. pentosus, and L. paraplantarum by recA Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with recA Gene-Derived Primers*. Appl Environ Microbiol. agosto de 2001; 3450-3454).

Se sometió la cepa a biotipado usando la técnica de PFGE (electroforesis en gel de campo pulsado), (Tynkkanen S., Satokari R., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Saxelin M. *Comparison of Ribotyping, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Typing of Lactobacillus rhamnosus and L. casei strains*. Appl And Environ Microb. septiembre de 1999; 3908-3914).

El solicitante ha sometido a prueba la actividad anti-*E. coli* de la *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 mencionada anteriormente, que se colocó en contacto directo con las siguientes *E. coli*: ATCC 35218, ATCC 10536, ATCC 8739 y ATCC 25922.

Sin embargo, con el fin de obtener resultados comparativos, también se sometieron a prueba otras cepas de bacterias lácticas probióticas, tal como se establece a continuación.

1) *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608, presente como el único componente microbiano de dos productos disponibles comercialmente diferentes, concretamente Reuterin (Noos) y Reuflor (Italchimici).

Se sometieron a ensayo los productos mencionados en el punto 1 como muestra de referencia positiva, dada la capacidad conocida de la cepa ATCC 53608, presente en las dos formulaciones, para producir una bacteriocina (denominada reuterina) que es activa frente a bacterias Gram-negativas.

Claramente, con el fin de evitar cualquier tipo de acción directa de los excipientes presentes en las formulaciones de los dos productos, en primer lugar se aisló el microorganismo ATCC 53608 y luego se cultivó en un caldo de cultivo y posteriormente se sometió a ensayo.

2) *L. rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06) como otra cepa de interés.

3) *Lactobacillus fermentum* CNCM I-789 (LF5), activa frente a *Candida* vaginal, y por ese motivo considerada un buen candidato en la producción de bacteriocinas con un amplio espectro de acción.

4) *Lactobacillus rhamnosus* GG, ATCC 53103, uno de los probióticos mejor conocidos y más estudiados en el mundo como colonizador intestinal eficaz.

5) *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 y LMG P-21023. Las cuatro cepas mencionadas anteriormente, LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 y LMG P-21023, tienen una capacidad para producir bacteriocinas (denominadas plantarinas) con acción antibacteriana. La comparación entre la cepa de la presente invención y las 4 cepas de *Lactobacillus plantarum* LMG P-21020, LMG P-21021, LMG P-21022 y LMG P-21023 sirve para demostrar la cantidad de bacteriocinas producidas, siendo iguales las condiciones operativas.

6) *Lactobacillus casei sub. paracasei* LPC08, DSM 21718, usada como muestra de referencia negativa.

7) *Lactobacillus acidophilus* con número DSM 21717 (LA02), usada como muestra de referencia negativa.

8) *Lactobacillus lactis sub. cremoris* con número DSM 19072 (NS01), usada como productor de nisina, que se sabe

que es una bacteriocina con un amplio espectro de acción (por ejemplo, eficaz frente a *Listeria* y *Clostridia*).

9) *Streptococcus thermophilus* con número DSM 18616 (FP4), usada como muestra de referencia negativa.

- 5 Las cepas diana están representadas por *E. coli*: ATCC 35218, ATCC 10536, ATCC 8739 y ATCC 25922, en forma liofilizada y que tienen una carga de al menos 1×10^8 UFC/g.

10 Se reconstituyó cada cepa de *E. coli* con 1 ml de solución fisiológica (NaCl al 0,8%) y se usó en una proporción de 100 μ l por placa de Petri que contenía 12-15 ml de medio de cultivo LaptG con agar. 1 litro de caldo de cultivo LaptG tiene: 15 g de peptona Bacto, 10 g de triptona Bacto, 10 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura, 1 g de Tween 80, agua destilada hasta 1000 ml, pH de 6,5-6,6. Para el medio en fase sólida (con agar), se añaden 15 g de agar Bacto.

