

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 028**

51 Int. Cl.:

C12R 1/24 (2006.01)

A61K 31/357 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A23C 9/123 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/IB2011/055391**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13079992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11799493 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2785878**

54 Título: **Lactobacillus brevis productor de reuterina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2017

73 Titular/es:
**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:
**GARAULT, PEGGY;
QUERE, GAËLLE y
BOURDET-SICARD, RAPHAELLE**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 611 028 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lactobacillus brevis productor de reuterina

La presente invención se refiere a cepas productoras de reuterina de *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*) y a sus usos, en particular para el tratamiento o la prevención de la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) y de las afecciones resultantes de la misma.

La reuterina (3-hidroxi propionaldehído, 3-HPA) es un compuesto antimicrobiano que inicialmente se identificó como producido por un número de cepas de *Lactobacillus reuteri* (*L. reuteri*) cuando se cultivaban bajo condiciones anaerobias en presencia de glicerol (Talarico y Dobrogosz, *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 674-9, 1989). La conversión de glicerol a reuterina es catalizada por una glicerol deshidratasa dependiente de cobalamina (Gld; EC 4.2.1.30), que está compuesta por tres subunidades (C, D y E, o α , β y γ respectivamente). Además, también se ha informado de la existencia de la ruta de la Glicerol deshidratasa (GDA) en otras especies de lactobacilos tales como *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus brevis*, y *Lactobacillus hilgardii*. Para todas las especies, la existencia de esta ruta parece variar de una cepa a otra, dependiendo de la presencia de un gen codificador de la glicerol deshidratasa o diol deshidratasa (Cadieux *et al.*, *Appl Environ Microbiol.*, 74, 4.645-9, 2008; Sauvageot *et al.*, *FEMS Microbiology Letters*, 209, 69-74, 2002; Claisse y Lonvaud-Funel, *Journal of Food Protection*, 64, 833-837, 2001). En la mayoría de las bacterias que metabolizan glicerol a través de la ruta de la GDA, normalmente la reuterina es un intermediario metabólico que posteriormente se reduce intracelularmente a 1,3-propanodiol, (1,3-PD), que se excreta en el medio extracelular. Solamente algunas de las cepas que poseen una glicerol o diol deshidratasa tienen la capacidad de acumular reuterina en el medio de cultivo. La mayoría de estas cepas que acumulan reuterina pertenece a la especie *L. reuteri*. Sin embargo, se ha informado sobre algunas cepas que tienen la capacidad de acumular reuterina extracelularmente, generalmente en menor grado que *L. reuteri*, en otras especies de lactobacilos: *Lactobacillus coryniformis* (Martin *et al.*, *Int J Food Microbiol*, 104, 267-77, 2005), *Lactobacillus collinoides* (Garai-Ibabe *et al.*, *International Journal of Food Microbiology* 121, 253-261, 2008; Sauvageot *et al.*, *International Journal of Food Microbiology*, 55, 167-170, 2000), y *Lactobacillus hilgardii* (Pasteris y Strasser de Saad, *J. Agric. Food Chem.*, 57 (9), 3.853-3.858, 2009). Más recientemente, se han descrito (Bauer *et al.*, *International Journal of Food Microbiology*, 137, 28-31, 2010) una cepa de *Lactobacillus brevis* y una cepa de *Lactobacillus pentosus* con la capacidad de acumular reuterina extracelularmente (en concentraciones, sin embargo, 10 veces menores que *L. reuteri*).

La reuterina tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana sobre microorganismos potencialmente dañinos. La reuterina puede inhibir el crecimiento de levaduras, hongos, protozoos y diversas bacterias perjudiciales en concentraciones de cuatro a cinco veces menores que las necesarias para inhibir el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Debido a esta actividad antimicrobiana selectiva de la reuterina, que le permite destruir una diversidad de microorganismos patógenos mientras que no daña las beneficiosas bacterias ácido lácticas de la flora intestinal, se ha propuesto su uso para el tratamiento de diversos trastornos digestivos.

