

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 687**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2009 E 09728680 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2268792**

54 Título: **Cepa de *Lactobacillus rhamnosus***

30 Prioridad:

19.03.2008 FR 0801507

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

02.09.2015

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 y
SAINT DENIS, THIERRY**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 544 687 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

Cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

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

- 5 Numerosos estudios científicos han descrito los efectos beneficiosos para la salud de ciertos microorganismos presentes en los alimentos fermentados, principalmente productos lácteos. Estos microorganismos se denominan comúnmente «probióticos». Según la definición generalmente aceptada en la actualidad, los probióticos son: «microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas, tienen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedante» (Informe de la FAO/OMS sobre la evaluación de las propiedades sanitarias y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo, que contienen bacterias lácticas vivas; Córdoba, Argentina; 1-4 octubre 2001).

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

- 15 Los microorganismos probióticos utilizados en la alimentación humana son generalmente bacterias lácticas, pertenecientes principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

- Los efectos beneficiosos sobre la salud no son sin embargo generalmente comunes al conjunto de bacterias de un mismo género ni incluso de una misma especie. Frecuentemente, no se encuentran más que en ciertas cepas; además, los efectos observados pueden variar cualitativa y/o cuantitativamente de una cepa probiótica a otra, dentro de una misma especie.

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

- presentar una actividad inhibidora frente a microorganismos patógenos que puedan estar presentes en la flora intestinal, pudiendo resultar esta actividad bien de la capacidad de adherirse a las células intestinales, excluyendo o reduciendo así la adherencia de agentes patógenos, o bien de la capacidad de producir sustancias inhibidoras de los agentes patógenos, o bien la combinación de estas dos características;
- presentar propiedades inmunomoduladoras y principalmente inmunoestimuladoras y/o anti-inflamatorias.

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

Por último, debe conservar una buena viabilidad, durante la producción y conservación del alimento al que se incorpora, así como después de la ingestión de este alimento por el consumidor, de modo que pueda llegar al intestino y sobrevivir en el medio intestinal.

- 35 Sin embargo, ha de observarse que aunque la viabilidad sea esencial para responder a la definición actual de «probiótico», se ha demostrado que ciertos efectos beneficiosos asociados a las cepas probióticas se podrían obtener incluso en ausencia de bacterias vivas y serían atribuibles a ciertas fracciones bacterianas o fracciones activas de sus líquidos sobrenadantes de cultivo. Por ejemplo, la Solicitud PCT WO2004/093898 describe una preparación inmunomoduladora obtenida por fraccionamiento del líquido sobrenadante de cultivo de la cepa CNCM I-2219.

- Los autores de la presente invención han conseguido ahora aislar una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que responde a los criterios indicados anteriormente.

La presente invención tiene por objeto esta cepa, que ha sido depositada, según el Tratado de Budapest, en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, París), el 9 de noviembre de 2006 con el número I-3690.

Dicha cepa posee las siguientes características:

- Morfología: pequeños bacilos achaparrados a veces cocoides, aislados o en pequeñas cadenas.
 - Fermentación de los azúcares siguientes (resultados obtenidos en una galería API 50 CH – Medio MRS API a 37°C durante 48 horas): ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbose, ramnosa, manitol, sorbitol, metil-D-glucósido, N-acetilglucosamina, arbutina, esculina, salicina, maltosa, lactosa, trehalosa, melecitosa, beta-gentiobiosa, D-turanosa, D-tagatosa y gluconato.
- 50 Por otra parte dicha cepa posee propiedades antimicrobianas, que se traducen en una fuerte capacidad de inhibir el desarrollo en cultivo de microorganismos patógenos.