15 Se esterilizan ambos medios (caldo y agar) a 121°C/15 minutos (Font De Valdez, G y cols.: *Influence of the recovery medium on the viability of injured freeze-dried lactic acid bacteria* Milchwissenschaft 40 (9) 518-520 (1985). Se prepararon las placas de Petri con medio Laptg con agar caliente y se permitió que solidificara bajo una campana extractora de flujo laminar. Posteriormente, se distribuyeron uniformemente 100 μ l de la cepa diana sobre la superficie del medio Laptg usando una espátula estéril. Antes de incubarse, se secaron bajo la campana extractora de flujo laminar las placas de Petri así preparadas. En la tabla 1, se muestran los resultados del ensayo de inhibición.

25 Se cultivaron los lactobacilos en un medio (caldo) MRS líquido y caldo LaptG, mientras que se cultivaron los lactococos en un medio (caldo) M17 líquido y caldo LaptG. Los expertos en el campo conocen los componentes y las composiciones de los medios de cultivo.

Se inocularon todas las bacterias a una tasa del 1%, partiendo del cultivo madre, y se incubaron a 37°C durante 16-18 horas en un baño termostatzado.

30 Al final de la incubación, se midió el valor del pH final del cultivo de caldo (véase la columna en la tabla 1).

Es importante determinar la cantidad de ácido láctico producido por las bacterias individuales puesto que se desea verificar que dicha acidez no es el único parámetro responsable de la inhibición del crecimiento de *E. coli*.

35 Al final de la incubación, se centrifugó una alícuota de cada cultivo de caldo a 5000 rpm/5 min para dar un caldo de cultivo agotado y un sedimento de células. Se filtró el caldo de cultivo agotado usando filtros de jeringa con tamaño de poro de 0,22 μ m y también se sometió a pruebas. Posteriormente, se lavó una vez el sedimento celular lavado en agua estéril para eliminar los residuos de medio de cultivo. Entonces se resuspendió el sedimento celular lavado en solución fisiológica de modo que se obtuviera una turbidez de 0,5 basándose en la escala de McFarland. Este valor hace que sea posible partir de una cantidad inicial de células que es igual para todas las bacterias sometidas a prueba.

Antes del ensayo de inhibición, la ubicación de las manchas respectivas que se someterán a pruebas se marca en el fondo de las placas de Petri preparadas con la cepa diana sobre una base de agar LaptG.

45 Se colocan 10 μ l de cada cultivo de caldo bacteriano sobre la superficie de la placa sembrada con la cepa diana.

También se somete a análisis lo siguiente:

50 a) Las suspensiones bacterianas lavadas. Los datos en la tabla 1 (véase la columna de células lavadas) muestran que la producción de bacteriocina se produce durante el metabolismo de replicación de las bacterias sometidas a prueba. Esto demuestra que la cepa DSM 21980, a la que se refiere la presente invención, puede inhibir, combatir y/o reducir el crecimiento de *E. coli*.

55 Por tanto, la cepa DSM 21980 liofilizada, una vez reconstituida y en condiciones para producir su metabolismo basal, podrá inhibir, combatir y/o reducir el crecimiento de *E. coli*.

60 b) Los caldos de cultivo agotados que se derivan a partir de las diversas bacterias. Los datos en la tabla 1 (véase la columna de caldo filtrado) indican qué cantidad de bacteriocina está presente en el caldo de cultivo. Esto demuestra que la bacteriocina es exógena, activa y está presente en cantidades suficientes para inhibir *E. coli*.

c) Los caldos de cultivo MRS, M17 y LaptG acidificados mediante la adición de ácido láctico hasta alcanzar un pH próximo al pH final de los caldos de cultivo (3,9-4,5). Los datos en la tabla 1 (véanse las 4 líneas inferiores) muestran que la acción de inhibición de *E. coli* se debe en su mayor parte a la producción de bacteriocinas y no al pH del medio.

65 d) Agua estéril.

Se incuban las placas así preparadas en un termostato a 37°C/24 horas.

Al final de la incubación, habrá un crecimiento uniforme de la cepa diana a través de toda la placa, excepto en las zonas en las que está presente bacteriocina. En la tabla 1, se muestran los datos.

