

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 679**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2003 PCT/SE2003/001552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.04.2004 WO04031368**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2003 E 03751682 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 1551952**

54 Título: **Selección y uso de bacterias del ácido láctico para reducir la inflamación provocada por Helicobacter**

30 Prioridad:

07.10.2002 US 265859

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

22.02.2017

73 Titular/es:

**BIOGAIA AB (100.0%)
BOX 11279
404 26 GOTHENBURG, SE**

72 Inventor/es:

**MÖLLSTAM, BO y
CONNOLLY, EAMONN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 602 679 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

Selección y uso de bacterias del ácido láctico para reducir la inflamación provocada por *Helicobacter*

5 **Antecedentes de la invención**Campo de la invención

10 Esta invención se refiere al uso de un método para examinar cepas bacterianas antiinflamatorias no patógenas, y a productos y métodos usando tales cepas para el tratamiento y la profilaxis de la inflamación provocada por bacterias gastrointestinales tales como *Helicobacter pylori*, otras especies de *Helicobacter*, y otros patógenos gastrointestinales que provocan inflamación.

Descripción de la técnica relacionada

15 *Helicobacter pylori* es una bacteria de conformación espiral que coloniza el estómago mediante, entre otras cosas, su capacidad para producir ureasa para neutralizar los ácidos en el estómago. La ureasa convierte la urea, de la que hay un abundante suministro en el estómago, en bicarbonato y amoníaco, que son bases fuertes. Esto da como resultado una nube de bases neutralizantes de ácidos alrededor de las células de *H. pylori*, protegiéndolas del ácido en el estómago. Las células de *H. pylori* penetran en y atraviesan la capa de mucosa gástrica y se unen a las células epiteliales en el revestimiento del estómago. Al menos algunas cepas de *H. pylori* tienen la capacidad de producir toxinas. La infección con *H. pylori* activa el sistema inmunitario del huésped, que envía glóbulos blancos, células T citotóxicas y otros agentes de lucha contra la infección a la zona, pero el sistema inmunitario del cuerpo no es eficaz en la reversión de los efectos de *H. pylori* en el revestimiento mucoso del estómago. Las células de *H. pylori* permanecen en el revestimiento, y el sistema inmunitario intensifica su respuesta a las células, creando una inflamación si no hay mecanismos antiinflamatorios suficientes disponibles. Durante la infección con *H. pylori*, proteínas de señal intercelular de citocinas generadas por las células dendríticas, células citotóxicas naturales, células T y otras células de defensa inmunitaria del epitelio del huésped propagan la respuesta inmunitaria al patógeno invasor. En consecuencia, se unen neutrófilos del huésped a y se infiltran en el epitelio del estómago y persisten allí a lo largo de toda la infección. Estas células generan, entre otros factores, productos de oxígeno reactivos, tales como radicales superóxido, que conducen a oxidación en las células epiteliales y a la consecuente muerte de células epiteliales, formación de úlceras y en última instancia carcinogénesis. *H. pylori* también induce fuga de nutrientes del huésped sobre el epitelio del estómago proporcionando una fuente de nutrientes para sustentar las células de *H. pylori* y agravar la infección y sus consecuencias. *H. pylori* puede evadir el sistema inmunitario humano y sobrevivir en el estómago a pesar de la respuesta inmunitaria del huésped y los mecanismos de esta evasión son objeto de investigación actual.

20 La terapia actual se basa en la erradicación de *H. pylori* a través de antibióticos e inhibidores de la bomba de protones en vez de intentar eliminar los efectos de la respuesta inmunitaria excesiva del huésped a la infección, tal como haciendo que estén disponibles mecanismos antiinflamatorios suficientes, lo que es el fin de la presente invención.