Varias cepas de *L. reuteri* se han considerado como probióticos candidatos debido, en particular, a sus efectos protectores frente agentes patógenos tales como *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, y *Helicobacter pylori* (Cleusix *et al.*, *BMC Microbiol*, 7, 101, 2007; Spinler *et al.*, *Anaerobe*, 14, 166-71, 2008; Francavilla *et al.*, *Helicobacter*, 13, 127-34, 2008; documento PCT WO 2004/031368). Estos efectos se han relacionado, al menos en parte, con la producción de reuterina.

Entre los microorganismos patógenos del tracto digestivo, *Helicobacter pylori* ha sido centro de un creciente interés en los últimos años. Es una bacteria gram negativa de forma en espiral que coloniza la capa de mucosa gástrica humana en más del 50% de la población mundial. A pesar de que la mayor parte de las personas infectadas con *H. pylori* es asintomática aunque su epitelio gástrico muestre signos de inflamación, del 15% al 20% de los sujetos infectados con *H. pylori* desarrollará enfermedades. *H. pylori* es el principal agente causante de enfermedades de úlcera péptica, gastritis activa crónica, atrofia, metaplasia, displasia, cáncer gástrico y linfoma del tejido linfóide asociado a la mucosa gástrica (MALT, del inglés "Mucosa Associated Lymphoid Tissue") (véase, como reseña (Fox y Wang, *J Clin Invest*, 117, 60-9, 2007; Polk y Peek, *Nat Rev Cancer*, 10, 403-14)).

El tratamiento estándar en pacientes infectados con *H. pylori* es de dos antibióticos más un tratamiento con PPI (inhibidores de bomba de protones), la así llamada terapia triple. Sin embargo, la tasa de erradicación de *H. pylori* después de la terapia triple está decayendo debido a la resistencia a los antibióticos o a una falta de cumplimiento. Además, a pesar de varios ensayos, todavía no hay disponible en el mercado una vacuna eficaz.

Se ha propuesto el uso de probióticos como alternativas o complementos a la terapia triple para el tratamiento o la prevención de *H. pylori*. Tal como se indicó anteriormente, estos probióticos incluyen, en particular, *L. reuteri*, debido, en particular, a sus propiedades antimicrobianas. También se han propuesto algunas cepas de otras especies de lactobacilos como potencialmente útiles para la gestión de la infección por *H. pylori*. Por ejemplo, Simova *et al.* (*J Appl Microbiol*, 106, 692-701, 2009), describen una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* (BB18) que produce un péptido inhibidor (bacteriocina) e inhibe fuertemente *H. pylori*. Linsalata *et al.* (*Helicobacter*, 9, 165-72, 2004), estudiaron los efectos de una cepa particular de *L. brevis* (CD2) con alta actividad de arginina deiminasa sobre la supervivencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica humana. Descubrieron una reducción de la carga

intragástrica de *H. pylori*, y sugirieron que podría ser debido a la elevada actividad de la arginina deiminasa, que privaría a *H. pylori* de arginina e inhibiría su crecimiento y proliferación.

Los inventores ahora han aislado una cepa de *Lactobacillus brevis* que tiene la capacidad de producir reuterina y de acumularla en cantidad suficiente para que tenga actividad antimicrobiana sobre una amplia gama de cepas de *H. pylori*.

Una cepa “con la capacidad de acumular reuterina” o una “cepa acumuladora de reuterina” se la define en la presente memoria como una cepa que tiene la capacidad de producir reuterina y de excretarla extracelularmente.

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es esta cepa de *L. brevis* que se ha depositado de acuerdo con el Tratado de Budapest en la CNCM (“Collection Nationale de Cultures de Microorganismes” [Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos de Francia], 25 rue du Docteur Roux, Paris) el 3 de febrero de 2011, con el número de registro CNCM I-4431.

Además de su capacidad para producir y acumular reuterina, esta cepa tiene las siguientes características:

- Morfología: bacterias en forma de bastón con coloración homogénea, agrupadas en cadenas pequeñas;
- Metabolismo: heterofermentativo;
- Fermentación de los siguientes azúcares (resultados obtenidos sobre una tira Api 50 CH –medio API MRS a 37 °C durante 48 h): L-Arabinosa, D-Ribosa, D-xilosa, D-Glucosa, D-Fructosa, D-Maltosa, D-Melibiosa, Gluconato de Potasio, 5-Cetogluconato de Potasio.