Como confirmación de los resultados mostrados en la tabla 1, a continuación se facilita un ejemplo práctico en relación con la prueba de inhibición del crecimiento de *E. coli* por la cepa de *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

En las cuatro imágenes mostradas a continuación (figuras 1-4) puede observarse que:

- la placa de Petri que contenía el medio LaptG con agar tenía una parte de la cepa diana de *E. coli* distribuida por su superficie;

- los símbolos y las líneas negras delimitan los sectores pertenecientes a los diversos tipos de muestras sometidas a prueba;

- la "mancha" consiste en 10 µl de cada muestra sometida a prueba. Debe señalarse que en el caso de una muestra que consiste en cultivos de caldo completos, la mancha aparece más opaca en comparación con las partes restantes de la placa, una indicación de que ha tenido lugar la multiplicación bacteriana;

- el halo de inhibición, la parte oscura presente en cada placa en los sectores 1-2-3-4-5, en el que no se multiplicó la cepa diana debido a la acción de la bacteriocina, es directamente proporcional a la cantidad de la misma.

A continuación se describen los diversos sectores:

Sector 1: efecto de inhibición por el cultivo de caldo completo (células más medio de cultivo LaptG) de la cepa de *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980.

Sector 2: efecto de inhibición por el caldo filtrado de la cepa de *Lactobacillus pentosus* LPS 01, DSM 21980, tras permitir que crezca la propia cepa.

Puede deducirse a partir de la presencia del halo oscuro que la bacteriocina producida es exógena porque se secreta por las células. La bacteriocina producida sigue siendo activa en el caldo de cultivo.

Sector 3: efecto de inhibición por el cultivo de caldo completo (células más medio de cultivo LaptG) de la cepa de *L. rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06).

Sector 4: efecto de inhibición por el cultivo de caldo completo (células más medio de cultivo LaptG) de la cepa de *L. reuteri* ATCC 53608.

Sector 5: efecto de inhibición por el caldo LaptG filtrado en el que se hizo crecer la cepa de *Lactobacillus pentosus* DSM 21980 (LPS 01), tras neutralizarse el pH hasta 6,8 mediante la adición de sosa 0,1 N, para descartar la posibilidad de que la acción ejercida sobre la diana estuviera determinada únicamente por la acidez del medio (caldo de cultivo).

Sector 6: efecto de inhibición del caldo de cultivo LaptG tal cual. En este caso no se observa la formación de un halo puesto que el caldo de cultivo no presenta ningún componente con acción inhibidora.

Las cuatro imágenes se refieren a ensayos realizados en las mismas condiciones operativas pero usando una cepa de *E. coli* diferente cada vez: *E. coli* ATCC 8739 (figura 1), ATCC 10536 (figura 2), ATCC 35218 (figura 3) y ATCC 25922 (figura 4).

Basándose en los ensayos descritos anteriormente, puede deducirse que la cepa de *L. pentosus* con número DSM 21980 (LPS 01) mostró una excelente capacidad inhibidora frente a todas las cepas de *E. coli*, ATCC 8739, ATCC 10536, ATCC 35218 y ATCC 25922, en virtud de su capacidad para producir una bacteriocina más eficaz en grandes cantidades.

Basándose en los resultados notificados anteriormente, puede deducirse que la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) tiene un amplio espectro de acción, puesto que puede combatir, inhibir y reducir el crecimiento de las cuatro cepas de *E. coli* sometidas a prueba.

Además, basándose en los resultados mostrados en la tabla 1 y en las figuras 1-4, puede deducirse que la cepa de *L. pentosus* con número DSM 21980 (LPS 01) puede combatir, a través de una acción bactericida, y/o reducir o inhibir, a través de una acción bacteriostática, la presencia de bacterias Gram-negativas, preferiblemente

enterococos, coliformes y *E. coli*.

Además, el solicitante sometió a prueba la cepa de *L. pentosus* con número DSM 21980 (LPS 01), a la que se refiere la presente invención, frente a otras cepas probióticas tomadas de manera individual, concretamente, *Lactobacillus rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06) y *Lactobacillus plantarum* con número LMG P-21021 (LP01). Esta prueba tenía el objetivo de verificar si la producción de bacteriocina por *L. pentosus* con número DSM 21980 (LPS 01) puede inhibir de alguna manera las otras bacterias *Lactobacillus rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06) y *Lactobacillus plantarum* con número LMG P-21021 (LP01) durante el crecimiento de las mismas debido a la presencia de bacteriocina.