25 Por tanto, la infección con *H. pylori* provoca un riesgo aumentado de desarrollar gastritis, úlceras gástricas y duodenales, incluyendo úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica. Estos problemas no están provocados directamente por las células de *H. pylori*, sino por la inflamación del revestimiento del estómago en respuesta a *H. pylori*. Se han usado diversos tratamientos para mejorar los síntomas de las úlceras gástricas y duodenales, tales como tratamientos que reducen la producción de ácido en el estómago, combinados con antibióticos. También se han intentado vacunas novedosas contra *H. pylori* pero con éxito limitado. También se sabe que otras especies de *Helicobacter*, así como otros patógenos gastrointestinales, pueden provocar inflamación gastrointestinal.

30 En un reciente artículo de investigación, investigadores que estudiaban infecciones por *H. pylori* concluyeron que la infección por *H. pylori* provoca sialilación de la mucosa gástrica como parte de la respuesta inflamatoria crónica y que por tanto muchas cepas virulentas pueden unirse mejor al sitio inflamado (Science 18:573-578, 2002).

35 La inflamación en el estómago y el tracto gastrointestinal está mediada por proteínas de señal intercelular conocidas como citocinas que se producen por macrófagos y células dendríticas en el epitelio en respuesta a un estímulo antigénico tal como el producido por *H. pylori* u otros patógenos. Tras el contacto entre el epitelio y el antígeno tal como *H. pylori* o endotoxinas producidas por el mismo, tal como LPS, células presentadoras de antígeno (incluyendo células dendríticas) en el epitelio propagan la señal a macrófagos vírgenes que entonces responden en una denominada respuesta de tipo Th-1 en la que se producen citocinas proinflamatorias incluyendo TNF α , IL-1, IL-6, IL-12 por los macrófagos. Estas citocinas a su vez estimulan a células citotóxicas naturales, células T y otras células para que produzcan interferón γ (IFN γ), que es el mediador clave de la inflamación. IFN γ conduce a una intensificación de la respuesta inflamatoria y a las reacciones descritas anteriormente que conducen a citotoxicidad. Los macrófagos vírgenes también responden a antígenos con una respuesta de tipo Th-2. Esta respuesta se suprime por IFN γ . Estas células de tipo Th-2 producen citocinas antiinflamatorias tales como IL-4, IL-5, IL-9 y IL-10.

Se sabe que IL-10 inhibe la producción de IFN γ y por tanto amortigua la respuesta inmunitaria. El equilibrio entre células de tipo Th-1 y Th-2 y su producción de citocinas respectiva define el grado de respuesta de inflamación a un antígeno dado. Las células de tipo Th-2 también pueden estimular la producción de inmunoglobulinas por medio del sistema inmunitario. La actividad antiinflamatoria en el tracto gastrointestinal, en donde hay un nivel de TNF α reducido, se correlaciona con células epiteliales potenciadas (integridad del revestimiento de la pared intestinal) y por tanto con una reducción en los efectos negativos provocados por patógenos gastrointestinales y toxinas.

Los resultados de varios estudios de investigación indican que el ADN puede ejercer una acción antiinflamatoria sobre células epiteliales intestinales, o puede estimular al sistema inmunitario. (Madsen *et al.* y Rachmilewitz *et al.*, respectivamente, presentaciones en Digestive Disease Week, 19-22 de mayo de 2002, The Moscone Center, San Francisco).

Los ratones desarrollan espontáneamente colitis crónica, lo que no se produce en animales libres de gérmenes. La colitis en el ratón es similar a la enfermedad de Crohn en seres humanos, una enfermedad inflamatoria crónica grave del tracto gastrointestinal. La enfermedad de Crohn se produce habitualmente en los intestinos, pero puede producirse en cualquier lugar en el tracto gastrointestinal. Estos estados requieren la presencia de bacterias entéricas y son ambas formas de colitis dependientes de IL-12 mediadas por Th1. Debido a las similitudes de las causas y los síntomas, se usan modelos de ratón de colitis y otros modelos de ratón para estudiar componentes de la respuesta inflamatoria directamente, y, ya que se aplican los mismos mecanismos en el hombre, se aceptan para su uso para desarrollar tratamientos para la enfermedad gastrointestinal humana.