Además dicha cepa presenta propiedades de adherencia a la manosa. Se sabe que glicoconjugados ricos en manosa presentes en la superficie de las células epiteliales intestinales desempeñan un papel en la unión de bacterias patógenas, tales como *Escherichia coli* enterotóxicas, las salmonelas, *Vibrio cholerae* o *Pseudomonas aeruginosa*, y se ha descrito que las propiedades de adherencia a la manosa de ciertas bacterias probióticas les permitan competir con estos agentes patógenos e inhibir su adherencia a la mucosa intestinal, confiriéndoles así propiedades anti-infecciosas (MICHAIL et ABERNATHY, *Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 35, 350-355, 2002; MANGELL et al., *Dig Dis Sci.*, 47, 511-506, 2002). Estas propiedades, sin embargo, se habían observado principalmente en bacterias de la especie *Lactobacillus plantarum* (principalmente la cepa *L. plantarum* 229v, descrita en la Solicitud EP0817640 y la cepa *L. plantarum* WCFS1), pero no en las bacterias de la especie *Lactobacillus rhamnosus*.

La cepa CNCM I-3690 posee igualmente propiedades inmunomoduladoras y principalmente anti-inflamatorias.

La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de obtención de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, caracterizado por que comprende la mutagénesis o la transformación genética de la cepa CNCM I-3690, así como cualquier cepa de *Lactobacillus rhamnosus* susceptible de ser obtenida por este procedimiento, y que conserve las propiedades antimicrobianas y las propiedades inmunomoduladoras de la cepa CNCM I-3690. Se puede tratar de cepas en las que uno o varios de los genes endógenos de la cepa CNCM I-3690 han sido mutados, por ejemplo con el fin de modificar ciertas de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, la capacidad de esta cepa de metabolizar azúcares, su resistencia al tránsito intestinal, su resistencia a la acidez, su post-acidificación o su producción de metabolitos). Se puede tratar igualmente de cepas resultantes de la transformación genética de la cepa CNCM I-3690 con uno o varios genes de interés, permitiendo, por ejemplo, conferir a dicha cepa características fisiológicas complementarias o expresar proteínas de interés terapéutico o vacunal, que se desea administrar por medio de dicha cepa.

Estas cepas se pueden obtener a partir de la cepa CNCM I-3690 por técnicas clásicas de mutagénesis aleatoria o dirigida y de transformación genética de lactobacilos, tales como las descritas por ejemplo, por GURY et al., (*Arch Microbiol.*, 182, 337-45, 2004) o por VÉLEZ et al., (*Appl Environ Microbiol.*, 73, 3595-3604, 2007), o por la técnica denominada «barajado del genoma» (*genome shuffling*) (PATNAIK et al., *Nat Biotechnol.*, 20, 707-12, 2002; WANG, Y. et al., *J Biotechnol.*, 129, 510-15, 2007).

La presente invención tiene igualmente por objeto un procedimiento de obtención de fracciones celulares que poseen propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas, caracterizado por que dichas fracciones se obtienen a partir de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acuerdo con la invención. Dicha invención trata principalmente de preparaciones de ADN o preparaciones de paredes bacterianas obtenidas a partir de cultivos de dicha cepa. Puede tratar igualmente de líquidos sobrenadantes de cultivo o de fracciones de estos líquidos sobrenadantes.

La presente invención tiene igualmente por objeto composiciones que comprenden una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acuerdo con la invención.

Estas composiciones pueden ser principalmente fermentos lácticos, que asocian una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acuerdo con la invención con una u otras varias cepas de bacterias lácticas, probióticas o no.

Igualmente, se puede tratar de productos alimenticios, principalmente productos lácteos, o productos farmacéuticos o cosméticos que comprenden una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acuerdo con la invención.

Una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acuerdo con la invención se puede utilizar por tanto como medicamento, principalmente como medicamento destinado al tratamiento de una infección microbiana.

Cuando dicha cepa está presente en forma de bacterias vivas, éstas estarán presentes preferiblemente en una proporción de al menos 10^5 UFC por gramo, ventajosamente al menos de 10^6 UFC por gramo de producto, más ventajosamente al menos de 10^7 UFC por gramo e incluso más ventajosamente al menos de 10^8 UFC por gramo.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de una composición que posee propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras, caracterizado por que comprende la obtención de una fracción celular por un procedimiento de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente y la incorporación de dicha fracción en dicha composición. Preferiblemente, dicha composición es un producto alimenticio.

