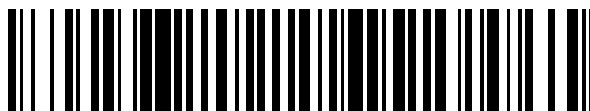


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 260**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
C12P 7/56 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2012 PCT/EP2012/055673**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12130966**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012 E 12713934 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2697371**

54 Título: **Cepa CNCM I-4437 de Lactobacillus johnsonii deficiente en producción de ácido D-láctico y con un tiempo de almacenamiento mejorado**

30 Prioridad:

29.03.2011 EP 11160140

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

20.02.2017

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**PRIDMORE, RAYMOND-DAVID;
FOATA, FRANCIS;
DELLEY, MICHÈLE y
JANKOVIC, IVANA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 602 260 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 CNCM I-4437 de *Lactobacillus johnsonii* deficiente en producción de ácido D-láctico y con un tiempo de almacenamiento mejorado

5 La presente invención se refiere en general al campo de las bacterias probióticas. En particular la presente invención se refiere a derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* con mejores propiedades. Por ejemplo, la presente invención se refiere a un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que es deficiente en producción de ácido D-láctico y muestra una mejor viabilidad cuando está expuesta al oxígeno.

10 El *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225, también conocido como *Lactobacillus johnsonii* NCC533, *Lactobacillus acidophilus* La1, o *Lactobacillus johnsonii* Ljl, - un aislado humano (Bernet-Camard, M. F. y otros, (1997) Appl. Environ. Microbiol. 63, 2747-2753) - es un probiótico comercializado actualmente con mucho éxito bajo la marca Lc1.

15 Como es típico de los productos que contienen bacterias probióticas viables, un reto en la producción de dichos productos es el de asegurar que las bacterias sigan siendo viables durante el tiempo de almacenamiento, ya que estos microorganismos son sensibles a la exposición al oxígeno. Por tanto sería deseable disponer de un derivado de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 con mayor resistencia al oxígeno.

20 El *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 tiene varios efectos beneficiosos para la salud bien documentados, entre ellos, por ejemplo, actividades inmunomoduladoras (Haller, D. y otros, 2000, Infect. Immun. 68:752-759; Haller, D. y otros, 2000, Gut 47:79-87; o Ibnou-Zekri, N. y otros, 2003, Infect. Immun. 71:428-436), o inhibición de patógenos (Bernet, M. F. y otros, 1994, Gut, 35:483-489) y una larga historia de uso seguro.

25 Un aspecto que ha limitado el uso del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 en algunos tipos de productos, p.ej. en productos dirigidos a bebés y niños pequeños, es la producción predominante del isómero ácido D-láctico a partir de la fermentación de azúcares. El *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 se cultiva por ejemplo en medio MRS y fermenta la lactosa a ácido D- y L-láctico en una proporción del 60:40%

30 La directiva CODEX de fórmulas infantiles recomienda que los niños menores de tres años de edad no consuman ácido D-láctico ni bacterias productoras de ácido D-láctico debido a su limitada capacidad de eliminación de ácido D-láctico, que podría causar acidosis por D-lactato.

35 La prueba que corrobora esta conclusión se basa principalmente en la presencia de ácido D-láctico en los alimentos y no en la administración de bacterias productoras de ácido D-láctico, las cuales son residentes naturales del tracto gastrointestinal.

40 Consecuentemente varias publicaciones han cuestionado esta posición (Connolly, E. y otros, NTRAFoods 3(3), 37-49. 2004; Haschke-Becher, E. y otros, 2008, Ann. Nutr. Metab. 53:240-244, Mack, D. R., 2004, Can. J. Gastroenterol. 18:671-675), pero la recomendación de la directiva CODEX de fórmulas infantiles no ha variado hasta la fecha.

45 Esencialmente la directiva CODEX ha excluido los probióticos productores de ácido D-láctico como suplementos en las fórmulas infantiles, pero ha estimulado la ingeniería genética de cepas que produzcan solo ácido L-láctico. Un ejemplo de este desarrollo es la generación de un organismo modificado genéticamente (OMG), en concreto de una cepa de *Lactobacillus johnsonii* modificada genéticamente, aislando el gen (*ldhD*) de D-lactato deshidrogenasa (*D-LDH*) y usando una copia clonada del gen truncado *in vitro* para inactivar la copia genómica por sustitución del gen (Lapierre, L. y otros, 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65:4002-4007).

50 Esta cepa modificada genéticamente solo fue producida para trabajos de laboratorio y nunca se ha empleado en productos alimenticios, pues su material genético ha sido alterado mediante técnicas de ADN recombinante y por lo tanto la cepa se considera un OMG.

55 No obstante sería conveniente tener la posibilidad de que los numerosos beneficios saludables de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* también fueran accesibles para aquellas personas a las cuales no se recomienda actualmente el consumo de ácido D-láctico o de bacterias productoras de ácido D-láctico.

60 Por consiguiente en este campo hay una gran necesidad de una cepa probiótica natural, en particular de un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que sea deficiente en producción de ácido D-láctico y sin embargo viable, y que se conserve mejor en los productos.

Los presentes inventores han abordado estas necesidades.

65 Así, la presente invención tenía por objeto aportar al sector un derivado de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que también se pudiera utilizar en los productos dirigidos a bebés y niños pequeños, respetando al mismo tiempo las normas de la directiva CODEX de fórmulas infantiles, que tuviera mejor estabilidad al almacenamiento, que fuera natural y no se considerara un OMG.

Los presentes inventores se sorprendieron al ver que podían lograr el objetivo de la presente invención conforme al contenido de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes desarrollan con más detalle la idea de la presente invención.

5 Los presentes inventores han investigado la posibilidad de aislar una variante natural (no OMG), viable y estable genéticamente de *Lactobacillus johnsonii* La1, que produzca solo ácido L-láctico y que tenga una mejor estabilidad al almacenamiento.

10 Los cambios en la secuencia genómica tienen lugar de manera natural, p.ej. debido a una mala reparación del ADN dañado o a errores en la replicación del ADN, con una frecuencia relativamente baja.

15 Para buscar tales derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* los presentes inventores han rastreado aproximadamente 21.000 colonias de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 y han identificado una variante natural deficiente en ácido D-láctico que alcanza el objetivo de la presente invención.

Los presentes inventores han determinado también las concentraciones de ácido D- y L-láctico en el sobrenadante del cultivo en medio MRS y han demostrado que la concentración relativa de ácido D-láctico comparada con la concentración total de ácido láctico en el sobrenadante del cultivo es inferior al 1,5%, en concreto de un 1,1%.

20 Un análisis de la secuencia de ADN identificó predominantemente mutaciones puntuales en el gen de lactato deshidrogenasa tras la secuencia de aminoácidos del enzima y por lo tanto sus propiedades catalíticas.

25 Se encontró que el derivado natural era viable y estable, sin ningún ejemplo de reversión de la producción de ácido D-láctico.

Los presentes inventores también han valorado la estabilidad al almacenamiento a 8°C y a 15°C y han comparado el derivado identificado con la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii*. El derivado identificado mostró un mejor tiempo de almacenamiento en comparación con la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii*. Los presentes inventores también han comparado la estabilidad al almacenamiento de esta cepa con otros derivados de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y han encontrado que este derivado natural registraba el mejor tiempo de almacenamiento.

35 Por consiguiente una forma de ejecución de la presente invención es un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que es deficiente en la producción de ácido D-láctico y presenta un mayor tiempo de almacenamiento en comparación con la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii*.

40 Según el leal saber y entender de los presentes inventores esta es la primera vez que se ofrece un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que sea deficiente en producción de ácido D-láctico y tenga un mayor tiempo de almacenamiento en comparación con la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii*.

45 Para los fines de la presente invención "deficiente en producción de ácido D-láctico" significa que una cepa produce menos del 5%, preferiblemente menos del 2%, con mayor preferencia menos del 1,5% e idealmente de un 1,1% de ácido D-láctico en comparación con la producción total de ácido láctico. Las concentraciones de ácido D- y L-láctico se pueden medir en el sobrenadante del cultivo libre de células.

50 La cantidad total de ácido láctico producido por los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* está relacionada inicialmente con el crecimiento celular. Cuando las células entran en la fase estacionaria y paran de dividirse, continúan metabolizando azúcar y produciendo más ácido láctico. No obstante se encontró que la relación de ácido D- y L-láctico producido era constante.

55 Derivado "natural" de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* se refiere a una cepa que no está considerada como OMG. Un derivado natural de tal tipo se puede obtener, por ejemplo, rastreando colonias sometidas a cambios en la secuencia genómica que tienen lugar de forma natural, p.ej. debido a una mala reparación del ADN dañado o a errores en la replicación del ADN. Esta incidencia natural de errores se puede intensificar sometiendo las colonias a condiciones estresantes, por ejemplo mediante la aplicación de etil-metansulfonato, EMS.

60 Para los fines de la presente invención el término "OGM" se define conforme a la DIRECTIVA 2001/18/EC DEL PARLAMENTO Y DEL CONSEJO EUROPEO, de 12 de marzo de 2001, sobre la liberación deliberada al medio ambiente de organismos genéticamente modificados, que revoca la directiva 90/220/EEC del Consejo. Por lo tanto, un "organismo genéticamente modificado (OGM)" es, con excepción de los seres humanos, aquel cuyo material genético ha sido alterado de una forma no sucedida naturalmente por cruce y/o recombinación natural.