Por consiguiente, se realizó una prueba en la que se cruzaron las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06) y *Lactobacillus plantarum* con número LMG P-21021 (LP01), exactamente como en el ensayo descrito anteriormente, con la *E. coli* patógena.

En la tabla 2, se muestran los datos en relación con las cepas usadas de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01); *Lactobacillus rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06) y *Lactobacillus plantarum* con número LMG P-21021 (LP01).

En la tabla 2, se muestra con (-) que no está presente ningún halo (sin inhibición). Tal como puede observarse a partir de la tabla 2, ninguna bacteria mostró capacidades inhibitoras frente a las otras bacterias probióticas cruzadas.

La cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) no interfiere con otras cepas de bacterias probióticas o con la flora bacteriana beneficiosa.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a una composición que comprende la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) para su uso como medicamento para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones debidas a bacterias Gram-negativas, preferiblemente por enterococos, coliformes y *E. coli*.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a una composición para su uso como medicamento para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones que reaparecen (infecciones recurrentes) debidas a bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

Preferiblemente, dicha composición está indicada para el tratamiento preventivo o curativo de gastroenteritis o gastroenterocolitis. Incluso más preferiblemente, está indicada para el tratamiento preventivo o curativo de deposiciones diarreicas y deshidratación consiguiente, náuseas, diarrea, cólicos abdominales acompañados por fiebre y debilidad física.

En las composiciones mencionadas anteriormente, la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) puede estar viva o muerta o, alternativamente, pueden estar presentes los componentes celulares de la misma.

En una realización preferida, la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01), en forma de bacterias vivas o muertas o, alternativamente, los componentes celulares de la misma, puede usarse para preparar una composición dietética que tiene aplicación válida, como aditivo tecnológico, en la industria láctea. Dicha composición dietética se añade a un cultivo iniciador para la preparación de productos lácteos.

En una realización preferida, las composiciones mencionadas anteriormente también pueden comprender la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06) y/o la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01).

Las composiciones contienen la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) como bacterias vivas o muertas o los componentes celulares de la misma en una cantidad de entre 1×10^5 y 1×10^{11} UFC/g, en relación con el peso total de la composición, preferiblemente de entre 1×10^8 y 1×10^{10} UFC/g.

En una realización preferida, las composiciones mencionadas anteriormente contienen la cepa como bacterias vivas o muertas, o los componentes celulares de la misma, en una cantidad de entre 1×10^5 y 1×10^{11} UFC/dosis, preferiblemente de entre 1×10^8 y 1×10^{10} UFC/dosis. Las dosis pueden ser, por ejemplo, de 1 g, 3 g, 5 g y 10 g.

Las composiciones también pueden contener aditivos y coformulantes que son aceptables desde un punto de vista dietético y farmacéutico.

Las composiciones pueden incluir vitaminas, por ejemplo, ácido fólico, vitamina B₁₂, riboflavina, fosfato de piridoxal, vitamina E y ácido ascórbico; antioxidantes, por ejemplo, polifenoles, flavonoides, proantocianidinas y catequinas; aminoácidos, por ejemplo, glutamina y metionina; minerales, por ejemplo, selenio, cobre, magnesio y zinc;

sustancias activas de origen vegetal, preferiblemente en forma de extracto seco, tales como arándano, equinácea, extracto de pepitas de pomelo, equiseto, gayuba, romero y propóleo.

5 En una realización preferida, las composiciones también contienen al menos una sustancia que tiene propiedades prebióticas en una cantidad de entre el 1 y el 30% en peso, en relación con el peso total de la composición, preferiblemente de entre el 5 y el 20% en peso.

10 Dichas sustancias prebióticas incluyen fructooligosacáridos (FOS), xilooligosacáridos (XOS), galactooligosacáridos; inulina, arabinogalactanos y glucooligosacáridos.