La presente invención se comprenderá mejor con la ayuda de la siguiente descripción que se refiere a los ejemplos que ilustran las propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y anti-infecciosas de la cepa CNCM I-3690.

Ejemplo 1: Comparación de las propiedades de la cepa CNCM I-3690 con las de las cepas probióticas conocidas

Las propiedades de la cepa CNCM I-3690 se compararon con las de las diferentes cepas de la técnica anterior, conocidas por sus propiedades probióticas.

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

Tabla I

Género	Especie	Denominaciones	Número de publicación de las solicitudes de patentes
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533 = La1 = CNCM I-1225	EP0577903
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	WO2004/032639
<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: ATCC 55730	WO2004/034808
<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</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	HN019 = NM97/01925	WO9910476

Materiales y métodos

1- Actividad antimicrobiana

- 5 La búsqueda de las actividades antimicrobianas se efectuó frente a tres bacterias patógenas dianas: *Escherichia coli* E1392-75-2A, *Salmonella enteritidis* NIZO B1241 y *Listeria monocytogenes* 4B. Las bacterias lácticas se cultivaron en placas de Petri en diferentes medios: LM17 (medio M17 (TERZAGHI & SANDINE, Appl. Microbiol. 29, 807-813, 1975) al que se había añadido 1% de lactosa, medio Elliker (ELLIKER et al., J. Dairy Sci., 39, 1611-1612, 1956) y medio TGV (triptona-glucosa-extracto de carne).
- 10 Las placas se incubaron a 37°C hasta la aparición de colonias bacterianas. Los cultivos de *Bifidobacterium* se efectuaron bajo anaerobiosis. Una capa de agar-agar que contenía medio BHI (infusión cerebro-corazón) y el agente patógeno se vertieron entonces en la superficie de las placas. Las placas se incubaron de nuevo a 37°C durante 24 horas. A continuación se midieron los diámetros de las zonas de inhibición del agente patógeno alrededor de cada colonia de bacterias lácticas. La puntuación 1 corresponde a un diámetro entre 1 y 3 mm. La puntuación 2
- 15 corresponde a un diámetro 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.

En cada experimento se añadieron las puntuaciones obtenidas con los agentes patógenos dianas para obtener, para cada bacteria láctica, una puntuación global de la actividad antimicrobiana.

Los resultados se recogen en la Tabla II siguiente.

Estos resultados muestran que entre las cepas ensayadas, la cepa CNCM I-3690 es con la cepa ATCC55544 la que posee la actividad antimicrobiana más elevada.

5

Tabla II

Género	Especie	Referencia	(1) coli/ Elliker	(2) coli/ LM17	(3) Listeria /Elliker	(4) Listeria /TGV	(5) Listeria /LM17	(6) Salmon ella /Elliker	(7) Salmon ella /TGV	Puntuación antipatógenos (1+2+3+4+5+6+7)
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 o CNCM I-3690	2	1	3	2	0	3	3	14
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC55544	2	0	3	3	1	3	2	14
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	2	0	1	2	0	3	3	11
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	2	0	1	2	0	3	2	10
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	2	0	3	1	0	1	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	1	0	1	2	0	3	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533 = La1 = I-1225	1	0	1	1	1	2	1	7
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	1	0	1	1	0	1	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	1	0	1	2	0	0	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	1	0	1	1	0	0	1	4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	1	0	0	0	0	0	2	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	0	0	1	0	0	1	0	2
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bitidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	HN019 = NM97/01925	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-	0	0	0	0	0	0	0	0

Género	Especie	Referencia	(1) coli/ Elliker	(2) coli/ LM17	(3) Listeria /Elliker	(4) Listeria /TGV	(5) Listeria /LM17	(6) Salmon ella /Elliker	(7) Salmon ella /TGV	Puntuación antipatógenos (1+2+3+4+5+6+7)
		2219								
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	0	0	0	0	0	0	0	0

2 - Inmunomodulación

- 5 Las propiedades inmunomoduladoras de las diferentes bacterias lácticas se evaluaron por detección de la modulación inducida por estas bacterias sobre la respuesta inflamatoria de células epiteliales de colon (HT-29), midiendo el efecto de estas bacterias sobre la activación del regulador transcripcional NF- κ B y la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-8 por las células HT-29 en presencia de una mezcla de TNF α , IL-1 β e IFN γ (Cytomix) simulando las condiciones de un ataque inflamatorio.