Conforme a esta definición la modificación genética ocurre al menos mediante el uso de

65 (1) técnicas de ácido nucleico recombinante que implican la formación de nuevas combinaciones de material genético mediante la inserción en cualquier plásmido viral, bacteriano, o en otro sistema vector, de moléculas de

ácido nucleico producidas por cualquier medio externo a un organismo, y su incorporación a un organismo huésped en el cual no existen naturalmente pero se pueden seguir propagando;

(2) técnicas que implican la introducción directa en un organismo de material heredable preparada fuera del organismo, incluyendo micro-inyección, macroinyección y microencapsulación; o

5 (3) técnicas de fusión celular (incluyendo fusión protoplástica) o de hibridación con las cuales se forman células vivas con nuevas combinaciones de material genético heredable, mediante la fusión de dos o más células por métodos que no suceden de manera natural.

10 Una cepa se considera un "derivado" de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* si tiene una identidad de ácidos nucleicos de al menos el 99,95%, por ejemplo de al menos el 99,99%, preferiblemente al menos el 99,995%. Por ejemplo, una cepa se considera un derivado de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* si no tiene más de 500, por ejemplo no más de 100, preferiblemente no más de 50 cambios de ácido nucleico en comparación con la secuencia de ácidos nucleicos del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225.

15 Se considera que una cepa bacteriana "tiene mayor tiempo de almacenamiento en comparación con la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii*" si presenta una mayor supervivencia en el producto Lc1 Drink después de 45 días de almacenamiento a 8°C y/o a 15°C. El uso de los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* de la presente invención en un producto dará lugar por tanto a un número superior de bacterias viables al final del tiempo de almacenamiento.

20 Los presentes inventores han encontrado que los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* según la presente invención presentan mutaciones en el gen *d-lidh* responsable del fenotipo de deficiencia en ácido láctico.

25 Por consiguiente los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* pueden tener una secuencia alterada del enzima D-lactato deshidrogenasa. Por ejemplo, el derivado natural de a cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* puede tener un cambio del aminoácido arginina a histidina en la posición del aminoácido 77 de la secuencia del enzima D-lactato deshidrogenasa.

30 Por lo visto este cambio altera significativamente la función enzimática de la D-lactato deshidrogenasa, de manera que no produce ácido D-láctico o solo en cantidad ínfima.

Este cambio en la secuencia proteica del enzima D-lactato deshidrogenasa se basa en un cambio en la secuencia de ácidos nucleicos del gen de D-lactato deshidrogenasa.

35 Cualquier cambio natural en la secuencia de ácidos nucleicos del gen de D-lactato deshidrogenasa que inactive el enzima resultante puede ser objeto de la presente invención. Igualmente, al menos una delección de uno o más nucleótidos subsiguientes en la secuencia natural, o en una parte o en todo el gen de D-lactato deshidrogenasa, puede ser objeto de la presente invención.

40 Los presentes inventores han analizado la secuencia de ácidos nucleicos del gen de D-lactato deshidrogenasa en el derivado natural de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 de la presente invención.

45 Por tanto la presente invención también se refiere a un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* en el cual la secuencia de ácidos nucleicos del gen de D-lactato deshidrogenasa en el derivado natural de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 comprende una transición de G a A en la posición del aminoácido 270.

50 Aunque este cambio que produce la inactivación de la D-lactato deshidrogenasa tenga lugar espontáneamente en la naturaleza con poca frecuencia, es aleatorio y se puede reparar con la misma frecuencia volviendo a la secuencia original.

55 Esta frecuencia de reparación puede ser aún mayor si el gen inactivado imparte una desventaja de crecimiento a la variante. Dado el gran número de generaciones que hay desde la recolección del cultivo hasta el producto final, es importante que dicho cambio sea estable, sobre todo porque se trata de un solo cambio de pares de bases, que es menos estable genéticamente que una delección.

Se encontró ventajosamente que el cambio también era estable.

60 Se aisló, se purificó y se caracterizó detalladamente un ejemplo de un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que cumple el objetivo de la presente invención.

Por tanto la presente invención se refiere a un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que puede ser *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437.

El *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 fue depositado el 8 de febrero de 2001 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) [Colección nacional de cultivos de microorganismos], Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15, Francia, conforme al tratado de Budapest.

5 La cepa fue completamente secuenciada.

El *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 fue depositado el 30 de junio de 1992 en la CNCM, conforme al tratado de Budapest.

10 El *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 contiene un total de 23 cambios, incluyendo el cambio esperado en el gen de D-lactato deshidrogenasa responsable de la deficiencia en la producción de ácido D-láctico por esta cepa. Hay cambios en dos genes cuya función está pronosticada como importante para el crecimiento, en concreto el LJ0874 - triosa fosfato isomerasa y el LJ0515 - fosfometilpirimidina cinasa. En el medio MRS el *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 crece a una velocidad comparable al La1, por tanto los cambios arriba citados no muestran ningún efecto
15 adverso. Cabe destacar el cambio secundario en el LJ1658 – un enzima histidina cinasa de un regulador de dos componentes. El perfilado preliminar de la expresión de esta cepa revela la regulación a la baja de cinco genes, LJ1652 a LJ1656, los cuales constituyen un operón PTS que probablemente es específico de manosa. Esto no produce ningún cambio en los patrones de fermentación de azúcares en comparación con el La1, pero puede ser debido a la presencia de varios sistemas PTS-manosa pronosticados en el La1.

20 La presente invención también se extiende a los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* conforme a la presente invención, donde el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* se encuentra como cultivo biológicamente puro.

25 Los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* conforme a la presente invención se pueden cultivar según cualquier método adecuado y se pueden preparar para añadirlos a las composiciones de la presente invención, por ejemplo mediante liofilización o secado por pulverización.

30 La cepa probiótica *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 proporciona numerosos beneficios bien documentados para la salud, algunos de los cuales se han detallado arriba.

35 “Probiótico” se refiere a preparaciones celulares microbianas o componentes de células microbianas que tienen un efecto beneficioso para la salud o el bienestar del huésped Salminen S, y otros “Probiotics: how should they be defined [*Probióticos: cómo deben definirse*]” Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-10).

Los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* conforme a la presente invención se pueden considerar básicamente como bioequivalentes en vista de los beneficios saludables aportados.

40 Los trabajos científicos han demostrado que el sobrenadante libre de células aislado de un cultivo biológicamente puro de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* también tiene varios beneficios para la salud (véase p.ej. Bernet-Camard, M.-F. y otros, 1997, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 2747-2753).

45 Por consiguiente la presente invención se extiende además al sobrenadante libre de células aislado de un cultivo biológicamente puro de un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* según la presente invención.

50 Como el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y el sobrenadante de cultivo libre de células de la presente invención tienen numerosos beneficios para la salud, se pueden usar para tratar o prevenir trastornos en el cuerpo humano o animal.

55 Por consiguiente la presente invención se refiere a una composición que comprende el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o el sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención, para emplearla en la preparación de una composición destinada a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.

La presente invención también se refiere al uso de una composición que comprende el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o el sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención, para emplearla en la preparación de una composición farmacéutica o de un medicamento.

60 El *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 ha sido estudiado extensamente por sus actividades de tipo probiótico, incluyendo la inmunomodulación (Haller, D. y otros, 2000, Infect. Immun. 68, 752-759; Haller, D. y otros, 2000, Gut 47, 79-87; Ibnou-Zekri, N. y otros, 2003, Infect. Immun. 71, 428-436), pathogen inhibition (Bernet, M. F. y otros, 1994, Gut 35, 483-489) y la adherencia a las células epiteliales (Neeser, J. R. y otros, 2000, Glycobiology 10, 1193-1199; Granato, D. y otros, 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65, 1071-1077).

65

Gracias a la bioequivalencia, los derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o su sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención aportan los mismo beneficios para la salud.

5 Por consiguiente la presente invención se refiere a una composición que comprende el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o el sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención, para emplearla en el tratamiento o prevención de trastornos relacionados con un sistema inmunitario debilitado.

10 La presente invención también se refiere al uso del derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o del sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención para preparar una composición destinada al tratamiento o prevención de los trastornos relacionados con un sistema inmunitario debilitado.

15 Los trastornos relacionados con un sistema inmunitario debilitado son bien conocidos en el sector y las personas experimentadas en esta especialidad entenderán cuáles son los trastornos relacionados con un sistema inmunitario debilitado.

Se pueden seleccionar ejemplos típicos de trastornos relacionados con un sistema inmunitario debilitado en el grupo formado por gripe, rinitis, resfriado común y sus combinaciones.

20 La composición que comprende el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o el sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención también se puede usar para el tratamiento o prevención de los trastornos relacionados con la adherencia a las células epiteliales y la invasión de las células por bacterias o virus enterovirulentos.

25 La presente invención también se extiende al uso del derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o del sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención para preparar una composición destinada al tratamiento o prevención de los trastornos relacionados con la adherencia a las células epiteliales y la invasión de las células por bacterias o virus enterovirulentos.

30 Las bacterias y virus enterovirulentos son bien conocidos en el sector. La EFSA (Autoridad europea de seguridad alimentaria) ha publicado en noviembre de 2010 una lista de patógenos.

35 Las bacterias y virus enterovirulentos se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo constituido por *Salmonella*; *Campylobacter*; *Listeria*; cepas de *Escherichia coli* tales como ETEC, EHEC, EPEC o EIEC, por ejemplo; *Yersinia*; *Shigella*; bacterias productoras de toxinas tales como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* o *Bacillus cereus*; *Vibrio vulnificus*/*parahaemolyticus*; rotavirus; norovirus; *E. coli* verotoxigénica; *Enterobactersakazakii*; *C. perfringens toxigénico* (de tipo A y B); parásitos alimentarios tales como *Echinococcus*, *Toxoplasma* o *Giardia*; *Helicobacter pylori*; *Clostridium difficile*; *Clostridium tetani*; o sus combinaciones.