La presente invención también describe cepas acumuladoras de reuterina de *L. brevis* derivadas por mutagénesis o por transformación genética de la cepa CNCM I-4431, siempre y cuando conserven las propiedades antimicrobianas y la capacidad de producir reuterina de esta cepa madre. Pueden ser cepas en las que uno o más de los genes endógenos de la cepa CNCM I-4431 ha(n) mutado, por ejemplo, para modificar alguna de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, la capacidad de esta cepa de metabolizar azúcares, su resistencia al tránsito intestinal, su resistencia a la acidez o su acidificación posterior). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa CNCM I-4431 con uno o más genes de interés, que hace(n) posible, por ejemplo, conferir características fisiológicas adicionales a dicha cepa, o expresar proteínas de interés terapéutico o como vacuna, que es lo deseado para administrar por medio de dicha cepa.

Estas cepas se pueden obtener a partir de la cepa CNCM I-4431 por medio de las técnicas convencionales para la mutagénesis aleatoria o dirigida a sitios y la transformación genética de lactobacilos, tales como las descritas, por ejemplo, por Gury *et al.* (*Arch Microbiol.*, 182, 337-45, 2004) o por V *et al.* (*Appl Environ Microbiol.*, 73, 3.595–3.604, 2007), o por medio de la técnica conocida como “barajado del genoma” (“shuffling”) (Patnaik *et al.* *Nat Biotechnol.*, 20, 707-12, 2002; Wang Y. *et al.*, *J Biotechnol.*, 129, 510-15, 2007).

Un objeto de la presente invención es también un método para obtener una cepa acumuladora de reuterina de *Lactobacillus brevis*, que comprende una etapa de mutagénesis o transformación genética de la cepa CNCM I-4431.

Las cepas de *L. brevis* de la presente invención se pueden usar para la producción de reuterina. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es un método para producir reuterina, que comprende las etapas de:

- cultivar la cepa de *L. brevis* de la invención, como se definió anteriormente, la cepa CNCM I-4431, en presencia de glicerol y
- recuperar la reuterina producida por el cultivo.

Un objeto de la presente invención es también una composición que comprende una cepa de *L. brevis* de la invención, la cepa CNCM I-4431.

En la composición de la presente invención, dicha cepa se puede usar en forma de bacterias enteras, preferiblemente bacterias vivas.

Las composiciones de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración, en particular, la administración oral. Esto incluye, por ejemplo, sólidos, semisólidos, líquidos y polvos. Por lo general, se prefiere la composición líquida para una administración más fácil, por ejemplo, como bebidas.

La composición puede comprender al menos 10^5 ufc, preferiblemente al menos 10^6 ufc, por gramo de peso seco, de una cepa de *L. brevis* de la invención.

La composición puede constar, además, de otras cepas de bacterias, en particular cepa(s) probiótica(s), tales como cepa(s) de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* o *Lactococcus*.

Generalmente, la composición puede comprender 10^5 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos 10^6 ufc, más preferiblemente al menos 10^7 ufc, aún más preferiblemente al menos 10^8 ufc y lo más preferiblemente al menos 10^9 ufc por gramo de peso seco de la composición de la cepa de *L. brevis* de la invención. En el caso de una composición líquida, generalmente esto corresponde a 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos 10^5 ufc, más preferiblemente al menos 10^6 ufc, aún más preferiblemente al menos 10^7 ufc y lo más preferiblemente al menos 10^9 ufc/ml.

La composición puede ser una composición nutricional, incluyendo productos alimenticios, suplementos alimenticios y alimentos funcionales. Un "suplemento alimenticio" designa un producto fabricado a partir de compuestos normalmente usados en los productos alimenticios, pero que está en forma de pastillas, polvo, cápsulas, pócimas o cualquier otra forma normalmente no asociada con alimentos, y que tiene efectos benéficos para la salud de la gente. Un "alimento funcional" es un alimento que también tiene efectos benéficos para la salud de la gente. En particular, los suplementos alimenticios y los alimentos funcionales pueden tener un efecto fisiológico, protector o curativo, frente una enfermedad, por ejemplo, frente una enfermedad crónica.

La composición nutricional según la invención también incluye un alimento de bebés, una fórmula de leche maternizada o una fórmula de seguimiento infantil. Preferiblemente, la presente composición es un producto nutracéutico o farmacéutico, un suplemento nutricional o un alimento médico.