El documento WO 00/41707 da a conocer que *Lactobacillus salivarius* puede ser útil en la profilaxis o el tratamiento de la actividad inflamatoria no deseada, especialmente la actividad inflamatoria gastrointestinal tal como enfermedad inflamatoria del intestino o síndrome del intestino irritable.

El documento US 5.578.302 da a conocer que las úlceras de estómago pueden tratarse administrando por vía oral a un ser humano que lo necesita una cantidad eficaz anti-*Helicobacter pylori* de una composición que contiene, en combinación con un soporte ingerible, un cultivo de la cepa de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225 o una fase de sobrenadante aislada de un cultivo de la cepa de *Lactobacillus johnsonii* CNCM I-1225.

El documento JP 2001258549 da a conocer una bacteria del ácido láctico que tiene actividad antimicrobiana contra la cepa de *Helicobacter pylori* KS 51 separada de la úlcera de estómago de un paciente. Las bacterias del ácido láctico se seleccionan del género *Lactobacillus* separadas de seres humanos y conservadas, y también del género *Bifidobacterium* y *Enterococcus*. Las bacterias del ácido láctico que tienen actividad ureasa controlan la capacidad de *Helicobacter pylori* y controlan la fijación de *Helicobacter pylori* en el estómago.

Además, Coconnier *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, noviembre de 1998, págs. 4573-4580 dan a conocer la actividad antagonista contra la infección por *Helicobacter in vitro* e *in vivo* por la cepa de *Lactobacillus acidophilus* LB humana.

Lactobacillus reuteri es uno de los habitantes que se producen de manera natural del tracto gastrointestinal de animales y se encuentra de manera rutinaria en los intestinos de animales sanos y a pesar del bajo pH, también ocasionalmente en el estómago humano. Se sabe que tiene actividad antibacteriana. Véanse, por ejemplo las patentes estadounidenses n.^{os} 5.439.678, 5.458.875, 5.534.253, 5.837.238 y 5.849.289. Cuando las células de *L. reuteri* se hacen crecer en condiciones anaerobias en presencia de glicerol, producen la sustancia antimicrobiana conocida como reuterina (β -hidroxi-propionaldehído). La patente estadounidense n.^o 5.837.238 mencionada anteriormente da a conocer un método terapéutico de tratamiento de la diarrea de un paciente, tal como la provocada por rotavirus, en el que se administra al paciente una suspensión líquida de una o más cepas de *Lactobacillus reuteri*.

L. coryniformis es una especie menos conocida de *Lactobacillus* que es un habitante bastante común de la cavidad oral humana. También puede encontrarse en el suelo, estiércol y material vegetal. También se ha encontrado en ensilaje y como agente de deterioro de la cerveza, y se ha notificado una buena producción de ácido láctico así como actividad antifúngica. El aislado de *L. coryniformis* MM7 (ATCC PTA-4660) usado en el presente documento se encontró en leche materna humana.

También se ha asociado a la actividad inmunomoduladora con diversos lactobacilos. Aunque se conoce la posibilidad de una actividad antibacteriana eficaz por varios lactobacilos, no se conocía previamente que existían diferencias sustanciales entre las cepas en su capacidad para reducir la inflamación gastrointestinal, ni que tales cepas pudieran seleccionarse.

Por tanto, es un objeto de la invención proporcionar cepas de *Lactobacillus* que se han seleccionado por su capacidad de reducir la inflamación gastrointestinal, tal como la debida a *Helicobacter pylori*. Un objeto adicional de la invención es proporcionar productos que contienen dichas cepas, incluyendo agentes para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación asociada con *Helicobacter pylori* para su administración a seres humanos, incluyendo

medios condicionados en los que dichas cepas se han hecho crecer y extractos de los mismos que contienen proteínas.