40 Para los expertos en la materia es evidente qué trastornos están relacionados con las bacterias enterovirulentas o con las especies virales.

45 Por ejemplo, el trastorno relacionado con la adherencia a las células y con la invasión de las células por bacterias enterovirulentas o especies virales se pueden seleccionar del grupo formado por infecciones del tracto respiratorio inferior, del tracto gastrointestinal, otitis media y combinaciones de ellos.

La composición de la presente invención puede ser de cualquier tipo que sea apropiado para ser administrada a humanos o animales.

50 En particular la composición de la presente invención se puede administrar por vía oral, enteral, parenteral o tópica. Las composiciones se pueden suministrar en cualquier forma galénica disponible normalmente para el modo de administración elegido.

55 La composición de la presente invención se puede administrar a cualquier grupo de edad.

La composición de la presente invención debe administrarse preferiblemente durante la estación fría, p.ej. desde el otoño hasta la primavera.

60 También se puede consumir en cualquier momento. Puede ser preferible consumir la composición de la presente invención por la mañana, a fin p.ej. de estimular el sistema inmunitario para todo el día.

65 La composición puede seleccionarse p.ej. del grupo formado por composiciones alimenticias, composiciones de comida para mascotas, bebidas, productos lácteos, fórmulas nutricionales, fórmulas infantiles, aditivos alimentarios, productos nutraceuticos, composiciones farmacéuticas, ingredientes alimentarios y/o composiciones cosméticas.

Por ejemplo, la composición se puede seleccionar del grupo formado por productos lácteos acidificados tales como yogures o bebidas de yogur, o productos lácteos en polvo.

Para los productos en polvo, especialmente, puede ser preferible suministrar la composición en forma de un polvo estable al almacenamiento. Para tener estabilidad al almacenamiento y asegurar la viabilidad los probióticos, la composición se puede preparar con una actividad acuosa inferior a 0,2, por ejemplo en el intervalo de 0,19-0,05, preferiblemente inferior a 0,15. La actividad acuosa o a_w es una medición del estado energético del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor del agua procedente del polvo/producto dividida por la del agua pura a la misma temperatura; por lo tanto el agua pura destilada tiene una actividad acuosa exactamente igual a uno.

Las composiciones de la presente invención pueden ser cremas limpiadoras, protectoras, de tratamiento o cuidado; lociones, geles o espumas para el cuidado de la piel, como por ejemplo las lociones limpiadoras o desinfectantes; composiciones para baño o desodorantes.

Por lo que respecta más concretamente a los productos de administración tópica externa, las composiciones pueden ser soluciones acuosas, hidroalcohólicas u oleosas, soluciones o dispersiones tipo loción o suero, emulsiones de consistencia líquida o semilíquida, de tipo lácteo, obtenidas por dispersión de una fase lipídica en una fase acuosa (O/W) o viceversa (W/O), o suspensiones o emulsiones de consistencia blanda, semisólida o sólida, cremosas, geles acuosos o anhidros, microemulsiones, microcápsulas, micropartículas o dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico.

Una composición tópica conforme a la presente invención se puede formular ventajosamente en cualquier forma galénica que sea adecuada para el cuidado del cabello, especialmente en forma de una loción, de un champú, sobre todo un champú anticaspa, de un acondicionador del cabello, de un desenredante del cabello, de una crema o gel para el cabello, de una laca de peluquería, de una loción fijadora del cabello, de una tratante, de una composición de tinte (especialmente de teñido por oxidación), opcionalmente en forma de un champú colorante, de una loción para reestructurar el cabello, de una composición para la ondulación permanente, de una loción o gel para combatir la pérdida del cabello, de un champú antiparasitario o de un champú medicado, sobre todo un champú antiseborreico, de un producto para el cuidado del cuero cabelludo que sea especialmente anti-irritante, anti-envejecimiento o reestructurador, o que active la circulación sanguínea.

Si la composición de la presente invención es una emulsión, la proporción de fase lipídica puede variar del 5% hasta el 80% en peso y preferiblemente del 10% al 50% en peso respecto al peso total de la composición. Los aceites, los emulsionantes y los coemulsionantes usados en la composición en forma de emulsión se eligen entre los empleados corrientemente en el campo cosmético y dermatológico. El contenido de emulsionante y de coemulsionante en la composición puede estar comprendido en una proporción del 0,3% hasta el 30% en peso respecto al peso total de la composición.

Si la composición de la presente invención es un gel o solución oleosa, la fase lipídica puede representar más del 90% del peso total de la composición.

Las formas galénicas para la administración tópica también pueden contener adyuvantes habituales en el campo cosmético, farmacéutico y/o dermatológico, tales como agentes gelificantes hidrófilos o lipófilos, agentes activos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, fragancias, cargas, filtros, absorbentes de olores y colorantes. Las proporciones de estos diversos adyuvantes son las utilizadas normalmente en el sector, por ejemplo del 0,01% hasta el 20% del peso total de la composición. Estos adyuvantes se pueden introducir en la fase lipídica y/o en la fase acuosa, dependiendo de su naturaleza.

Como sustancias grasas utilizables en la presente invención pueden mencionarse aceites minerales tales como, por ejemplo, el poliisobuteno hidrogenado y la vaselina; aceites vegetales tales como, por ejemplo, una fracción líquida de la manteca de shea, el aceite de girasol y el aceite de semilla de albaricoque; aceites animales tales como, por ejemplo, el perhidroescualeno; aceites sintéticos, en particular el aceite de purcelina, el miristato de isopropilo y el palmitato de etilhexilo; ácidos grasos insaturados y aceites fluorados tales como, por ejemplo, los perfluoropoliéteres. También se pueden usar alcoholes grasos, ácidos grasos tales como, por ejemplo, el ácido esteárico y como, por ejemplo, las ceras, en particular cera de parafina, cera de carnaúba y cera de abejas. Asimismo se pueden emplear compuestos de silicona, tales como los aceites de silicona, por ejemplo ciclometicona y dimeticona, y ceras, resinas y gomas de silicona.

Como emulsionantes utilizables en la presente invención pueden mencionarse, por ejemplo, el estearato de glicerilo, el polisorbato 60, la mezcla de alcohol cetilestearílico/alcohol cetilestearílico oxietilenado que lleva 33 moles de óxido de etileno, comercializado por la compañía Henkel bajo la marca Sinnowax AO[®], la mezcla de PEG-6/PEG-32/estearato de glicol que vende la compañía Gattefosse con la marca Tefose[®] 63, el PPG-3 miristil éter, emulsionantes de silicona tales como el copoliol cetil dimeticona y el monostearato o tristearato de sorbitán, el PEG-40 estearato o el monostearato de sorbitán oxietilenado (20 EO).

Como disolventes utilizables en la presente invención se pueden mencionar los alcoholes inferiores, sobre todo el etanol y el isopropanol, y el propilenglicol.

5 La composición de la presente invención también puede contener ventajosamente un agua de manantial y/o mineral, elegida concretamente entre el agua de Vittel, las aguas de la cuenca de Vichy y el agua de la Roche Posay.

10 Como agentes gelificantes hidrófilos se pueden citar polímeros carboxílicos tales como los carbomer, copolímeros acrílicos tales como los de acrilato/acrilato de alquilo, poliacrilamidas y en particular la mezcla de poliacrilamida, isoparafina C13-14 y Laureth-7 comercializada con la marca Sepigel 305[®] por la compañía SEPPIC, polisacáridos, por ejemplo derivados tales como las hidroxialquilcelulosas y en particular hidroxipropilcelulosa e hidroxietilcelulosa, gomas naturales como la goma guar, la goma de algarrobo, la goma garrofín y xantana, y arcillas.

15 Como agentes gelificantes lipófilos se pueden citar arcillas modificadas tales como las bentonas, sales metálicas de ácidos grasos como los estearatos de aluminio y sílice hidrófoba, o también etilcelulosa y polietileno.

Las composiciones según la presente invención también pueden ser preparaciones sólidas en forma de jabones o barras de limpieza.

20 También se pueden usar para el cuero cabelludo en forma de soluciones, cremas, geles, emulsiones o espumas, o alternativamente en forma de composiciones de aerosol, que además contienen un propelente presurizado.

Para la administración oral conforme a la presente invención se prefiere el uso de un soporte o vehículo ingerible. El soporte o vehículo ingerible puede ser de distinta naturaleza, dependiendo del tipo de composición considerada.

25 La leche, el yogur, las leches fermentadas, los productos lácteos fermentados, los helados, los productos basados en cereales o cereales fermentados, los cereales para el desayuno, las barras de cereales o granola, los productos lácteos en polvo, las fórmulas infantiles y para bebés, los productos alimenticios de repostería, chocolate o cereales, la comida de animales, en particular para animales domésticos, las tabletas, las cápsulas de gelatina o las pastillas masticables, las suspensiones bacterianas líquidas, los suplementos orales en forma seca y en forma líquida son especialmente adecuados para usar como soporte o vehículo ingerible.

30 La composición de administración oral conforme a la presente invención se puede formular por ejemplo en forma de tabletas recubiertas, cápsulas de gelatina, geles, emulsiones, tabletas, cápsulas, hidrogeles, barras alimenticias, polvos compactos o sueltos, suspensiones o soluciones líquidas, productos de repostería, leches fermentadas, quesos fermentados, chicles, pasta dentífrica, soluciones atomizables o vehículos alimentarios.