La composición puede ser un producto lácteo, preferentemente un producto lácteo fermentado. El producto fermentado puede estar presente en forma de líquido o presente en forma de polvo seco obtenido mediante el secado del líquido fermentado. Ejemplos de productos lácteos incluyen la leche fermentada y/o el suero lácteo fermentado en forma cuajada, batida o bebible, queso y yogurt.

El producto fermentado también puede ser un vegetal fermentado, tal como soja fermentada, cereales y/o frutas en forma de cuajada, batida o bebible.

En una realización preferida, el producto fermentado es un producto fresco. Un producto fresco, el cual no sufrió etapas rigurosas de tratamiento por calor, tiene la ventaja de que las cepas bacterianas presentes están en forma viva.

Un objeto de la presente invención también es una cepa de *L. brevis* de la presente invención, la cepa CNCM I-4431, o una composición de la invención para usarse como medicamento. Las cepas y composiciones de *L. brevis* de la presente invención son particularmente útiles para el tratamiento o la prevención de la infección por *H. pylori*.

Un objeto de la presente invención también es el uso de una cepa de *L. brevis* de la invención, la cepa CNCM I-4431, o una composición de la invención como medicamento, o para la fabricación de un medicamento, preferentemente un medicamento para el tratamiento o la prevención de la infección por *H. pylori*.

Un objeto de la presente invención también es un método para el tratamiento o la prevención de la infección por *H. pylori* en un sujeto en necesidad del mismo, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de una cepa de *L. brevis* de la invención, la cepa CNCM I-4431, o de una composición de la invención.

La presente invención también abarca un método para la fabricación de un medicamento, preferiblemente un medicamento para el tratamiento o la prevención de la infección por *H. pylori*, comprendiendo dicho método la incorporación de una cepa de *L. brevis* como se definió anteriormente, la cepa CNCM I-4431, en al menos un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los métodos para diagnosticar una infección por *H. pylori* son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, el diagnóstico de una infección por *H. pylori* se puede hacer haciendo un chequeo mediante una prueba de anticuerpos en sangre, una prueba de antígenos en las heces o la prueba del aliento con urea marcada con carbono. También se puede hacer mediante una biopsia bajo endoscopia seguida por una prueba de ureasa, un examen histológico o un cultivo microbiano.

Los síntomas o las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori* son, en particular, dolor de estómago, ardor de estómago, reflujo de ácido, dolor abdominal, regurgitación, vómitos, eructos, flatulencia, náuseas, esofagitis, gastritis tal como gastritis activa crónica, enfermedades de úlcera péptica, atrofia, metaplasia, displasia, cáncer gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrico (MALT).

La presente invención se entenderá con mayor claridad a partir de la descripción adicional que viene a continuación, la cual se refiere a ejemplos que ilustran las propiedades inmunomoduladoras antimicrobianas y antiinfecciosas de la cepa CNCM I-4431, así como a partir de las figuras anexas.

La figura 1 muestra los resultados de la reacción PCR de las cepas de *Lactobacillus brevis* para la secuencia de *gldC*. La banda superior en 728 pb representa el producto esperado al usar los cebadores ("primers") específicos del gen *gldC*. La banda inferior en 201 pb representa el producto esperado al usar los cebadores específicos del gen *16S rRNA* (control PCR positivo); Smart: Escala SMART de ADN (Eurogentec); C+: resultado de PCR obtenido del

ADN control a partir de la cepa positiva para *gldC* de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730; I-4431: resultado de PCR obtenido a partir del ADN de la cepa CNCM I-4431 de *L. brevis*; *L. brevis* 80: resultado de PCR obtenido a partir del ADN del *L. brevis* 80 C-: resultado de PCR obtenido a partir del ADN control de una cepa negativa para *gldC* de *Streptococcus thermophilus*; H₂O: resultado de PCR obtenido a partir de agua estéril.

- 5 La Figura 2 muestra la cuantificación de *H. pylori* (cepa NTCTC11637) en *C. elegans* después de la ingestión de solo *H. pylori* (barra negra), de *H. pylori* + la cepa I-4431 de *L. brevis* cultivada en MRS (barra gris oscuro), de *H. pylori* + la cepa I-4431 de *L. brevis* cultivada en MRS con glicerol (barra blanca), o de *H. pylori* + MRS con glicerol.