Cultivo de bacterias lácticas

- 10 El desarrollo de bacterias lácticas se efectuó en medio MRS (DE MAN et al., J. Appl. Bacteriol. 23, 130-135, 1960) o MRS complementado con L-cisteína (1% final) o en medio Elliker, según la especie bacteriana ensayada. Las bacterias se inocularon y cultivaron en un primer pre-cultivo de 10 mL durante 16 horas a 37°C y se volvieron a cultivar al día siguiente en un segundo cultivo en 100 mL durante 16 horas a 37°C, y se recogieron al finalizar la fase estacionaria.

Cultivo y preparación de células

- 15 Las células HT29 se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 4,5 g/L de D-glucosa, L-glutamina (1 mM final), aminoácidos (AA) no esenciales (1% final), penicilina/estreptomicina (1% final), suero fetal bovino (SFB) (10% final).

Las células HT-29 se sembraron en placas de 12 pocillos en la proporción de 2×10^5 células por pocillo en 2 mL de medio, dos días antes de los experimentos de interacción con las bacterias y de estimulación por Cytomix.

- 20 Para la medición de la activación del regulador transcripcional NF- κ B, se transfectaron las células al día siguiente de la siembra, con el plásmido indicador Ig- κ B-luciferasa, como ha sido descrito por TIEN et al. (J. Immunol., 176, 1228-37, 2006). Previamente a la transfección, las células se lavaron y el medio fue reemplazado por el mismo medio sin antibióticos. La transfección se efectuó depositando en cada pocillo 100 μ L de una mezcla que contenía 75 ng de plásmido pIg- κ B-luciferasa y 1 μ L de lipofectamina 2000 en 99 μ L de medio OptiPro. A continuación se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Interacción con las bacterias y estimulación por Cytomix

Las bacterias se recuperaron al final de la fase estacionaria y se lavaron dos veces con PBS antes de ser puestas en contacto con las células.

- 30 A continuación se incubaron durante 2 horas con las bacterias, con una multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Después de dos horas de interacción con las bacterias, las células se incubaron durante 6 horas en presencia de bacterias y de Cytomix en una proporción de 50 ng/mL de TNF α , 2,5 ng/mL de IL-1 β y 7,5 ng/mL de IFN γ en el medio de incubación. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C y 5% de CO₂.

- 35 Con el fin de determinar el nivel basal de activación de NF- κ B y de secreción de IL-8 en ausencia de bacterias lácticas, se realizó el mismo experimento efectuando la estimulación por Cytomix durante 6 horas, después de dos horas de incubación de las células en ausencia de bacterias.

Después de 8 horas de incubación, se recuperó 1 mL de medio para evaluar la IL-8 segregada. Esta evaluación se realizó por ELISA utilizando el kit «Chimiluminescent ELISAs QuantiGlo Human IL-8» (R & D Systems).

- 40 Para medir la activación de NF- κ B, se lisaron las células en 100 microlitros de un tampón (Tris pH 7,9, 25 mM, MgCl₂ 8 mM, Triton al 1%, glicerol al 15%), al que se había añadido DTT 1 mM. Para medir la actividad de luciferasa se añadieron 10 microlitros de lisado celular al tampón de lectura (Tris pH 7,9, 25 mM, MgCl₂ 8 mM, Triton al 1%, glicerol al 15%), al que se habían añadido DTT 1 mM, ATP 100 mM y luciferina/K₂HPO₄ 2 mM - PH 7,58. La medición se efectuó utilizando un luminómetro (BECKMAN COULTER).

Después de este tiempo total de interacción de 8 horas, se midieron la activación de NF-κB y la secreción de IL-8.

Los valores de activación de NF-κB y de secreción de IL-8 se expresaron en porcentajes con relación al nivel basal observado en ausencia de bacterias lácticas. Para cada cepa ensayada, se calculó una puntuación media de inmunomodulación sumando el porcentaje de activación de NF-κB y el porcentaje de secreción de IL-8. Estos resultados se recogen en la Tabla III siguiente.