Las tabletas o pastillas masticables, los suplementos orales en forma seca y en forma líquida son adecuados para usar como soportes o vehículos farmacéuticos o alimentarios.

40 La composición puede ser, por ejemplo, un suplemento alimenticio que se puede formular mediante los procesos habituales para producir en particular tabletas recubiertas de azúcar, cápsulas de gelatina, geles, emulsiones, tabletas, cápsulas e hidrogeles que permitan una liberación controlada.

45 En particular, un microorganismo de acuerdo con la presente invención se puede incorporar a todas las formas de suplementos o productos alimenticios enriquecidos, por ejemplo barras alimenticias o polvos compactos o sueltos. Los polvos se pueden diluir en agua, soda, productos lácteos o derivados de soja, o se pueden incorporar a barras alimenticias.

50 Asimismo un microorganismo de la presente invención o una fracción y/o metabolito del mismo se puede formular con los excipientes y componentes usuales para tales composiciones orales o suplementos alimenticios, es decir, en concreto, componentes lípidos y/o acuosos, humectantes, espesantes, conservantes, agentes texturizantes, agentes saborizantes y/o de recubrimiento, antioxidantes y colorantes habituales en el sector alimentario.

55 Los agentes y excipientes para formulaciones orales y en particular para los suplementos alimenticios son conocidos en este campo y no serán aquí objeto de una descripción detallada.

60 En las aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran en una cantidad suficiente para curar al menos parcialmente o detener los síntomas de una enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograrlo se define como una "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este fin dependen de varios factores conocidos de los especialistas en la materia, como la gravedad de la enfermedad y el peso y estado general del paciente.

65 En las aplicaciones profilácticas las composiciones según la presente invención se administran a un paciente con predisposición o riesgo de contraer una determinada enfermedad, en una cantidad suficiente para reducir al menos parcialmente el riesgo de desarrollar la enfermedad. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente

efectiva". De nuevo las cantidades necesarias dependen de varios factores específicos del paciente, tales como su estado de salud y peso.

5 Las composiciones de la presente invención comprenden al menos un derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* y/o del sobrenadante de cultivo libre de células según la presente invención en una dosis terapéutica o profilácticamente efectiva.

Los especialistas en la materia tienen la capacidad de ajustar correspondientemente la dosis.

10 Por ejemplo, la composición puede contener el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* según la presente invención en una cantidad de 10^6 - 10^{12} ufc, por ejemplo de 10^8 a 10^{10} ufc por dosis diaria.

15 Los trabajos anteriores también han demostrado que el *L. johnsonii* CNCM I-1225 no replicante se puede usar en el tratamiento o prevención de trastornos relacionados con el sistema inmunitario, incluyendo las infecciones; véase la patente WO 2010/133475, incorporada aquí en su totalidad por referencia. Se halló que el *L. johnsonii* CNCM I-1225 induce fuertemente la expresión constitutiva de la hBD1 y que el *L. johnsonii* CNCM I-1225 tratado térmicamente regula al alza la hBD1 más fuertemente que su equivalente vivo.

20 Por consiguiente el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* según la presente invención también puede estar en una forma no replicante.

25 Los derivados naturales "no replicantes" de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* incluyen derivados que han sido tratados térmicamente. Ello incluye derivados naturales de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* que están inactivados, muertos, no son viables y/o se hallan en forma de fragmentos tales como ADN, metabolitos, compuestos citoplasmáticos y/o materiales de la pared celular.

30 "No replicante" significa que por métodos clásicos de cultivo en placa no se puede detectar ninguna célula viable y/o ninguna unidad formadora de colonias. Estos métodos clásicos de cultivo en placa están resumidos en el libro de microbiología: James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. Modern food microbiology. 7ª edición, Springer Science, Nueva York, N.Y. 790 p. Normalmente la ausencia de células viables se puede demostrar del modo siguiente: ninguna colonia visible en placas de agar o ningún incremento de turbidez en el medio líquido de cultivo tras la inoculación con distintas concentraciones de preparaciones bacterianas (muestras "no replicantes") y la incubación en condiciones apropiadas (en atmósfera aeróbica y/o anaeróbica durante al menos 24h).

35 Obviamente los microorganismos no replicantes no forman colonias; por tanto este término debe entenderse como la cantidad de microorganismos no replicantes que se obtiene a partir de 10^6 y 10^{12} ufc/g de bacterias replicantes.

40 La composición también puede comprender el derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* según la presente invención en una cantidad de 0,005 mg - 5000 mg, por ejemplo de 0,5 mg hasta 50 mg, por dosis diaria.

45 Los especialistas en la materia entenderán que pueden combinar libremente todas las características de la presente invención aquí descritas, sin apartarse del ámbito de la presente invención tal como está descrita. En particular las características descritas para los usos de la presente invención se pueden aplicar a los productos alimenticios de la presente invención y viceversa.

Otras ventajas y características de la presente invención resultan evidentes a partir de los siguientes ejemplos y figuras.

50 Figura 1: muestra la "curva de supervivencia" del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 tratado con etil-metansulfonato.

Figura 2: muestra el proceso molecular de mutaciones naturales, desde la oxidación de una base G hasta la segregación de las cadenas de ADN, dando una mezcla de tipos de ADN original y modificado, y una colonia mixta de organismos originales y modificados.

55 Figura 3: muestra la secuencia genética del gen de D-lactato deshidrogenasa del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 (SEQ ID NO: 1) y los cambios identificados en el respectivo gen del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437, señalados con un círculo. También se muestra el enzima D-lactato deshidrogenasa traducido (SEQ ID NO: 2) con los cambios correspondientes al *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437.

60 Figura 4A: muestra la secuencia genética del gen de D-lactato deshidrogenasa del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 (SEQ ID NO: 6) con la base en posición 230 encuadrada y alterada en comparación con la cepa original CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* (G).

Figura 4B: muestra la secuencia proteica del enzima D-lactato deshidrogenasa del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 (SEQ ID NO: 7) con el aminoácido en position 77 encuadrado y alterado en comparación con la cepa original CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* (R).

65

Ejemplo 1. Tratamiento de cultivos de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 con etil-metan-sulfonato. Unas muestras de 100 µl de un cultivo de 16 h de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225, que contenían aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colonias, se lavaron 3 veces con solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato. Al final las células se suspendieron en 1 ml de PBS, se añadieron 0 o 10 µl de etil-metan-sulfonato y se incubó a 37°C sin agitar. Las células tratadas se lavaron dos veces en PBS, se determinaron las UFC de los cultivos tratados y no tratados y se representaron gráficamente como supervivientes para dar la "curva de supervivencia" mostrada en la figura 1. Las condiciones que produjeron el 1% de supervivientes se seleccionaron y agruparon inicialmente con intervalos de tiempo anteriores y posteriores; las células se diluyeron y se cultivaron como colonias individuales en placas de MRS para recuento. Las restantes células tratadas se usaron luego para inocular 10 ml de caldo MRS y se incubaron y se incubaron durante 16 h a 37°C. Después el cultivo se diluyó y se sembró en placas de MRS para producir colonias individuales destinadas al cribaje.

Las mutaciones tienen lugar de manera natural en las bacterias, sobre todo por oxidación de residuos de guanosina (G) en el ADN de doble cadena, y suelen producir cambios individuales de pares de bases cuando se resuelven por replicación del ADN, tal como se muestra en la figura 2. Esto da como resultado un perfil de mutación natural con cambios de G a adenosina (A) y de citidina (C) a timidina (T), dependiendo de qué cadena de ADN es secuenciada. El etil-metan-sulfonato actúa oxidando químicamente las bases G y da como resultado el mismo perfil de mutación que las mutaciones naturales, es decir de G a A y de C a T, dependiendo de qué cadena de ADN es secuenciada. Esto se confirmó posteriormente por secuenciación de ADN de los genes de la D-lactato deshidrogenasa y de las secuencias genómicas en que la gran mayoría de los cambios observados era de G a A o de C a T.

Ejemplo 2. Cribaje de colonias individuales para detectar cepas deficientes en producción de ácido D-láctico. En placas de 96 pocillos que contenían 200 µl de caldo MRS se inocularon colonias individuales tratadas con etil-metan-sulfonato y se incubaron a 37°C durante 24 h para formar minicultivos. El crecimiento de los cultivos se evaluó por absorbancia a 620 nm, empleando un lector de microplacas Tecan sunrise. Diez µl del sobrenadante de cultivo se mezclaron con 190 µl de una mezcla reactiva que contenía 100 mM de Tris HCl a pH 9, 2,5 mM de EDTA a pH 8,0, 20 U/ml de D-lactato deshidrogenasa (procedente de *Leuconostoc mesenteroides*), 1 mg/ml de NAD (β-nicotinamida adenina dinucleótido) más 3% de hidróxido de hidrazinio y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se midió la absorbancia a 320 nm (formación de β-NAD) usando el lector de microplacas Tecan sunrise y los datos se exportaron a Excel para ser analizados. En cada placa se incluyeron controles que contenían medio MRS solo y sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 a concentraciones del 5%, 25%, 50% o 100% como patrones para normalizar los datos.