Ejemplo 1: Inhibición *in vitro* del crecimiento de cepas de *H. pylori* por la cepa *L. brevis* CNCM I-4431

Material y Métodos

- 10 Cepas de *Lactobacillus brevis*:

- *L. brevis* CNCM I-4431;
- *L. brevis* 80: Una cepa convencional de *L. brevis*.

Cepas de *Helicobacter pylori*:

Se utilizaron tres cepas de referencia de *H. pylori*, así como cinco aislados clínicos.

- 15 Cepas de referencia:

- 26695: descrita en TOMBS *et al.* (*Nature* 388, 539–547, 1997);
- HPAG1: descrita en OH *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 9.999-10.004, 2006);
- TN2GF4: aislada en Japón de un paciente con úlcera gástrica y adaptada al gerbo de Mongolia (cepa descrita en Watanabe, *et al. Gastroenterol* 1998; vol. 115, pp. 642-648).

- 20 Aislados clínicos:

- CR113 y CR114: cepas aisladas de biopsias de lesiones gástricas precancerosas humanas;
- Axcn 342 y Axcn 374: cepas aisladas de un paciente con gastritis y de un paciente con esofagitis, respectivamente, incluidos en un estudio clínico ensayaba una terapia cuádruple para la erradicación de *H. pylori* (Malfertheiner *et al.*, *Lancet*, 377, 905-913, 2011);
- GC3C: cepa aislada de un paciente con cáncer gástrico.

Método:

Se cultivaron cepas de *L. brevis* en Caldo MRS (pH 6,2) durante 17 horas. Las suspensiones bacterianas se neutralizaron a pH 6,8 con una solución de KOH.

- 30 Se cultivaron cepas de *H. pylori* durante 48 horas en Caldo de Brucella hasta que se obtuvo una turbidez equivalente al patrón MacFarland 4. Las suspensiones bacterianas se extendieron sobre las superficies de placas de agar Mueller Hinton que tenían un suplemento de sangre de oveja al 10 % (v/v), enriquecida con un suplemento de Polyvitex al 1% (v/v) (Biomérieux) y en el mismo medio con glicerol a una concentración final de 100 mM para permitir la producción de reuterina.

- 35 Sobre la superficie de las placas se aplicaron discos de papel estéril. A continuación, sobre cada disco de papel se aplicaron 5 µL de la suspensión neutralizada de *L. brevis*. Las placas se incubaron a 37°C bajo atmósfera microaerófila (clasificador de gases Microaerófilico Ruskin, dando como resultado O₂ al 5%, CO₂ al 10%, y N₂ al 85%) durante de 72 horas a 96 horas.

Para evaluar el efecto de la suspensión de *L. brevis* sobre el crecimiento de la cepa de *H. pylori*, se midieron la anchura de los anillos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos de papel.

- 40 Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla I de a continuación

Tabla I

	26695	HPAG1	TN2GF4	CR113	CR114	Axcan 342	Axcan 374	GC3C
<i>L. brevis</i> I-4431								
Anillo de inhibición en mm	30	30	15	15	10	30	11	30
<i>L. brevis</i> I-4431								
Anillo de inhibición en mm (sin glicerol)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. brevis</i> 80								
Anillo de inhibición en mm	0	0	0	15	0	0	0	40
<i>L. brevis</i> 80								
Anillo de inhibición en mm (sin glicerol)	0	0	0	0	0	0	0	0

5 Estos resultados muestran que mientras que *L. brevis* 80 tiene propiedades inhibitoras sobre solamente dos de las cepas de *H. pylori* ensayadas, *L. brevis* I-4431 inhibe el crecimiento de 8 de las 8 cepas de *H. pylori* ensayadas. Estas propiedades inhibitoras parecen estar conectadas con la acumulación de reuterina, ya que sólo se observan con los cultivos de *L. brevis* cultivados en presencia de glicerol.