5 Otros objetos y ventajas resultarán más completamente evidentes a partir de la siguiente divulgación y reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

10 La invención en el presente documento proporciona determinadas cepas de *Lactobacillus* que se han seleccionado por su capacidad de reducción de la inflamación gastrointestinal, tal como la debida a *Helicobacter pylori*, y productos derivados de dichas cepas, incluyendo agentes para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación asociada con *Helicobacter pylori* para su administración a seres humanos, e incluyen medios condicionados en los que dichas cepas se han hecho crecer y extractos que contienen proteínas de los medios condicionados.

15 Otros objetos y características de las invenciones resultarán más completamente evidentes a partir de la siguiente divulgación y reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 es un gráfico de barras que muestra el efecto de medios condicionados de *Lactobacillus* sobre la producción de TNF α por macrófagos activados por LPS. Se sometieron a prueba cuarenta y cinco cepas de *Lactobacillus*.

25 La figura 2 es un gráfico de barras que muestra el cambio en veces en la expresión de TNF α en macrófagos en presencia de medios condicionados de diversas cepas de *Lactobacillus* y LPS en comparación con macrófagos con LPS solo.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

30 La presente invención proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660.

35 En una realización adicional, la presente invención también proporciona un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659.

La presente invención también proporciona un sobrenadante de cultivo libre de células aislado de un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659.

40 La presente invención también proporciona un sobrenadante de cultivo libre de células aislado de un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660.

45 La presente invención también proporciona los cultivos biológicamente puros y los sobrenadantes libres de células de la invención para su uso en la reducción de la inflamación gastrointestinal asociada con la infección por *Helicobacter pylori* en el tracto gastrointestinal en mamíferos.

La presente invención también proporciona un producto que comprende células de una cepa de *Lactobacillus* de la invención o un sobrenadante libre de células de la invención.

50 La presente invención también proporciona una composición alimenticia que comprende un soporte ingerible y un componente que reduce la inflamación asociada con *H. pylori* derivado de una cepa de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, y la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659, en la que dicho componente comprende células de un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Lactobacillus* de la invención, o en la que dicho componente comprende un sobrenadante de cultivo libre de células de la invención.

55 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéutico y un componente que reduce la inflamación asociada con *H. pylori* derivado de una cepa de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, y la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659, en la que dicho componente comprende células de un cultivo biológicamente puro de una cepa de *Lactobacillus* de la invención, o en la que dicho componente comprende un sobrenadante de cultivo libre de células de la invención.

60 La presente invención también proporciona un complemento nutricional que comprende un soporte ingerible y un componente que reduce la inflamación asociada con *H. pylori* derivado de una cepa de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, y la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659, en la que dicho componente comprende células de un cultivo biológicamente puro

de una cepa de *Lactobacillus* de la invención, o en la que dicho componente comprende un sobrenadante de cultivo libre de células de la invención.

Por tanto, la presente invención en el presente documento proporciona cepas de *Lactobacillus* que se han seleccionado por su capacidad de reducir la inflamación gastrointestinal, tal como la debida a *Helicobacter pylori*, que son *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, y *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659. Pueden formularse tal como se conoce en la técnica productos tales como alimentos, aditivos nutricionales y formulaciones, productos farmacéuticos o dispositivos médicos que contienen células completas o componentes derivados de estas cepas, e incluyen generalmente un soporte ingerible tal como se conoce más la cepa de *Lactobacillus*, o su componente derivado. También pueden usarse en las formulaciones anteriores cepas conocidas previamente, que se identifica ahora que tienen buena capacidad de reducción de TNF α , tales como *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. reuteri* ATCC 55730 y otras. Estos productos son agentes para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación asociada con *Helicobacter pylori* para su administración a mamíferos.