Este es un análisis fenotípico de las colonias aisladas para determinar la presencia o ausencia de ácido D-láctico en el medio de cultivo después del crecimiento. Al cribar colonias individuales para determinar la presencia de ácido D-láctico también es evidente que los cultivos "mixtos" que contienen 50% de un productor de ácido D-láctico y 50% de un no-productor de ácido D-láctico darán como resultado un cultivo "positivo" en cuanto a la presencia de ácido D-láctico. Por lo tanto, el fenotipo deficiente en ácido D-láctico que tomamos como objetivo se considera "recesivo" respecto al fenotipo productivo de ácido D-láctico. Esto es importante si tenemos en cuenta que el esquema de mutagénesis, representado en la figura 2 como una sola base G oxidada, dará como resultado una colonia final que es una mezcla de ambos individuos, originales y alterados, y por tanto fenotípicamente positiva en ácido D-láctico. En este caso la inclusión del crecimiento del cultivo en caldo MRS tras el tratamiento con etil-metan-sulfonato fue esencial para aislar las cepas deficientes en producción de ácido D-láctico. Tras el cribaje de unas 21.000 colonias individuales tratadas con etil-metan-sulfonato se aislaron 15 colonias deficientes en producción de ácido D-láctico y se sometieron a posteriores análisis.

Ejemplo 3. Determinación de los niveles de ácido D-láctico en el medio de cultivo. Se realizaron cultivos en caldo MRS durante 16 horas a 37°C y se separaron las bacterias por centrifugación. Para determinar las concentraciones de ácido D-láctico, los sobrenadantes de cultivo libres de células se diluyeron con agua, se analizaron tal como está descrito arriba y se compararon con una curva patrón preparada con diluciones de sal sódica de ácido D-láctico. Las concentraciones de ácido L-láctico se determinaron del mismo modo cambiando el enzima D-lactato deshidrogenasa por L-lactato deshidrogenasa de músculo de conejo y empleando sal sódica de ácido L-láctico como patrón. En la tabla 1 se muestran los resultados de este análisis para CNCM I-4437, incluyendo los controles de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225, *Lactobacillus johnsonii* NCC9006 con un gen de D-lactato deshidrogenasa inactivado como OMG, más *Lactobacillus paracasei* NCC2461 y *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007, ambas consideradas como cepas productoras de ácido L-láctico.

El *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (número de acceso: CNCM I-2116) fue depositado en la CNCM (dirección ya citada) conforme al tratado de Budapest el 12 de enero de 1999. El *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (número de acceso: CGMCC 1.3724) fue depositado en el Centro de la colección de cultivos microbiológicos generales de China (CGMCC), Instituto de microbiología, Academia china de las ciencias, n° 1, West Beichen Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China, conforme al tratado de Budapest en octubre de 2004. El *Lactobacillus johnsonii* NCC9006 es la cepa derivada del *Lactobacillus johnsonii* La1, descrita en el artículo de Lapiere y otros titulado "D-Lactate Dehydrogenase Gene (ldhD) Inactivation and Resulting Metabolic Effects in the *Lactobacillus johnsonii* Strains La1 and N312 [Inactivación del gen de D-lactato deshidrogenasa (*ldhD*) y efectos metabólicos resultantes en las cepas La1 y N312 de *Lactobacillus johnsonii*]" (Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65(9):4002).

Tabla 1. Valores de ácido D- y L-láctico determinados para CNCM I-1225 y CNCM I-4437 a partir de cultivos libres de células, incluyendo como controles las cepas NCC9006, una cepa de *Lactobacillus johnsonii* con una inactivación OMG del gen de D-lactato deshidrogenasa, *Lactobacillus paracasei* NCC2461 y *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007, ambas consideradas como cepas productoras de ácido L-láctico. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados están expresados como valor medio más la desviación estándar entre paréntesis.

Cepa	Ácido láctico total *	Ácido L-láctico	Ácido D-láctico	% de ácido D-láctico
CNCM I-1225	14	4,8 (0,17)	9,2 (0,27)	65,7
CNCM I-4437	21,2	21,1 (0,53)	0,14 **	0,7
NCC9006	21,2	21,2 (3,25)	< 0,05 ***	< 0,03 ****
NCC2461	16,8	16,3 (0,97)	0,48 (0,02)	2,9
NCC4007	15,8	15,2 (0,49)	0,56 (0,03)	3,5

*, valores de ácido láctico en g/l.

** , solo una de las muestras dio un valor superior al límite de cuantificación.

***, inferior al límite de cuantificación.

****, % calculado empleando el valor inferior del límite de cuantificación.

Los resultados demuestran que los valores de producción de ácido D-láctico del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 son aproximadamente el 65% del total de ácido láctico y que los valores de producción de ácido D-láctico del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 se reducen en gran medida. Los niveles de producción de ácido D-láctico del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 son muy bajos e inferiores al 1% del total de ácido láctico. Este resultado es parecido a los resultados obtenidos con el *Lactobacillus johnsonii* NCC9006, el cual contiene un gen de D-lactato deshidrogenasa inactivado que ha sido creado con el empleo de métodos de tecnología genética. Asimismo cabe señalar que las cepas de control *Lactobacillus paracasei* NCC2461 y *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007, ambas consideradas como cepas productoras de ácido L-láctico, producen respectivamente 3 y 3,5% de ácido D-láctico en estas condiciones. De estos datos se deduce que la cepa *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 se puede considerar productora de ácido L-láctico y fenotípicamente distinta de la cepa *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225.

Ejemplo 4. Identificación de cambios en los genes de D-lactato deshidrogenasa. A fin de identificar los cambios en el gen de D-lactato deshidrogenasa responsable del fenotipo deficiente en ácido D-láctico amplificamos por PCR las regiones para el análisis de la secuencia de ADN. La región se amplificó partiendo de un μ l de cultivo bacteriano, usando los cebadores P1 TCAGCACATAACCAGCAGCT (SEQ ID NO: 3) y P2 GCAATAATACTGTCCCGGT (SEQ ID NO: 4). Los amplicones se purificaron y secuenciaron con los cebadores P1, P3 GTGTATAATAAAAGACGGTC (SEQ ID NO: 5) y P2, se compilaron y analizaron con la serie de programas DNASTAR. Los resultados se muestran en la figura 3. Como puede verse en la figura 3 la cepa *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 contiene un cambio de G a A en el par de bases 270 de la figura 3 y la figura 4A, que produce un cambio del aminoácido arginina a histidina en la posición 77 (R77H) ubicada fuera de los dominios distintivos conservados de la secuencia enzimática de la D-lactato deshidrogenasa (figura 4B). Los datos de la secuenciación genética indican que el fenotipo de producción deficiente de ácido D-láctico en el *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 va acompañado de un correspondiente cambio en el gen de la D-lactato deshidrogenasa y en la secuencia enzimática.

Ejemplo 5. Determinación de la estabilidad fenotípica del *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437. Dado el gran número de generaciones desde la recolección del cultivo hasta el producto final, es importante que el fenotipo deficiente en ácido D-láctico sea estable y que la reversión hacia la producción de ácido D-láctico sea muy rara. Para investigar esto cultivamos *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 en caldo MRS durante un total de 100 generaciones y después se comprobó la producción de ácido D-láctico en 300 colonias individuales. El resultado es que ninguna de las colonias investigadas mostró niveles de ácido D-láctico superiores a los determinados para la cepa *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437. Este análisis también se realizó tras una elaboración a escala piloto de productos en polvo secados por pulverización y en productos Lc1 Drink, con los mismos resultados.

En las bacterias de ácido láctico, una sola copia de D- o L-lactato deshidrogenasa es esencial para la producción de ácido láctico y la regeneración de NADH, un cofactor de esta reacción, a NAD. En las bacterias de ácido láctico ésta es la única vía para regenerar NAD en condiciones anaeróbicas y es esencial para el crecimiento. En el caso de las cepas deficientes en ácido D-láctico no hay ninguna presión selectiva para la reversión hacia la producción de ácido D-láctico, ya que el enzima L-lactato deshidrogenasa es suficiente para cubrir la falta de actividad enzimática de D-lactato deshidrogenasa.

Ejemplo 6. Supervivencia de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 y *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 en los productos Lc1 Drink. La supervivencia de las bacterias probióticas durante el almacenamiento del producto es un factor importante para asegurar la esperada aparición de 10^7 unidades formadoras de colonias después de 45 días de almacenamiento. El motivo de la pérdida de viabilidad no está totalmente entendido, pero hay algunas pruebas de la intervención de oxígeno. Para comprobar si el *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 sobrevive al menos tan bien como el *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 en condiciones de almacenamiento simuladas, tomamos unos productos Lc1 Drink y eliminamos las bacterias vivas calentando a 85°C durante 10 minutos. Después se inoculó *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 o *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 en los productos esterilizados y las botellas se sellaron y almacenaron en condiciones estándar de ensayo a 8°C o a 15°C durante 45 días. Abajo se

ES 2 602 260 T3

muestran los resultados de tres ensayos independientes. Para sorpresa nuestra el *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-4437 registra una supervivencia consistentemente mejor que el *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 a ambas temperaturas y en todos los tres ensayos, con mejoras de 0,42 logs hasta más de 2 logs.

5

Ensayo 1

Temp. de almacenamiento	Cepa	T = 0	T = 45 días	Pérdida log
8°C	CNCM I-1225	8,08	7,2	- 0,88
	CNCM I-4437	8,04	7,62	- 0,42
15°C	CNCM I-1225	8,08	6,36	- 1,72
	CNCM I-4437	8,04	7,18	- 0,87

Ensayo 2

Temp. de almacenamiento	Cepa	T = 0	T = 45 días	Pérdida log
8°C	CNCM I-1225	7,93	6,46	- 1,47
	CNCM I-4437	7,79	6,84	- 0,95
15°C	CNCM I-1225	7,93	5,6	- 2,33
	CNCM I-4437	7,79	6,7	- 1,09

10

Ensayo 3

Temp. de almacenamiento	Cepa	T = 0	T = 45 días	Pérdida log
8°C	CNCM I-1225	8,23	6,2	- 2,03
	CNCM I-4437	7,91	7,41	- 0,49
15°C	CNCM I-1225	8,23	5,85	- 2,38
	CNCM I-4437	7,91	6,83	- 1,08

Lista de SEQ IDs

15

SEQ ID NO: (ADN)	SEQ ID NO: (proteína)	Descripción breve
1	2	D-lactato deshidrogenasa de <i>Lactobacillus johnsonii</i> CNCM I-1225
3	n/a	Cebador P1 (véase ejemplo 4)
4	n/a	Cebador P2 (véase ejemplo 4)
5	n/a	Cebador P3 (véase ejemplo 4)
6	7	D-lactato deshidrogenasa de <i>Lactobacillus johnsonii</i> CNCM I-4437 (figuras 4A y 4B)

LISTA DE SECUENCIAS

20

<110> Nestec S.A.