Ejemplo 2: Cribado por PCR del gen *gldC*

Material y Métodos

10 Se ensayó la presencia en *L. brevis* CNCM I-4431 del gen que codifica la subunidad grande de la glicerol deshidratasa (GldC) – la enzima responsable de la producción de reuterina – siguiéndose el método descrito por Cadieux *et al.* (2008, anteriormente citado).

En resumen, se aisló ADN total de cada una de las cepas bacterianas ensayadas.

Como control positivo (C+), se usó la cepa productora de reuterina *L. reuteri* ATCC 55730. Como control negativo (C-), se usó una cepa de una especie no productora de reuterina (*Streptococcus thermophilus*).

15 La amplificación de un fragmento del gen codificador de la subunidad grande de Gld (*gldC*) se llevó a cabo con los cebadores degenerados:

GDCRev: GCRGCYTTSATATCTKSAACCAT (SEQ ID NO: 1) y

GDCFor: GCMTAYGCWGAACCATTTTCAGTTTA (SEQ ID NO: 2),

ambos descritos en Cadieux *et al.* El tamaño esperado del fragmento amplificado de *gldC* es de 728 pb.

20 Como control positivo de la reacción de PCR, también se amplificó un fragmento del gen *16S rRNA* de todas las muestras usando los cebadores eubacterianos:

16SFor: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG (SEQ ID NO: 3) y

16SRev: GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC (SEQ ID NO: 4),

ambos también descritos en Cadieux *et al.*

El tamaño esperado del fragmento amplificado del *16S RNAr* es de 201 pb.

25 Resultados

Los resultados de la reacción de PCR se muestran en la Figura 1. La cepa *L. brevis* CNCM I-4431, *L. brevis* 80 así como la cepa productora de reuterina (C+) *L. reuterii* ATCC 55730 fueron positivas para el producto esperado de 728 pb. Por consiguiente, la cepa *L. brevis* CNCM I-4431 contiene el gen *gldC*, permitiéndola producir reuterina.

Ejemplo 3: Efecto de *L. Brevis* CNCM I-4431 sobre la infección por *H. Pylori* en un modelo con *C. Elegans*

Cultivos de *L. brevis* y *H. pylori*

Se cultivó la cepa *L. brevis* CNCM I-4431 en Caldo MRS como se describió en el Ejemplo 1.

- 5 Se cultivó la cepa NCTC11637 (ATCC 43504^T) de *H. pylori* en medio BHI (Oxoid) que contenía sangre de caballo al 5% (v/v) (Oxoid).

De las células se separaron los sobrenadantes por centrifugación y se neutralizaron con NaOH (1M). A continuación, los sobrenadantes se filtraron (0,22 µm) y se añadieron al sedimento (“pellet”) celular.

- 10 En el caso de los cultivos de *H. pylori*, se separó por centrifugación el medio BHI que contenía sangre de caballo (Oxoid) y las células se lavaron con solución salina.

- 15 Las placas de agar NG usadas para los ensayos de infección de *C. elegans* se prepararon por adición de 100 µL de una mezcla que contenía cada cultivo LAB a D.O.= 2,22 (incluyendo las células y el sobrenadante) con las correspondientes células de la cepa de *H. pylori* (D.O.= 0,022). En la condición de referencia, en las que los nematodos no se alimentan con LAB, las células de *H. pylori* se volvieron a poner en suspensión en solución salina y se añadieron a las placas.

Ensayos de infección de *C. elegans*.

Los ensayos de infección se realizaron con la cepa de tipo silvestre de *C. elegans* (N2). Se empleó la cepa NCTC11637 de *H. pylori* para la infección de nematodos. Los experimentos se iniciaron con adultos jóvenes sincronizados (nematodos de tres días) que se transfirieron a las diferentes condiciones de cultivo:

- 20 - medio NG + *E. coli* OP50 (control),
 - medio NG + *E. coli* OP50 + 100 µL de medios de cultivo LAB (control de los medios de cultivo),
 - medio NG + *E. coli* OP50 + 100 µL (*H. pylori* NCTC 11637^T + LAB).

- 25 Los gusanos se incubaron a 25 °C durante 8 días, transfiriéndolos a placas nuevas cada dos días. Se anotó la supervivencia de la población de nematodos en cada condición de cultivo. Después del período de incubación se tomaron muestras de 15 gusanos por condición, lavándolas con solución tampón M9 que contenía Triton X-100 al 0,1 %. Los gusanos se rompieron usando 0,4 g de perlas de carburo de silicio y agitando en vórtex.