5

Tabla III

Género	Especie	Referencia	NFκB-HT29 (8)	IL8-HT29 (9)	Puntuación media de HT29 IL8/NFκB (8+9)/2
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 o CNCM I-3690	34,7	49,7	42
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC55544	58,7	101,5	80
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	78,0	81,0	80
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	80,7	91,9	86
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	94,0	99,7	97
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	25,0	49,7	37
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533 = La1 = I-1225	86,9	92,7	90
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	93,9	107,7	101
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	93,8	89,5	92
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	85,8	95,0	90
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	99,4	98,0	99
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	82,0	87,9	85
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	111,6	92,0	102
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	107,7	101,2	104
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	71,4	83,6	78
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	77,5	96,3	87
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	97,5	103,6	101
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	117,7	104,6	111
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	87,8	91,4	90

Estos resultados muestran que la cepa CNCM I-3690 inhibe fuertemente la respuesta inflamatoria de las células epiteliales HT-29. Entre las otras cepas ensayadas, sólo la cepa HN001 posee propiedades anti-inflamatorias comparables.

10

3- Supervivencia al estrés gástrico e intestinal

Se utilizó un modelo *in vitro* que reflejaba las condiciones del estrés gástrico e intestinal.

Se realizaron cultivos de bacterias lácticas en leche complementada con extracto de levadura. Los cultivos se incubaron durante 24 a 48 horas, según las especies (hasta la fase estacionaria de cultivo).

- 5 **Estrés intestinal:** Se preparó un jugo intestinal artificial compuesto de sales biliares de cerdo (3,3 g/L) y tampón de hidrogenocarbonato NaHCO_3 (16,5 g/L). El pH se ajustó a 6,3. Se añadió 1 mL de este jugo intestinal a 100 μL de cultivo bacteriano. A continuación se incubaron los cultivos durante 5 horas. A continuación, se evaluaron sobre placas las poblaciones bacterianas antes y después del estrés.

- 10 **Estrés gástrico:** Se preparó un jugo gástrico artificial. Estaba compuesto de ácido láctico (9 g/L), pepsina (3,5 g/L) y NaCl (2,2 g/L). El pH se ajustó a 3,1. Se añadió 1 mL de este jugo artificial a 100 μL de cultivo bacteriano. Los cultivos se incubaron durante diferentes tiempos: 10 minutos, 30 minutos y 60 minutos. Se evaluaron en las placas las poblaciones bacterianas.

Los valores se expresaron de la siguiente manera:

- 15 Estrés gástrico = valor medio $[\log(\text{UFC}_{10\text{min}}/\text{UFC}_0) \text{ y } \log(\text{UFC}_{30\text{min}}/\text{UFC}_0)] * 10 + \text{valor medio } [\log(\text{UFC}_{60\text{min}}/\text{UFC}_0) \text{ y } \log(\text{UFC}_{30\text{min}}/\text{UFC}_0)] * 30$.

Estrés intestinal = $\log(\text{UFC}_{5\text{h}}/\text{UFC}_0\text{h})$

siendo $\text{UFC}_{X\text{min}}$ la concentración de bacterias expresada en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) después de X minutos de incubación.

- 20 Para el estrés gástrico, la supervivencia es buena cuando el valor es superior a -50, medianamente buena cuando el valor está comprendido entre -50 y -100 y mala cuando el valor es inferior a -100.

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.

Los resultados se dan en la Tabla IV siguiente.