<120> Derivado natural de la cepa CNCM I-1225 de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 deficiente en producción de ácido D-láctico, con mayor tiempo de almacenamiento

<150> EP11160140.7

<151> 2011-03-29

<160> 7

25

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 1080

<212> ADN

<213> *Lactobacillus johnsonii*

30

<220>

<221> fuente

<222> 1..1080

<223> /tipo molecular = "ADN" /organismo = "*Lactobacillus johnsonii*"

35

<400> 1

ES 2 602 260 T3

```

aaagacggtc atactattaa ttttgacgga ggtttaatth atgacaaaga tttttgctta      60
cgctattcgt aaagatgaag aacctttcct aaacgaatgg aaagatgcac acaaggatat      120
tgaagttgaa tacactgaca agcttttagc cctgaaact gctaaattag ctaaggggtgc      180
tgacggtggt gttgthtacc aacaattaga ctacactcct gaaactcttc aagcttttagc      240
tgatgctggc gtaactaaga tgtcattacg taacgthtgg gttgacaaca tcgacatgga      300
caaggctaaa gaattaggct ttgaaatcac taacgthtct gtatactctc ctgacgcaat      360
tgctgaacat gctgcaattc aagctgctcg cgtactacgt caagataagc gtatggatga      420
aaagatggct aagcgcgact tacgctgggc acctactatt ggtcgtgaag ttcgtgacca      480
agthtthtgg gthttaggta ctggtcacat cggthcaagta thtatgaaga thtatggaagg      540
ctthtggcgca aaagthtattg cttacgatat cthcaagaac ccagaacttg aaaagaaggg      600
thtactacgt gactcacttg atgacttata caagcaagct gatgthaatth cacttcacgt      660
tccagatgth ccagcaaacg thcacatgat taatgatgaa tcaatcgcta agatgaaaga      720
tggcgthtga atcgthaaact gctcacgtgg tccactthtth gacactgacg ctgthtatccg      780
cggcttagat tctggthaaaga thththtggth cgthaatggac acttacgaag gthgaagthtgg      840
gthththtaac gaagathtggg aagththaaaga aththccagat gthcgtthtag ctgactthaat      900
cgatcgthcca aatgthattgg thactccaca tactgctthc tacactactc atgctgtacg      960
thacatggta actaaagcat thgacaacaa cththaaagatg atcaacggtg aaaaaccaga     1020
thththccagth gctthtggaca agaacaagth thththththca athththgata atcaaaaaga     1080

```

```

5  <210> 2
   <211> 337
   <212> PRT
   <213> Lactobacillus johnsonii
   <220>
10 <221> FUENTE
   <222> 1..337
   <223> /tipo molecular = "proteína" /organismo = "Lactobacillus johnsonii"
   <400> 2

```

15

ES 2 602 260 T3

Met Thr Lys Ile Phe Ala Tyr Ala Ile Arg Lys Asp Glu Glu Pro Phe
1 5 10 15
Leu Asn Glu Trp Lys Asp Ala His Lys Asp Ile Glu Val Glu Tyr Thr
20 25 30
Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr Ala Lys Leu Ala Lys Gly Ala Asp
35 40 45
Gly Val Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Gln
50 55 60
Ala Leu Ala Asp Ala Gly Val Thr Lys Met Ser Leu Arg Asn Val Gly
65 70 75 80
Val Asp Asn Ile Asp Met Asp Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe Glu Ile
85 90 95
Thr Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asp Ala Ile Ala Glu His Ala Ala
100 105 110
Ile Gln Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Asp Lys Arg Met Asp Glu Lys
115 120 125
Met Ala Lys Arg Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Val
130 135 140
Arg Asp Gln Val Val Gly Val Val Gly Thr Gly His Ile Gly Gln Val
145 150 155 160
Phe Met Lys Ile Met Glu Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp
165 170 175
Ile Phe Lys Asn Pro Glu Leu Glu Lys Lys Gly Tyr Tyr Val Asp Ser
180 185 190
Leu Asp Asp Leu Tyr Lys Gln Ala Asp Val Ile Ser Leu His Val Pro
195 200 205
Asp Val Pro Ala Asn Val His Met Ile Asn Asp Glu Ser Ile Ala Lys
210 215 220
Met Lys Asp Gly Val Val Ile Val Asn Cys Ser Arg Gly Pro Leu Val
225 230 235 240
Asp Thr Asp Ala Val Ile Arg Gly Leu Asp Ser Gly Lys Ile Phe Gly
245 250 255
Phe Val Met Asp Thr Tyr Glu Gly Glu Val Gly Val Phe Asn Glu Asp
260 265 270
Trp Glu Gly Lys Glu Phe Pro Asp Ala Arg Leu Ala Asp Leu Ile Asp
275 280 285
Arg Pro Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr His
290 295 300
Ala Val Arg Asn Met Val Thr Lys Ala Phe Asp Asn Asn Leu Lys Met
305 310 315 320
Ile Asn Gly Glu Lys Pro Asp Ser Pro Val Ala Leu Asp Lys Asn Lys
325 330 335
Phe

5 <210> 3
<211> 20

ES 2 602 260 T3

<212> ADN
<213> Lactobacillus johnsonii
<220>
<221> fuente
5 <222> 1..20
<223> /tipo molecular = "ADN" /organismo = "Lactobacillus johnsonii"
<400> 3
tcagcacata accagcagct 20
10 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Lactobacillus johnsonii
<220>
<221> fuente
15 <222> 1..20
<223> /tipo molecular = "ADN" /organismo = "Lactobacillus johnsonii"
<400> 4
gcaataatac tgtcgccggt 20
20 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Lactobacillus johnsonii
<220>
<221> fuente
25 <222> 1..20
<223> /tipo molecular = "ADN" /organismo = "Lactobacillus johnsonii"
<400> 5
gtgtataata aaagacggtc 20
30 <210> 6
<211> 1014
<212> ADN
<213> Lactobacillus johnsonii
<220>
<221> fuente
35 <222> 1..1014
<223> /tipo molecular = "ADN" /organismo = "Lactobacillus johnsonii"
<400> 6

ES 2 602 260 T3

```

atgacaaaga tttttgctta cgctattcgt aaagatgaag aacctttcct aaacgaatgg      60
aaagatgcac acaaggatat tgaagttgaa tacactgaca agcttttagc cctgaaact      120
gctaaattag ctaaggggtgc tgacggtggt gttgtttacc aacaattaga ctacactcct      180
gaaactcttc aagcttttagc tgatgctggc gtaactaaga tgtcattaca taacgttggt      240
gttgacaaca tcgacatgga caaggctaaa gaattaggct ttgaaatcac taacgttcct      300
gtatactctc ctgacgcaat tgctgaacat gctgcaattc aagctgctcg cgtactacgt      360
caagataagc gtatggatga aaagatggct aagcgcgact tacgctgggc acctactatt      420
ggtcgtgaag ttcgtgacca agttgttggg gttgtaggta ctggtcacat cggtcgaagta      480
tttatgaaga ttatggaagg ctttggcgca aaagttattg cttacgatat cttcaagaac      540
ccagaacttg aaaagaaggg ttactacggt gactcacttg atgacttata caagcaagct      600
gatgtaattt cacttcacgt tccagatggt ccagcaaacg ttcacatgat taatgatgaa      660
tcaatcgcta agatgaaaga tggcgttgta atcgtaaact gctcacgtgg tccacttggt      720
gacactgacg ctgttatccg cggetttagat tctggtaaga tctttggttt cgtaatggac      780
acttacgaag gtgaagttgg tgtatttaac gaagattggg aaggtaaaga attcccagat      840
gctcgtttag ctgacttaat cgatcgcca aatgtattgg taactccaca tactgctttc      900
tacactactc atgctgtacg taacatggta actaaagcat ttgacaacaa cttaaagatg      960
atcaacggtg aaaaaccaga ttctccagtt gctttggaca agaacaagtt ctaa      1014

```

```

5   <210> 7
    <211> 337
    <212> PRT
    <213> Lactobacillus johnsonii
    <220>
10  <221> FUENTE
    <222> 1..337
    <223> /tipo molecular = "proteína" /organismo = "Lactobacillus johnsonii"
    <400> 7