El ADN de los gusanos infectados se aisló con un equipo comercial “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche), seguido de una precipitación posterior y un proceso de lavado con etanol absoluto y acetato de potasio 5M. Se usaron diluciones de muestras de ADN para cuantificar, por RT-PCR, la presencia de *H. pylori* en las muestras.

- 30 RT-PCR

- 35 Los cebadores usados en este estudio están dirigidos al gen *vacA* (Nayak y Rose, *J Appl Microbiol*, 103, 1.931-41, 2007). Se denominan HpyIF (5' CAA TAG CAA TCA AGT GGC TTT G 3', SEQ ID NO: 5) y HpyIR (5' GCG CGC TTC CAC ATT AGC 3'; SEQ ID NO: 6). La especificidad se comprobó previamente *in silico* mediante la herramienta en línea BLAST e, *in vitro*, mediante Q-PCR con cepas de la especie *H. pylori*, diferentes cepas probióticas y *E. coli* OP50 usadas para alimentar a *C. elegans* (véase el informe previo sobre optimización). Se utilizó la Mezcla Maestra de PCR SYBR® Green (Applied Biosystem) y el termociclador en Tiempo Real StepOne (Applied Biosystem). La siguiente Tabla 2 resume las condiciones optimizadas para la reacción Q-PCR sobre *H. pylori*.

Tabla 2.

Mezcla de reacción			
Mezcla maestra 2x			1x
cebador directo ("For"):			325 nM
cebador inverso ("Rev"):			325 nM
Ciclado térmico			
Etapa de mantenimiento		50 °C	2 min
	95 °C		10 min
Etapa de ciclado (x40)		95 °C	15 s
	60 °C		1 min

El ADN para la curva patrón se preparó mediante la cuantificación del ADN de *H. pylori* por espectrofotometría (A260). El número de los correspondientes genomas se calculó como siguiente:

- 5
- Número de Genoma = $\text{ADN (g)} \times \text{NA/Mm}$
 - Tamaño del genoma de *H. Pylori* = 1,6 Mpb
 - NA = $6,023 \times 10^{23}$
 - Número de Genoma = $\text{ADN (g)} \times 6,023 \times 10^{23} / 1,6 \times 10^6 \times 2 \times 309$

La curva patrón se realizó usando cuatro diluciones 1/10 de ADN.

- 10
- Los resultados obtenidos con la cepa I-4431 cultivada en MRS o cultivada en MRS + glicerol se muestran en la Figura 2. Estos resultados muestran que la cepa CNCM I-4431 reduce la carga de *H. pylori* NCTC 11637^T en *C. elegans*. La reducción de la infección es más importante cuando la cepa I-4431 se cultiva en MRS + glicerol, lo que demuestra que al menos parte del efecto antiinfeccioso de esta cepa es resultado de la producción de reuterina.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> COMPAGNIE GERVAIS DANONE
GARAULT, Peggy
QUERE, Gaelle
BOURDET-SICARD, Raphaelle