Se usan sistemas modelo que usan las citocinas apropiadas para determinar factores que reducen o aumentan la inflamación. En los ejemplos proporcionados en el presente documento, se usa un ensayo de macrófagos de ratón, usando las células de macrófagos RAW 264.7 (ATCC, Rockville, MD, ATCC n.º TIB-71), para examinar cepas de bacterias, principalmente lactobacilos, para determinar su efecto sobre la ruta inflamatoria. Se usa IL-10 en este ensayo como control positivo, mostrando los tratamientos con IL-10 inhibición de citocinas proinflamatorias tales como TNF α (factor de necrosis tumoral alfa). Tras el crecimiento individual de las cepas de *Lactobacillus* que van a examinarse en medios de laboratorio, se retiran las células bacterianas vivas mediante filtración y se somete a prueba el fluido sobrenadante (también denominado "medio condicionado" en el presente documento) en el ensayo de macrófagos. Los macrófagos se estimulan en primer lugar con el antígeno proinflamatorio por ejemplo, LPS purificado (lipopolisacárido derivado de *E. coli*), ácido lipoteicoico (LTA) derivado de *S. aureus* o medio condicionado de *E. coli* o *Helicobacter* libre de células, para producir las citocinas proinflamatorias incluyendo TNF α . El medio condicionado de la cepa de *Lactobacillus*, que contiene las supuestas sustancias inmunomoduladoras derivadas de las bacterias que van a examinarse, se incuba conjuntamente con los macrófagos activados con antígeno. Se monitoriza la capacidad del medio condicionado para modular la respuesta inmunitaria de los macrófagos mediante el cambio en la producción de TNF α por las células. El perfil de TNF α del ensayo permite una selección de las cepas más eficaces en la reducción de la producción de TNF α por los macrófagos. Experimentos de control con ajuste del pH en el sistema de ensayo eliminan la posibilidad de que un pH cambiado pudiera provocar el efecto observado.

Sorprendentemente, aislados bacterianos y cepas de *Lactobacillus* aparentemente similares, incluso procedentes de fuentes humanas muy similares, muestran capacidades variables y ampliamente diferentes de influir en la producción de TNF α por macrófagos en respuesta a un antígeno proinflamatorio. Estas cepas no pueden identificarse incluso mediante determinación de la huella genética puesto que pueden ser hasta el 98% similares genéticamente pero todavía muestran efectos muy diferentes sobre las células inmunitarias. Las cepas se examinaron por tanto y se encontró que tenían un fuerte efecto inhibitorio contra la producción de citocinas proinflamatorias, estimulada, por macrófagos y son especialmente eficaces en el tratamiento de inflamación en el tracto gastrointestinal del hombre, incluyendo inflamación provocada por *H. pylori* en el estómago.

Las características de la presente invención se entenderán más claramente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos de la invención.

Ejemplo 1. Selección de cepas antiinflamatorias.

Se hicieron crecer *Lactobacillus* spp. (incluyendo por ejemplo *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. johnsonii* ATCC 33200, *L. reuteri* MM2-3 ATCC PTA-4659, *L. coryniformis*, MM7, ATCC PTA-4660) y *E. coli* Nissle en medios de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) y Luria-Bertani (LB) (Difco, Sparks, MD), respectivamente. Se diluyeron cultivos durante la noche de lactobacilos hasta una DO₆₀₀ de 1,0 (que representa aproximadamente 10⁹ células/ml) y se diluyeron adicionalmente 1:10 y se hicieron crecer durante 4, 8 y 24 h adicionales. Se cultivaron *Helicobacter pylori*, (cepa Sydney SS1) y *Helicobacter hepaticus* 3B1 (ATCC 51449) durante 48 h en caldo Brucella (Difco) complementado con suero bovino fetal al 10% (FBS). Se diluyeron los cultivos 1:10 y se hicieron crecer durante otras 24 y 48 h. Se recogió el medio condicionado libre de células bacterianas mediante centrifugación a 8500 rpm durante 10 min a 4°C. Se separó el medio condicionado del sedimento celular y entonces se filtró a través de una unidad de filtro de poro de 0,22 μ m (Millipore, Bedford, Mass.).