```

15

ES 2 602 260 T3

Met Thr Lys Ile Phe Ala Tyr Ala Ile Arg Lys Asp Glu Glu Pro Phe
1 5 10 15
Leu Asn Glu Trp Lys Asp Ala His Lys Asp Ile Glu Val Glu Tyr Thr
20 25 30
Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr Ala Lys Leu Ala Lys Gly Ala Asp
35 40 45
Gly Val Val Val Tyr Gln Gln Leu Asp Tyr Thr Pro Glu Thr Leu Gln
50 55 60
Ala Leu Ala Asp Ala Gly Val Thr Lys Met Ser Leu His Asn Val Gly
65 70 75 80
Val Asp Asn Ile Asp Met Asp Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe Glu Ile
85 90 95
Thr Asn Val Pro Val Tyr Ser Pro Asp Ala Ile Ala Glu His Ala Ala
100 105 110
Ile Gln Ala Ala Arg Val Leu Arg Gln Asp Lys Arg Met Asp Glu Lys
115 120 125
Met Ala Lys Arg Asp Leu Arg Trp Ala Pro Thr Ile Gly Arg Glu Val
130 135 140
Arg Asp Gln Val Val Gly Val Val Gly Thr Gly His Ile Gly Gln Val
145 150 155 160
Phe Met Lys Ile Met Glu Gly Phe Gly Ala Lys Val Ile Ala Tyr Asp
165 170 175
Ile Phe Lys Asn Pro Glu Leu Glu Lys Lys Gly Tyr Tyr Val Asp Ser
180 185 190
Leu Asp Asp Leu Tyr Lys Gln Ala Asp Val Ile Ser Leu His Val Pro
195 200 205
Asp Val Pro Ala Asn Val His Met Ile Asn Asp Glu Ser Ile Ala Lys
210 215 220
Met Lys Asp Gly Val Val Ile Val Asn Cys Ser Arg Gly Pro Leu Val
225 230 235 240
Asp Thr Asp Ala Val Ile Arg Gly Leu Asp Ser Gly Lys Ile Phe Gly
245 250 255
Phe Val Met Asp Thr Tyr Glu Gly Glu Val Gly Val Phe Asn Glu Asp
260 265 270
Trp Glu Gly Lys Glu Phe Pro Asp Ala Arg Leu Ala Asp Leu Ile Asp
275 280 285
Arg Pro Asn Val Leu Val Thr Pro His Thr Ala Phe Tyr Thr Thr His
290 295 300
Ala Val Arg Asn Met Val Thr Lys Ala Phe Asp Asn Asn Leu Lys Met
305 310 315 320
Ile Asn Gly Glu Lys Pro Asp Ser Pro Val Ala Leu Asp Lys Asn Lys
325 330 335
Phe

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa CNCM I-4437 de *Lactobacillus johnsonii* depositada en la Colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur).
2. Composición que contiene la cepa CNCM I-4437 de *Lactobacillus johnsonii* depositada en la Colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur).
- 10 3. Composición según la reivindicación 2 seleccionada del grupo constituido por composiciones alimenticias, composiciones de comida para mascotas, bebidas, productos lácteos, fórmulas nutricionales, aditivos alimentarios, productos nutracéuticos, composiciones farmacéuticas, ingredientes alimentarios y/o composiciones cosméticas.
- 15 4. Composición según la reivindicación 2 seleccionada del grupo constituido por productos lácteos acidificados tales como yogures o bebidas de yogur, o productos a base de leche en polvo.
- 20 5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, que comprende la cepa CNCM I-4437 de *Lactobacillus johnsonii* en una cantidad de $10^6 - 10^{12}$ ufc por dosis diaria.
6. Composición que contiene la cepa CNCM I-4437 de *Lactobacillus johnsonii* depositada en la Colección nacional de cultivos de microorganismos (CNCM, Instituto Pasteur), para emplearla en un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal.
- 25 7. Composición para emplear según la reivindicación 6 en el tratamiento de la gripe, de la rinitis, del resfriado común y sus combinaciones.
- 30 8. Composición para emplear según la reivindicación 6 en el tratamiento de un trastorno relacionado con la adherencia a las células y con la invasión de las células por bacterias o virus enterovirulentos, eligiendo dicho trastorno del grupo constituido por infecciones del tracto respiratorio inferior, infecciones del tracto gastrointestinal, otitis media y combinaciones de ellas, y eligiendo preferentemente las especies enterovirulentas del grupo formado por *Salmonella*; *Campylobacter*; *Listeria*; cepas de *Escherichia coli* tales como ETEC, EHEC, EPEC o EIEC, por ejemplo; *Yersinia*; *Shigella*; bacterias productoras de toxinas tales como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* o *Bacillus cereus*; *Vibrio vulnificus/parahaemolyticus*; rotavirus; norovirus; *E. coli* verotoxigénica; *Enterobactersakazakii*; *C. perfringens* toxigénico (de tipo A y B); parásitos alimentarios tales como *Echinococcus*, *Toxoplasma* o *Giardia*; *Helicobacter pylori*; *Clostridium difficile*; *Clostridium tetani*; o sus combinaciones.
- 35

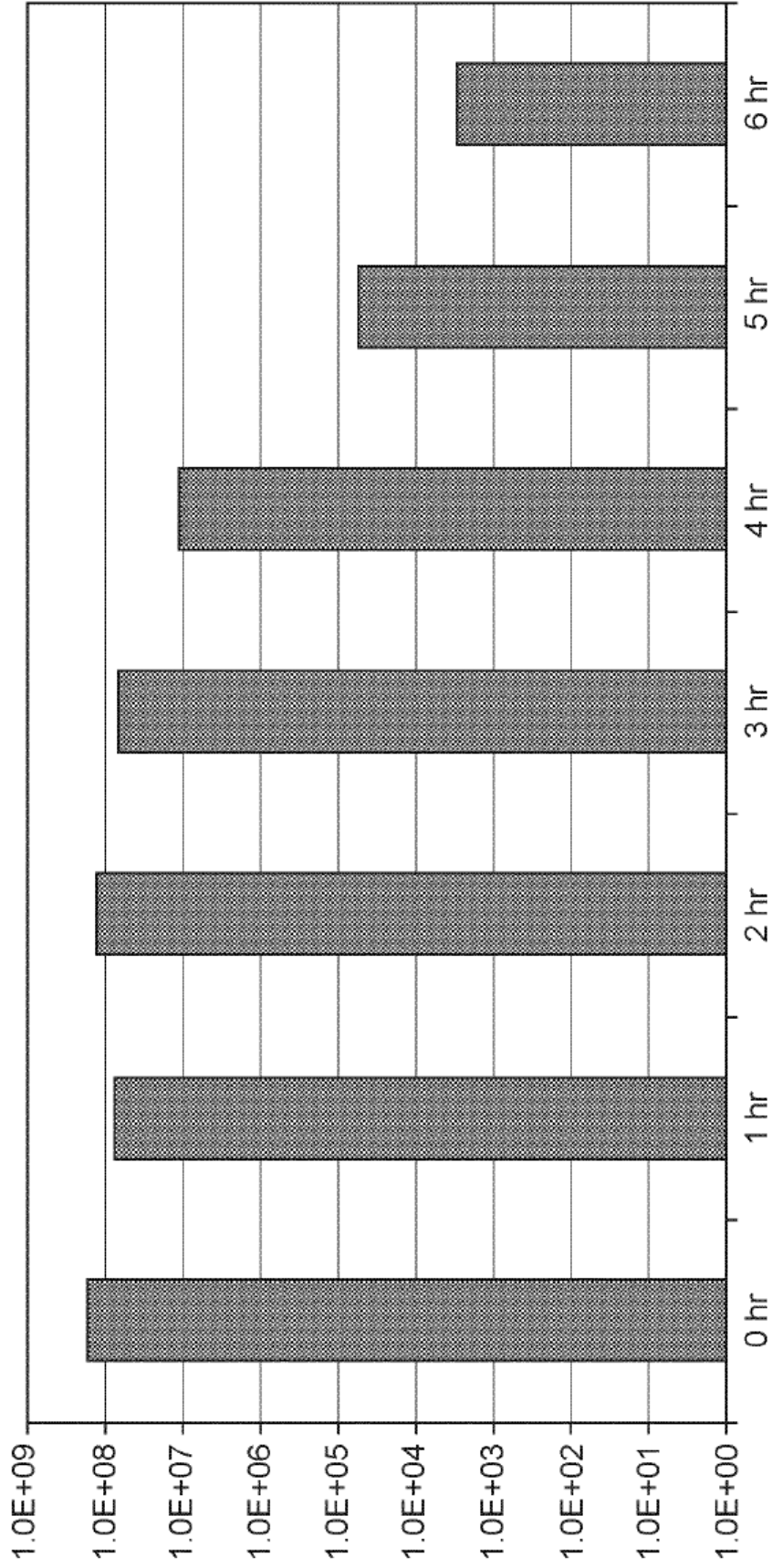
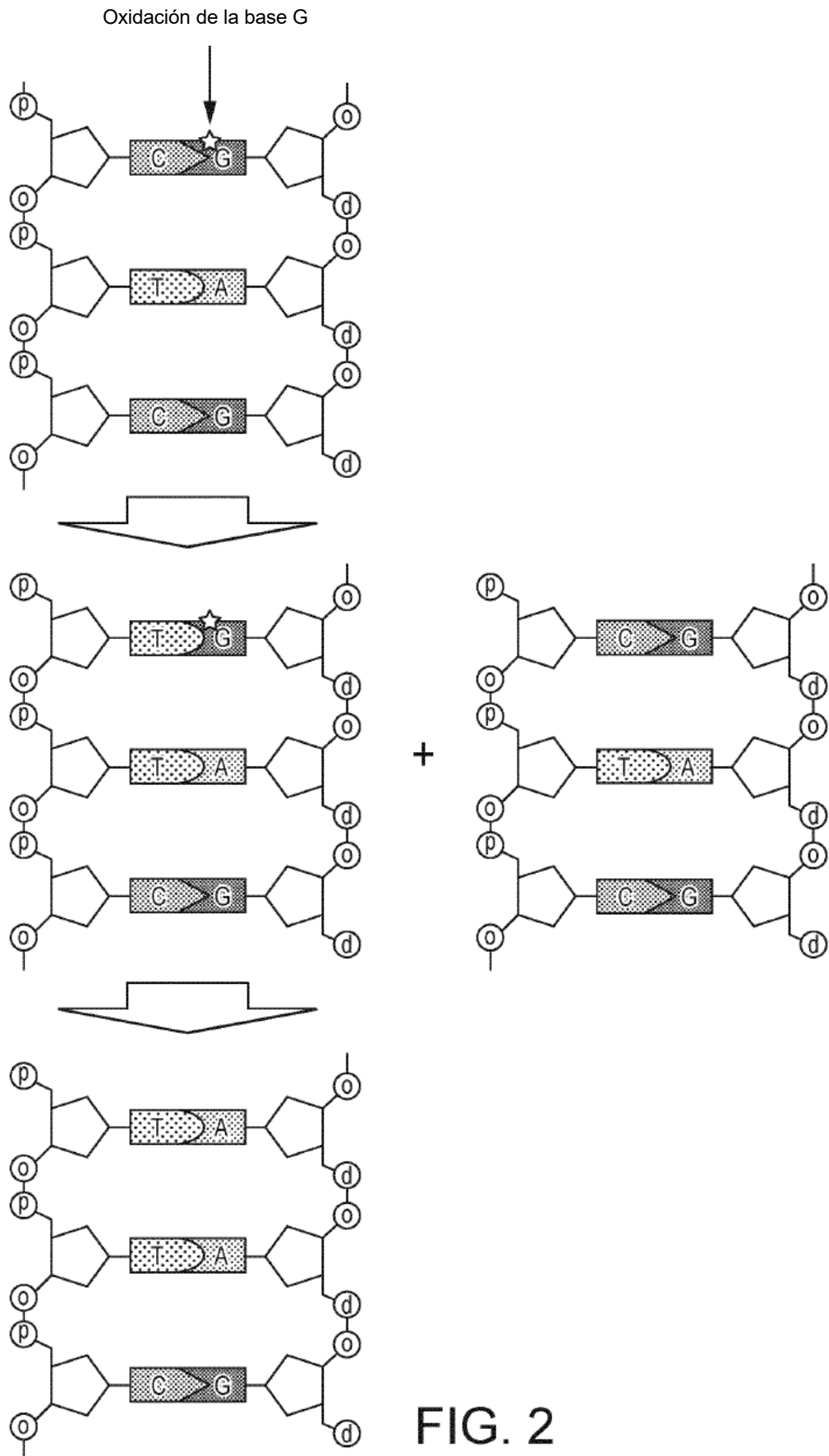