<120> LACTOBACILLUS BREVIS PRODUCTOR DE REUTINA

<130> MJP11-F191-250WO

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PCR cebador

<400> 1

gcrqcyttsa tatctksaac cat

<210> 2

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PCR cebador

<400> 2

gcmtaygcwg aaaccatttc agttta

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PCR cebador

<400> 3

actcctacgg gaggcagcag

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> PCR cebador

<400> 4

gtattaccgc ggctgctggc ac

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> **Secuencia Artificial**

<220>
<223> PCR cebador

<400> 5
caatagcaat caagtggctt tg

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> **Secuencia Artificial**

<220>
<223> PCR cebador

<400> 6
gcgcgcttcc acattagc

REIVINDICACIONES

- 1) Una cepa acumuladora de reuterina de *Lactobacillus brevis* que es la cepa CNCM I-4431 de *Lactobacillus brevis*.
- 2) El uso *in vitro* de la cepa de *Lactobacillus brevis* de la reivindicación 1 para producir reuterina.
- 5 3) Una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus* de la reivindicación 1.
- 4) La composición según la reivindicación 3, que se caracteriza porque comprende al menos 10^5 ufc, preferiblemente al menos 10^6 ufc, por gramo de peso seco, de dicha cepa de *Lactobacillus brevis*.
- 5) La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, caracterizada porque es una composición nutricional.
- 10 6) La composición de la reivindicación 5, caracterizada porque es un producto lácteo.
- 7) Una cepa de *Lactobacillus brevis* de la reivindicación 1 o una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 para su uso como medicamento.
- 8) La cepa de *Lactobacillus brevis* o la composición para su uso como medicamento según la reivindicación 7, caracterizada porque dicho medicamento es para el tratamiento o la prevención de una infección por *H. pylori*.
- 15 9) Un método para obtener una cepa acumuladora de reuterina de *Lactobacillus brevis*, que comprende una etapa de mutagénesis o transformación genética de la cepa de la reivindicación 1.
- 10) Un método para la producción de reuterina que comprende las etapas de:
- cultivar la cepa de *Lactobacillus brevis* de la reivindicación 1 en presencia de glicerol y
 - recuperar la reuterina producida por el cultivo.

20

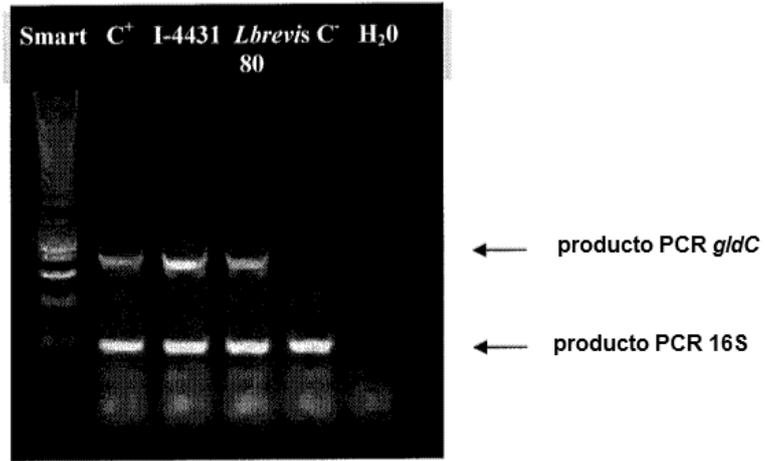


Figura 1

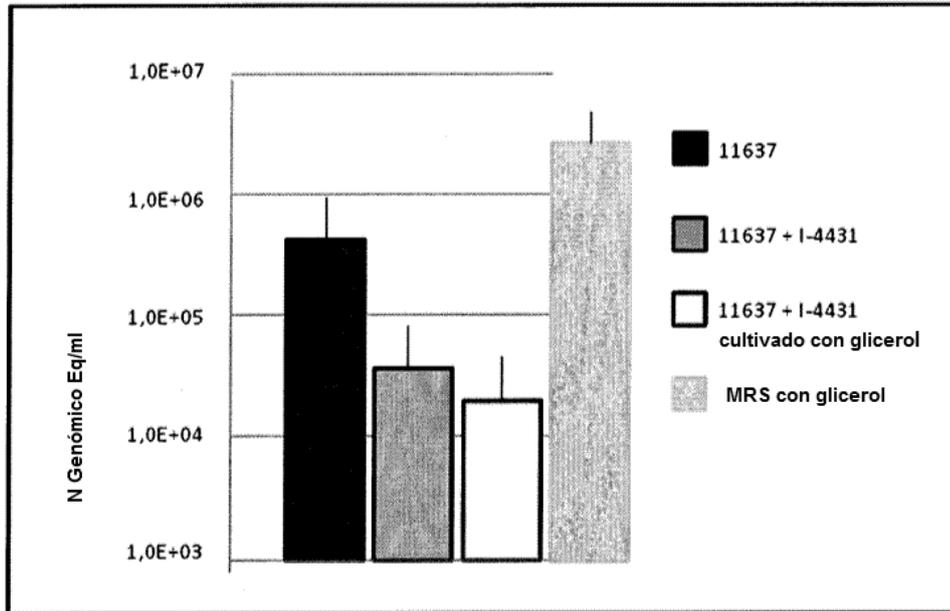


Figura 2