Se usaron las líneas celulares de monocitos/macrófagos de ratón, RAW 264.7 (ATCC TIB-71) y RAW 264.7 gamma NO(-) (ATCC CRL-2278), como células indicadoras para estudiar la ruta de respuesta inflamatoria. Se hicieron crecer células RAW 264.7 o bien en medio de Eagle modificado por Dulbecco (tipo natural) o bien en medio RPMI 1640 (gamma NO-) (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con FBS al 10% y antibiótico al 2% (penicilina 5000 unidades/ml y estreptomycin 5 mg/ml, Sigma) al 5% de CO₂, 37°C hasta una confluencia del 80-90%. Se sembraron aproximadamente 5 x 10⁴ células en agrupaciones de cultivo celular de 96 pocillos y se permitió que se adhirieran durante 2 h antes de la activación con lipopolisacárido (LPS) y la adición de medio condicionado. Se expusieron células RAW 264.7 sin tratamiento previo a LPS purificado de *E. coli* serotipo O127:B8 (Sigma). Se

5 preparó el medio de activación añadiendo 2 ng de LPS a 20 μ l de medio condicionado por pocillo. Los macrófagos o bien se preincubaron o bien se coincubaron con medio condicionado de *Lactobacillus* libre de células. Se usó mL-10 recombinante (R&D Systems, Minneapolis, Min.) como control positivo. Se evaluó la viabilidad celular mediante exclusión de azul tripano (Invitrogen). Se midió la presencia de TNF- α en sobrenadante de cultivo celular con un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich, inmunoensayo de TNF- α de ratón Quantikine M® (R & D Systems).

10 En la figura 1 se muestra el efecto de los medios condicionados de *Lactobacillus* sobre la producción de TNF α por macrófagos activados por LPS, que muestra que de las 45 cepas sometidas a prueba, varias cepas diferentes pueden disminuir la producción de TNF α por los macrófagos activados. La figura 2 muestra el cambio en veces en la expresión de TNF α con diversas cepas de *Lactobacillus* en comparación con LPS solo. Los resultados de estos estudios se usan entonces para seleccionar las cepas más eficaces. Las cepas mencionadas en las figuras pero no mencionadas específicamente en el texto son diversas cepas de *Lactobacillus*, principalmente *L. reuteri* que se sometieron a prueba.

15 En este ejemplo, se seleccionó *L. coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, usando el método anterior, para su adición a un yogur convencional. Se hizo crecer la cepa de *L. coryniformis* y se liofilizó, usando métodos convencionales para hacer crecer *Lactobacillus* en la industria láctica. Entonces se añadió este cultivo a leche previamente fermentada, usando cultivos de yogur tradicionales, a un nivel de 10E+7 UFC/gramo de yogur, y se usó el yogur por seres humanos como prevención de la gastritis provocada por *H. pylori*.

20

Ejemplo 2. Uso del medio condicionado

25 Usando el método anterior, se seleccionó el medio condicionado de una cepa que disminuye TNF α eficazmente, en este experimento el medio de *L. reuteri* ATCC PTA-4659. Se produjo este medio a mayor escala haciendo crecer la cepa en medio de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) (Difco, Sparks, MD). Se diluyeron cultivos durante la noche de lactobacilos hasta una DO₆₀₀ de 1,0 (que representa aproximadamente 10⁹ células/ml) y se diluyeron adicionalmente 1:10 y se hicieron crecer durante 24 h adicionales. Se recogió medio condicionado libre de células bacterianas mediante centrifugación a 8500 rpm durante 10 min a 4°C. Se separó el medio condicionado del sedimento celular y entonces se filtró a través de una unidad de filtro de poro de 0,22 μ m (Millipore, Bedford, Mass.). Entonces se liofilizó el medio condicionado y se formuló, usando métodos convencionales, para preparar un comprimido. Se usó este comprimido como fármaco por seres humanos para tratar la úlcera provocada por *H. pylori*.