FIG. 1



RBS

1 AAAGACGGTC ATACTATTAAATTTTGACGGA GGTITTAATTT ATGACAAAGA TTTTTCCTTA CGCTATTTCGT AAAGATGAAG AACCTTCTTT

91 AAACGAATGG AAAGATGCAC ACNAGGATAT TGAAGTTGAA TACACTGACA AGCTTTTAGC CCCTGAAACT GCTAAATTAG CTAAGGGTGC
 L N E W K D A H K D I E V E Y T D K L L A P E T A K L A K C

181 TGACGGTGTG GTTGTTTACC AACAAATTAGA CTACACTCCT GAAACTCTTC AAGCTTTAGC TGATGCTGGC GTAACATAATATCATTACg
 A D G V V Y Q Q L D Y T P E T L Q A L A D A G V T K M S L

271 TAACGTTGGT GTTGACAACA TCGACATGGA CAAGGCTAAA GAAATTAGGCT TTGAATCAC TAACGTTCTT GTATACTCTC CTGACGCAAT
 R N V G V D N I D M D K A K E L G F E I T N V P V Y S P D A
 H CNM I4437, CGT to CAT

361 TGCUGACAT GCTGCAATTC AAGCTGCTCG CGTACTACGT CAAGATAAGC GTATGGATGA AAAGATGGCT AAGCGCGACT TACGCTGGCC
 I A E H A A I Q A A R V L R Q D K R M D E K M A K R D L R W

451 ACCTACTAAT GGTCGTGAAG TTCGTGACCA AGTTGTTGGT GTTGTAGGTA CTGGTCACAT CCGTCAAGTA TTTATGAGA TTATGGAAG
 A P T I G R E V R D Q V V G V V G T G H I G Q V F M K I M E

541 CTTTGGCGCA AAAGTTATTG CTTACGATAT CTTCAAGAAC CCAGAACTTG AAAAGAAGGG TTACTACGTT GACTCACITG ATGACTTATA
 G F G A K V I A Y I F K N P E L E K K G Y Y V D S L D D L

631 CAAGCAAGCT GAIGTAAATTT CACTTCACGT TCCAGATGTT CCAGCAAACG TTCACATGAT TAAATGATGAA TCAATCGCTA AGAIGAAAAGA
 Y K Q A D V I S L H V P D V P A N V H M I N D E S I A K M K

D-LDH signature 3

721 TGGCGTTGTA ATCGTAAACT GCTCACGTTG TCCACTTGTG GACACTGAGC CTGTTATCCG CGGCTTAGAT TCTGGTAAGA TCITTTGGTTT
 D G V V I V N C S R G P L V D T D A V I R G L D S G K I F G

811 CGTAATGGAC ACTTACGAAG GTGAAGTTGG TGTATTTAAC GAAGATTGGG AAGGTAAAGA ATTCCACAGAT GCTCGTTTAG CTGACTTAAT
 F V M D T Y E G E V G V F N E D W E G K E F P D A R L A D L

901 CGATCGTCCA AATGTATTGG TAACTCCACA TACTGCTTTC TACACTACTC ATGCTGTACG TAACATGGTA ACTAAAGCAT TTGACAACAA
 I D R P N V L V T P H T A F Y T T H A V R N M V T K A F D N

991 CTTAAAGATG ATCAACGGTG AAAAACCCAGA TTCTCCAGTT GCTTTGGACA AGAACAAAGTT CTAAAAAATATTTATGATA ATCAAAAAGA
 N L K M I N G E K P D S P V A L D K N K F *

D-LDH signature 1

D-LDH signature 2

FIGURA 3

FIGURA 4A

SEQ ID NO: 6

1 ATGACAAAGA TTTTGGCTTA CGCTATTCGT AAAGATGAAG AACCTTTCTT
 51 AAACGAATGG AAAGATGCAC ACAAGGATAT TGAAGTTGAA TACACTGACA
 101 AGCTTTTAGC CCCTGAAACT GCTAAATTAG CTAAGGGTGC TGACGGTGTT
 151 GTTGTTTACC AACAATTAGA CTACACTCCT GAAACTCTTC AAGCTTTAGC
 201 TGATGCTGGC GTAAC TAAGA TGTCATTAC A TAACGTTGGT GTTGACAACA
 251 TCGACATGGA CAAGGCTAAA GAATTAGGCT TTGAAATCAC TAACGTTTCT
 301 GTATACTCTC CTGACGCAAT TGCTGAACAT GCTGCAATTC AAGCTGCTCG
 351 CGTACTACGT CAAGATAAGC GTATGGATGA AAAGATGGCT AAGCGCGACT
 401 TACGCTGGGC ACCTACTATT GGTCGTGAAG TTCGTGACCA AGTTGTTGGT
 451 GTTGTAGGTA CTGGTCACAT CGGTCAAGTA TTTATGAAGA TTATGGAAGG
 501 CTTTGGCGCA AAAGTTATTG CTTACGATAT CTTCAAGAAC CCAGAACTTG
 551 AAAAGAAGGG TTACTACGTT GACTCACTTG ATGACTTATA CAAGCAAGCT
 601 GATGTAATTT CACTTCACGT TCCAGATGTT CCAGCAAACG TTCACATGAT
 651 TAATGATGAA TCAATCGCTA AGATGAAAGA TGGCGTTGTA ATCGTAAACT
 701 GCTCACGTGG TCCACTTGTT GACTGACG CTGTTATCCG CGGCTTAGAT
 751 TCTGGTAAGA TCTTTGGTTT CGTAATGGAC ACTTACGAAG GTGAAGTTGG
 801 TGTATTTAAC GAAGATTGGG AAGGTAAAGA ATTCCCAGAT GCTCGTTTAG
 851 CTGACTTAAT CGATCGTCCA AATGTATTGG TAACTCCACA TACTGCTTTC
 901 TACACTACTC ATGCTGTACG TAACATGGTA ACTAAAGCAT TTGACAACAA
 951 CTTAAAGATG ATCAACGGTG AAAAACCAGA TTCTCCAGTT GCTTTGGACA
 1001 AGAACAAGTT CTAA

FIGURA 4B

SEQ ID NO: 7

1 MTKIFAYAIR KDEEPFLNEW KDAHKDIEVE YTDKLLAPET AKLAKGADGV
 51 VVYQQLDYTP ETLQALADAG VTKMSL H NVG VDNIDMDKAK ELGFEITNVP
 101 VYSPDAIAEH AAIQAARVLR QDKRMDEKMA KRDLRWAPTI GREVRDQVVG
 151 VVGTHIGQV FMKIMEGFGA KVIAYDIFKN PELEKKGYYV DSLDDLYKQA
 201 DVISLHVPDV PANVHMINDE SIAKMKDGVV IVNCSRGPLV DDAVIRGLD
 251 SGKIFGFVMD TYEGEVGFVN EDWEGKEFPD ARLADLIDRP NVLVTPTAF
 301 YTTHAVRNMV TKAFDNNLKM INGEKPDSPV ALDKNKF