Tabla IV

Género	Especie	Referencia	Estrés intestinal	Estrés gástrico
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 o CNCM I-3690	0,31	-31,9
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC55544	0,04	-47,4
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	-0,07	-44,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	-0,79	-68,5
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	-1,50	-139,2
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	0,00	-86,3
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533 = La1 = I-1225	0,69	20,3
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	-1,04	-29,7
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	-0,23	43,3
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	-1,45	-63,0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	0,07	-70,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	1,00	-4,6

Género	Especie	Referencia	Estrés intestinal	Estrés gástrico
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	-1,12	-438,7
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	3,40	114,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	-1,91	-80,0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	2,79	-412,9
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	-0,91	-333,8
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	-0,14	-370,2
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	-0,22	-319,2

Los resultados ilustrados en las Tablas II, III y IV anteriores muestran que, entre las diferentes cepas ensayadas, la cepa CNCM I-3690 es la única que presenta a la vez propiedades antimicrobianas y propiedades anti-inflamatorias importantes, acompañadas además de muy buenas propiedades de resistencia al estrés gástrico y al intestinal.

- 5 Para ilustrar la superioridad de esta cepa, se sumaron las diferentes puntuaciones obtenidas por esta cepa en el plano antimicrobiano y se obtuvo la media entre los resultados obtenidos por esta cepa en el plano de la inmunomodulación. La Figura 1 muestra hasta qué punto esta cepa se diferencia en comparación con las otras cepas ensayadas.

Ejemplo 2: Propiedades de adherencia a la manosa de la cepa CNCM I-3690

- 10 La capacidad de la cepa CNCM I-3690 para adherirse específicamente a la manosa se determinó por medio de un ensayo de aglutinación. Este ensayo se basa en la presencia de polisacáridos que contienen manosa en la superficie de las células de *Saccharomyces cerevisiae*. Cuando estas bacterias que se adhieren a la manosa se ponen en contacto con *S. cerevisiae*, se produce un fenómeno de aglutinación, visible al microscopio.

- 15 Este modelo permite evaluar las propiedades anti-infecciosas potenciales de una bacteria que resultan de su capacidad para competir con los agentes patógenos en la adherencia a la mucosa intestinal.

Las cepas *L. plantarum* 229v y *L. plantarum* WCFS1, conocidas por su alta capacidad de adherencia a la manosa, se utilizaron como controles positivos.

- 20 Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en medio MRS, a una temperatura de 37°C. El desarrollo de las bacterias se detuvo en la fase estacionaria y las bacterias se lavaron a continuación y se ajustó su concentración. El cultivo de *S. cerevisiae* se realizó en el medio «extracto de malta» (Oxoid).

A continuación se mezcló un volumen de 5 µL de suspensión bacteriana con PBS o metil-α-D-manopiranosido (concentración final: 25 mM). Luego se añadieron 100 µL de una preparación al 1% de células de *S. cerevisiae*. La mezcla se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se examinó al microscopio y se les asignaron puntuaciones, utilizando la siguiente anotación:

- 25 Puntuación 0 = sin aglutinación
Puntuación 1 = aglutinación débil
Puntuación 3 = aglutinación fuerte
Puntuación 5 = aglutinación muy fuerte.

El experimento se realizó tres veces independientemente para cada cepa.

- 30 Los resultados se recogen en la Tabla V siguiente.

Tabla V

Género	Especie	Referencia	Puntuación de manosa
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 o CNCM I-3690	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC55544	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533 = La1 = I-1225	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	0

Se observa que el porcentaje de células de *S. cerevisiae* aglutinadas por la cepa CNCM I-3690 es comparable con el porcentaje de células de *S. cerevisiae* aglutinadas por las cepas *L. plantarum* 229v y *L. plantarum* WCFS1.

5 Ejemplo 3: Desarrollo en leche de la cepa CNCM I-3690

Se analizaron las propiedades de desarrollo en leche de la cepa CNCM I-3690 utilizando el siguiente protocolo:

En un medio constituido por leche desnatada, reconstituida con agua añadida a la leche desnatada en polvo, se sembró la cepa CNCM I-3690, en proporciones que variaban entre $5,5 \times 10^6$ UFC/g y $3,3 \times 10^7$ UFC/g.

10 La actividad de fermentación de la cepa, asociada a su desarrollo, se midió controlando continuamente el pH del medio de desarrollo.

Los resultados se ilustran en la Figura 2.