30

Ejemplo 3. Obtención de la huella de ADN de cepas de *Lactobacillus reuteri*

35 Se usó el método de las patentes estadounidenses n.ºs 5.523.217 y 5.691.136 de Lupski *et al.* para realizar la obtención de la huella genómica de cepas de *L. reuteri*. Este método utiliza amplificación del ADN bacteriano añadiendo una parte de cebadores dirigidos hacia fuera a la muestra bacteriana. Tras la amplificación, los productos de extensión de la hibridación resultante se separan por tamaño, y la cepa de bacterias se caracteriza midiendo el patrón de productos de extensión dimensionados. Se obtuvieron imágenes de geles por duplicado para 82 cepas de *L. reuteri* por Bacterial BarCodes, Inc. (Houston, TX) usando el cebador Uprime E (un cebador). Los conjuntos de datos por duplicado eran comparables. Había un total de 11 agrupaciones, que eran diferentes entre sí, y ocho resultados atípicos, que parecían ser únicos.

40

45 Las cepas que se encontró que eran eficaces en la reducción del TNF- α (véanse las figuras 1 y 2) no se agrupan juntas usando este método, lo que muestra que no es suficiente usar la obtención de la huella de ADN de este modo para encontrar varias cepas con capacidad de reducción de TNF α .

Ejemplo 4. Caracterización de proteína producida por cepas de *Lactobacillus* eficaces

50 Se trataron diferentes medios condicionados de *Lactobacillus* eficaces, incluyendo el medio condicionado de la cepa de *L. reuteri* MM2-3, con diversos compuestos desnaturalizantes para determinar la naturaleza de las supuestas inmunomodulinas derivadas de las bacterias. Por tanto, se sometieron los medios condicionados a congelación-descongelación repetitiva, tratamiento térmico, digestión con enzimas que digieren el ADN, proteasas y proteasas inactivadas. Se determinó de este modo que la supuesta inmunomodulina tenía una naturaleza de una o más proteínas o péptidos. Para determinar el tamaño de la supuesta proteína inmunomodulina, se fraccionó el medio condicionado mediante filtración y se sometieron a prueba los filtrados para determinar su eficacia. De este modo, se encontró que el componente activo de los medios condicionados de cepas de *Lactobacillus* eficaces tenía un tamaño de aprox. 5 kDa o menos.

55

REIVINDICACIONES

1. Cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660.
- 5 2. Cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659.
3. Sobrenadante de cultivo libre de células aislado de un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659.
- 10 4. Sobrenadante de cultivo libre de células aislado de un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660.
5. Cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 1 o reivindicación 2 o sobrenadante de cultivo libre de células según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, para su uso en la reducción de la inflamación gastrointestinal asociada con infección por *Helicobacter pylori* en el tracto gastrointestinal en mamíferos.
- 15 6. Producto que comprende células de la cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el sobrenadante libre de células según la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 20 7. Composición alimenticia que comprende un soporte ingerible y un componente que reduce la inflamación asociada con *H. pylori* derivado de una cepa de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, y la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659, en la que dicho componente comprende células de un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o en la que dicho componente comprende el sobrenadante de cultivo libre de células según la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 25 8. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéutico y un componente que reduce la inflamación asociada con *H. pylori* derivado de una cepa de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, y la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659, en la que dicho componente comprende células de un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o en la que dicho componente comprende el sobrenadante de cultivo libre de células según la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 30 9. Complemento nutricional que comprende un soporte ingerible y un componente que reduce la inflamación asociada con *H. pylori* derivado de una cepa de *Lactobacillus* seleccionada del grupo que consiste en la cepa de *Lactobacillus coryniformis* MM7, ATCC PTA-4660, y la cepa de *Lactobacillus reuteri* MM2-3, ATCC PTA-4659, en el que dicho componente comprende células de un cultivo biológicamente puro de la cepa de *Lactobacillus* según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o en el que dicho componente comprende el sobrenadante de cultivo libre de células según la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
- 35 40