15 En una realización preferida, se induce la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) para producir bacteriocina a gran escala mediante la estimulación de la bacteriocina anti-*E. coli*. La bacteriocina obtenida se extrae a partir de la producción a gran escala descrita anteriormente de modo que se obtiene la bacteriocina de la presente invención tal cual. Esta última puede usarse en las composiciones descritas anteriormente con el fin de combatir (a través de una acción bactericida) y/o reducir o inhibir (a través de una acción bacteriostática) la presencia de bacterias Gram-negativas, preferiblemente enterococos, coliformes y *E. coli*.

20 Además, se organizaron pruebas de gastrorresistencia con el fin de evaluar la capacidad de la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS 01) para alcanzar el intestino en números lo suficientemente grandes como para colonizar la pared intestinal. Se realizaron las pruebas siguiendo los métodos conocidos en la técnica y citados en la lista de referencias adjunta (referencias 1-5). Se organizaron las pruebas considerando a la cepa de *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 como referencia positiva, puesto que es una cepa que pertenece a la familia *Plantarum* de origen humano, que puede colonizar el intestino. Además, se sometió a prueba la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 (LGG) puesto que es un lactobacilo probiótico bien estudiado y bien caracterizado. En la tabla 3 se muestran los datos.

25 La tabla 3 muestra el porcentaje de supervivencia de cepas probióticas frente a dos tipos diferentes de jugos gástricos y una secreción pancreática simulada tras diferentes tiempos de contacto (5', 30' y 60') a 37°C.

30 Se obtuvieron los resultados de supervivencia frente a secreción biliar mediante la comparación del número de colonias que crecieron en un medio de cultivo con o sin la adición de sales biliares o bilis humana.

35 Basándose en los datos proporcionados en la tabla 3, puede deducirse que la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) muestra buena supervivencia en el tránsito gastroduodenal, totalmente comparable con la de la cepa de *Lactobacillus plantarum* con número DSM 9843 de referencia. Por tanto, la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) puede atravesar la barrera gastrointestinal y colonizar el tracto intestinal.

40 Los datos proporcionados en la tabla 1, las figuras 1-4, la tabla 2 y la tabla 3 respaldan el uso de la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01) en el sector alimentario o farmacéutico como sustituto total o parcial de antibióticos tradicionales en el tratamiento preventivo o curativo de infecciones debidas a bacterias Gram-negativas.

45 Bibliografía

1. Jugo gástrico humano - Met. Int. 006 (DAS)

Referencia: Del Piano M., Morelli L., Strozzi GP., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., Capurso S.: Probiotics: from research to consumer. Dig Liver Dis. diciembre de 2006; 38 Supl. 2: S248-55. Revisión.

2. Jugo gástrico artificial - Met. Int. 022 (DAS)

Referencia: Charteris WP. *et al.* Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. mayo de 1998; 84 (5): 759-68.

3. Jugo pancreático simulado - Met. Int. 023 (DAS)

Referencia: Charteris WP. *et al.* Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology, mayo de 1998; 84 (5): 759-68

Del Piano M., Strozzi GP., Barba M.; Allesina S.; Deidda F., Lorenzini P., Morelli L.; Carmagnola S.; Pagliarulo M.; Balzarini M.; Ballare M.; Orsello M.; Montino F.; Sartori M.; Garelo E.; Capurso L. *In vitro* Sensitivity of Probiotics to Human Pancreatic Juice. Journal of Clinical Gastroenterology. 5 de agosto de 2008.

4. Bilis humana - Met. Int. 024 (DAS)

- 5 Referencia: Del Piano M., Morelli L., Strozzi GP., Allesina S., Barba M., Deidda F., Lorenzini P., Ballare M., Montino F., Orsello M., Sartori M., Garelo E., Carmagnola S., Pagliarulo M., S. Capurso: Probiotics: from research to consumer. Dig Liver Dis. diciembre de 2006; 38 Supl. 2: S248-55. Revisión.

5. Sales biliares - Met. Int. 024 (DAS)

- 10 Referencia: Charteris WP. *et al.* Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. mayo de 1998; 84 (5): 759-68.