Estos resultados muestran que la cepa CNCM I-3690 es capaz de desarrollarse eficazmente en leche y por lo tanto que puede utilizarse en la fabricación de productos lácteos fermentados.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que posee propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras y de adherencia específica a la manosa, depositada en la CNCM con el número I-3690.
- 5 2. Procedimiento de obtención de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, caracterizado por que comprende la mutagénesis o la transformación genética de la cepa CNCM I-3690.
3. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, caracterizada por que es susceptible de ser obtenida por el procedimiento según la reivindicación 2 y por que posee las propiedades antimicrobianas y las propiedades inmunomoduladoras de la cepa CNCM I-3690.
- 10 4. Composición que comprende una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3.
5. Composición según la reivindicación 4, caracterizada por que se trata de un producto alimenticio.
6. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, para la utilización como medicamento.
- 15 7. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* para la utilización como medicamento según la reivindicación 6, caracterizada por que dicho medicamento está destinado al tratamiento de una infección microbiana.
8. Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* para la utilización como medicamento según la reivindicación 6, caracterizada por que dicho medicamento es anti-inflamatorio.
- 20 9. Procedimiento de obtención de una fracción celular que posee propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras, caracterizado por que dicha fracción se obtiene a partir de un cultivo de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que dicha fracción celular se elige entre:
 - una preparación de ADN o una preparación de paredes bacterianas;
 - un líquido sobrenadante de cultivo o una fracción de dicho líquido sobrenadante.
- 25 11. Procedimiento de obtención de una composición que posee propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras, caracterizado por que comprende la obtención de una fracción celular por un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, y la incorporación de dicha fracción en dicha composición.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizada por que dicha composición es un producto alimenticio.