FIGURA 1

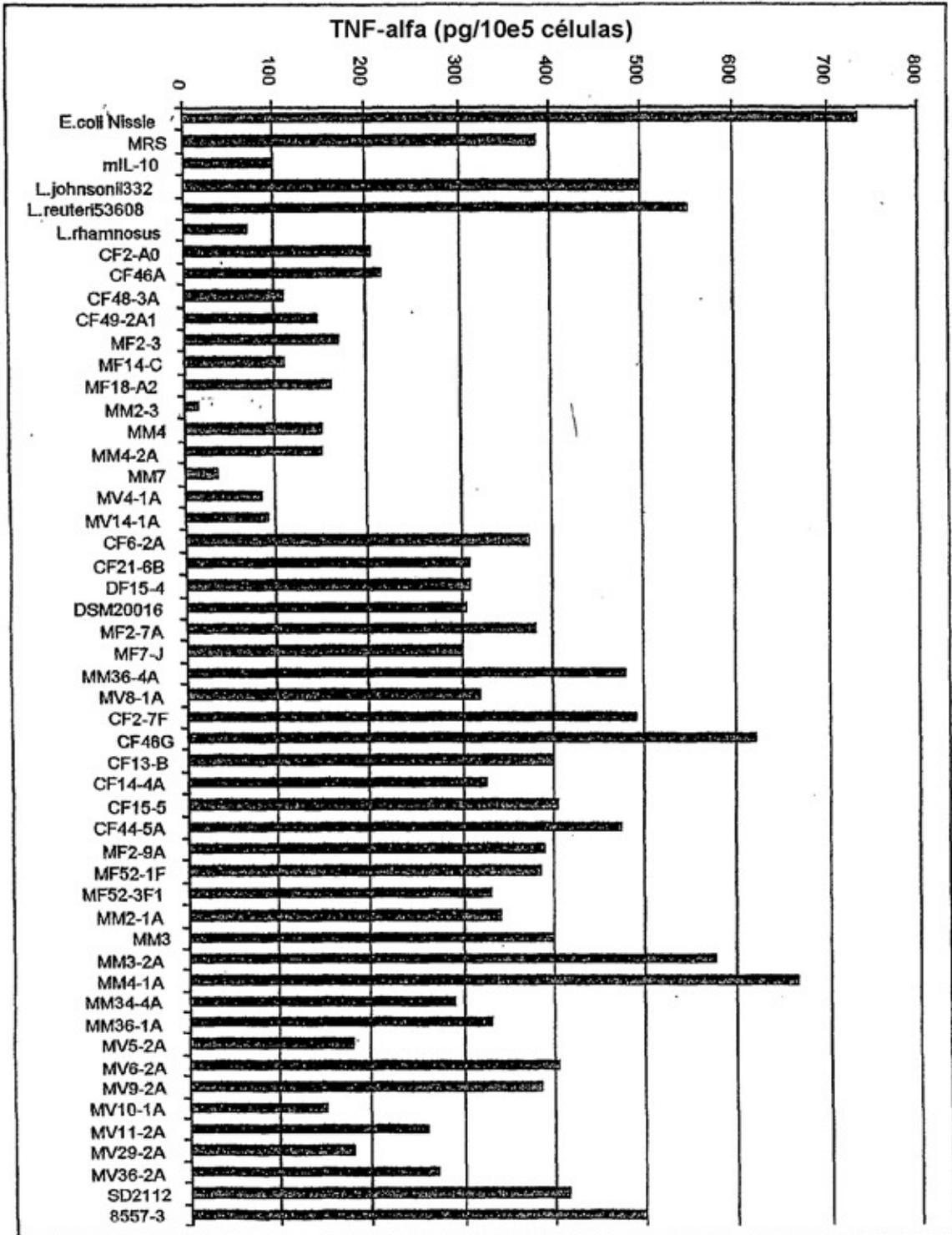


FIGURA 2