REIVINDICACIONES

1. *Lactobacillus pentosus* LPS 01, depositada el 14.11.2008 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM 21980.
2. *Lactobacillus pentosus* LPS 01, depositada el 14.11.2008 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM 21980, para su uso como medicamento.
3. *Lactobacillus pentosus* LPS 01, depositada el 14.11.2008 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM 21980, para su uso en un método para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones por bacterias Gram-negativas, preferiblemente por enterococos, bacterias coliformes, *E. coli*.
4. *Lactobacillus pentosus* LPS 01, según la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de infecciones recidivantes por bacterias Gram-negativas, preferiblemente por enterococos, bacterias coliformes, *E. coli*.
5. *Lactobacillus pentosus* LPS 01, depositada el 14.11.2008 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM 21980, para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de gastroenteritis o gastroenterocolitis.
6. *Lactobacillus pentosus* LPS 01, según la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de deposiciones diarreicas con deshidratación subsiguiente, náuseas, diarrea, cólicos abdominales con fiebre y debilidad.
7. Composición farmacéutica que comprende la cepa según la reivindicación 1, para su uso como medicamento para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones por bacterias Gram-negativas, preferiblemente por enterococos, bacterias coliformes, *E. coli*.
8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, para su uso como medicamento para el tratamiento preventivo o curativo de infecciones recidivantes por bacterias Gram-negativas, preferiblemente por enterococos, bacterias coliformes, *E. coli*.
9. Composición según al menos una de las reivindicaciones 7-8, para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de gastroenteritis o gastroenterocolitis.
10. Composición según al menos una de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso en el tratamiento preventivo o curativo de deposiciones diarreicas con deshidratación subsiguiente, náuseas, diarrea, cólicos abdominales con fiebre y debilidad.
11. Composición alimentaria que comprende la cepa según la reivindicación 1, para su uso como aditivo tecnológico que va a añadirse a un cultivo iniciador para reducir o inhibir la presencia de infecciones por bacterias Gram-negativas, preferiblemente por enterococos, bacterias coliformes, *E. coli*, en la preparación de productos lácteos.
12. Composición según al menos una de las reivindicaciones 7 a 10, comprendiendo dicha composición la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con número DSM 21981 (LR06) y/o la cepa de *Lactobacillus pentosus* con número DSM 21980 (LPS01).