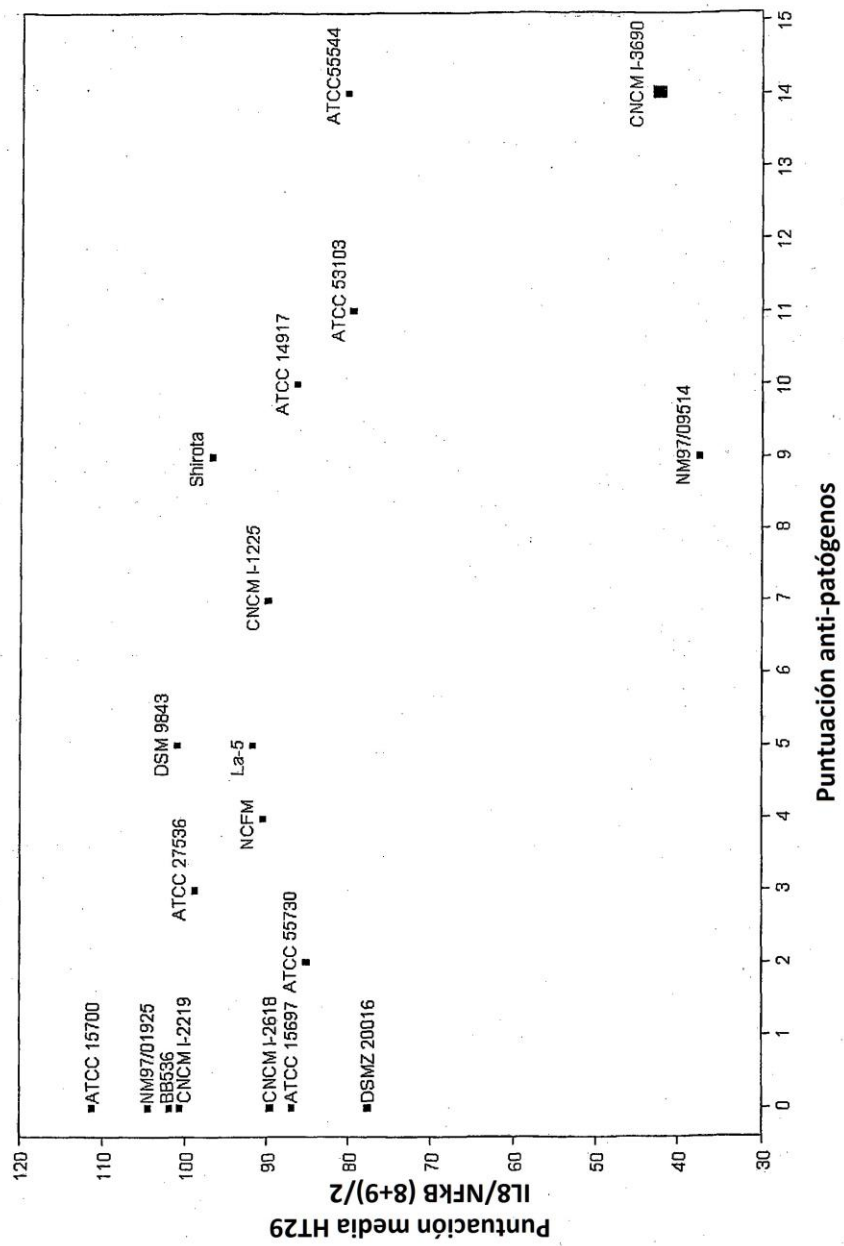


FIGURA 1

CNCM I-3690 en leche desnatada reconstituida

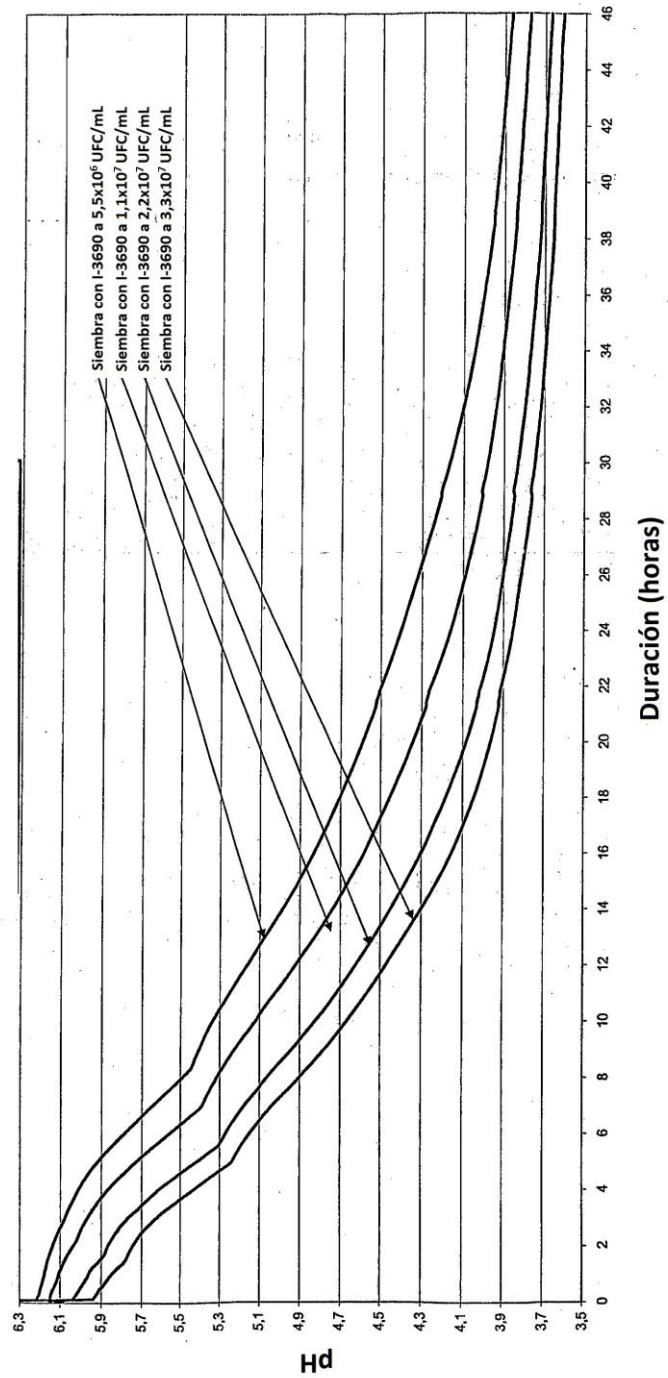


FIGURA 2