Fig. 1: *E.coli* ATCC 8739

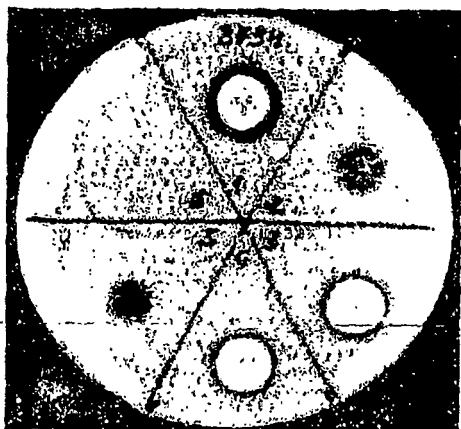


Fig. 2: *E.coli* ATCC 10536

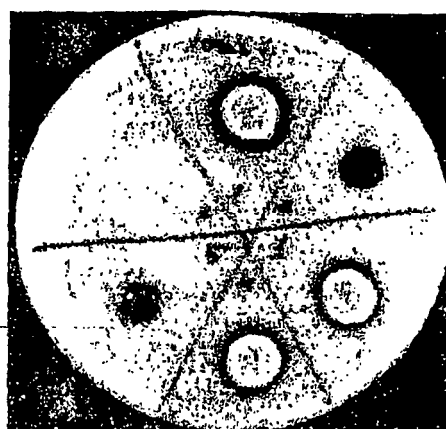


Fig. 3: *E.coli* ATCC 35218

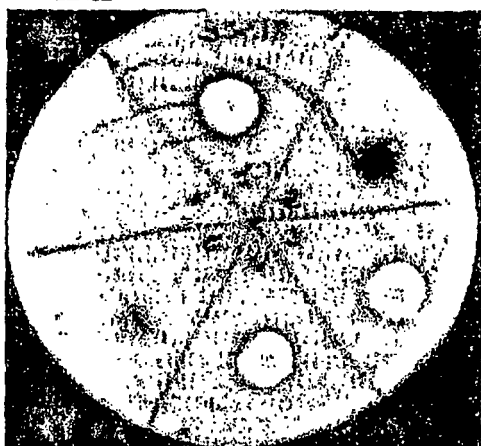


Fig. 4: *E.coli* ATCC 25922

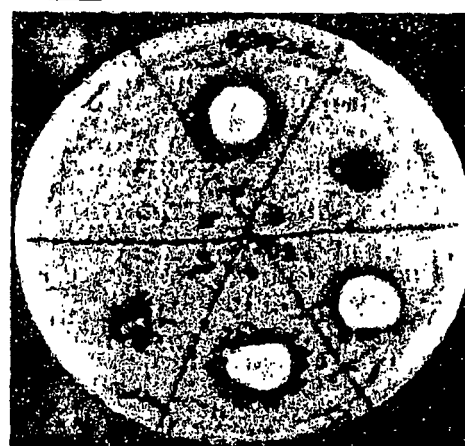


TABLA 1

Cepa sometida a prueba	Medio de cultivo	pH final del cultivo de caldo	10 µl de muestra total de cultivo de caldo	Células lavadas	Caldo filtrado
<i>L. pentosus</i> LPS01 DSM 21980	MRS	3,87	+++	+++	**
	LaptG	3,98			**
<i>L. rhamnosus</i> LR06 DSM 21981	MRS	4,04	++	++	*
	LaptG	4,40	+		*
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	MRS	4,15	-/+	+	*
	LaptG	4,33	+		*
<i>L. rhamnosus</i> GG	MRS	4,12	-	-	-
	LaptG	4,50	-		-
<i>L. fermentum</i> LF5	MRS	4,12	++	+	-/*
	LaptG	4,23	++		-/*
<i>L. plantarum</i> LP02	MRS	4,00	+++	++	*
	LaptG	4,02	++		*
<i>L. plantarum</i> ID 094	MRS	3,96	++	++	*
	LaptG	3,89	++		*
<i>L. plantarum</i> LP01	MRS	3,87	++	++	*
	LaptG	3,94	++		*
<i>L. plantarum</i> ID 126	MRS	3,79	++	++	*
	LaptG	3,86	++		*
<i>L. casei</i> sub.	MRS	4,48	-	-	-

<i>paracasei</i> LPC08	LaptG	4,95	-		-
<i>L. acidophilus</i> LA02	MRS	3,94	-	-	-
	LaptG	3,66	-		-
<i>L. lactis</i> sub. <i>cremoris</i> NS01	MRS	4,35	+	+	-
	LaptG	4,05	+		-
<i>S. thermophilus</i> FP4	MRS	4,86	-	-	-
	LaptG	4,23	-		-
Reuterin ATCC 53608			+		
Reuflor™			+		
	caldo MRS	4,06	-		
	caldo M17	4,02	-		
	caldo LaptG	3,90	-		
	H ₂ O	/	-		

TABLA 2

	LR06	LPS01	LP01
LR06	-	-	-
LPS01	-	-	-
LP01	-	-	-

TABLA 3

Cepa	Parámetros evaluados	% de supervivencia			
	Tiempo de contacto (minutos)	5'	30'	60'	
<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM 21980 (LPS01)	Jugo gástrico humano	84	55	36	
	Jugo gástrico simulado	90	26	15	
	Secreción pancreática simulada	93	86	72	
	Bilis humana (en medio de cultivo)				85
	Sales biliares (en medio de cultivo)				57
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Jugo gástrico humano	81	61	40	
	Jugo gástrico simulado	88	30	20	
	Secreción pancreática simulada	89	83	79	

DSM 9943	Bilis humana (en medio de cultivo)				97
	Sales biliares (en medio de cultivo)				63
<i>Lactobacillus</i> <i>rhannosus</i> ATCC 53103	Jugo gástrico humano	88	60	25	
	Jugo gástrico simulado	90	30	19	
	Secreción pancreática simulada	88	80	73	
	Bilis humana (en medio de cultivo)				84
	Sales biliares (en medio de cultivo)				55