

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 767**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**A61K 35/747** (2015.01)

**A23C 9/123** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.08.2011 PCT/IB2011/053552**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13021239**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2011 E 11755445 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2742125**

54 Título: **Nueva cepa de L. Bulgaricus capaz de inhibir la adhesión de cepas de H. Pylori a células epiteliales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.07.2017**

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)  
17, Boulevard Haussmann  
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GARAULT, PEGGY;  
QUERE, GAELLE;  
BOURDET-SICARD, RAPHAËLLE y  
MEGRAUD, FRANCIS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 627 767 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

Nueva cepa de *L. Bulgaricus* capaz de inhibir la adhesión de cepas de *H. Pylori* a células epiteliales

La presente invención se refiere al campo de los probióticos. Particularmente, la invención se refiere a una nueva cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, útil para el tratamiento o la prevención de la infección por *Helicobacter pylori*.

Según una definición aprobada recientemente por la Asociación Nacional de Yogur (NYA, del inglés National Yogurt Association) o el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI, del inglés International Life Science Institute) en los EE.UU., los probióticos son microorganismos vivos que al ingerirlos en una cantidad suficiente ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica. Se han descrito bacterias probióticas entre las especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Lactococcus*, comúnmente utilizados en la industria láctea. Se piensa que los probióticos intervienen a nivel de la flora intestinal impidiendo el desarrollo de microorganismos patógenos y/o actuando más directamente sobre el sistema inmunitario.

El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral que coloniza la capa de moco gástrico humano de más del 50% de la población mundial. Aunque la mayoría de las personas infectadas por *H. pylori* están asintomáticas aunque su epitelio gástrico muestre signo de inflamación, del 15% al 20% de las personas infectadas por *H. pylori* desarrollan enfermedades. De hecho, el *H. pylori* es el principal agente causante de la gastritis crónica activa, enfermedades de la úlcera péptica, atrofia, metaplasia, displasia, cáncer gástrico y el linfoma de tejido linfóide asociado a la mucosa gástrica (MALT, del inglés Mucosa Associated Lymphoid Tissue) (véanse Fox y Wang, 2007 y Polk y Peek, 2010).

Durante la infección, el *H. pylori* se une específicamente a las células epiteliales gástricas que recubren el epitelio gástrico a través de varias moléculas de adhesión (adhesinas) producidas por las bacterias, tales como las proteínas BabA y SabA. La adhesión a las células epiteliales gástricas protege a las bacterias del flujo de líquido, el movimiento peristáltico y el desprendimiento de la capa mucosa. La adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica induce vías de transducción de señales dentro de las células epiteliales gástricas, dando lugar a daños y atrofia de células epiteliales gástricas a través de estrés oxidativo, apoptosis y/o mecanismos de autofagia. En consecuencia, la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas es un paso clave en el establecimiento de una infección de la mucosa gástrica.

El tratamiento estándar en pacientes infectados por *H. pylori* es dos antibióticos asociados a un inhibidor de la bomba de protones (PPI), llamada triple terapia. Sin embargo, la tasa de erradicación de *H. Pylori* siguiendo la terapia triple está disminuyendo debido a la resistencia a los antibióticos o al bajo cumplimiento terapéutico. Además, a pesar de varios ensayos clínicos, todavía no existe una vacuna eficaz disponible en el mercado.

De lo anterior se desprende que existe la necesidad de alternativas o complementos a la triple terapia para el tratamiento o la prevención de la infección por *H. pylori*.

Como alternativa, se ha propuesto utilizar bacterias probióticas de ácido láctico (LAB, del inglés Lactic Acid Bacteria) que producen ácido láctico, bacteriocinas y otras sustancias antimicrobianas. Boyanova *et al.* (2009) han encontrado varias cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (*L. bulgaricus*) que inhiben el crecimiento de cepas de *H. pylori*, incluidas las cepas resistentes a los antibióticos, *in vitro* (utilizando un método de difusión en agar en pocillo), de una manera dependiente de la cepa. Sin embargo, las cepas de *L. bulgaricus* estudiadas no están claramente identificadas y no están públicamente disponibles. Simova *et al.* (2009) han seleccionado varias bacterias de ácido láctico que producen bacteriocinas. Después, han determinado la actividad antimicrobiana de dichas cepas analizando la actividad antimicrobiana del sobrenadante libre de células (CFS, del inglés Cell-Free Supernatant) de estas cepas por dos métodos *in vitro*: un método de difusión en agar en pocillo y el ensayo de dilución crítica de Barefoot y Klaenhammer. Ellos han encontrado que el CFS de la cepa *L. bulgaricus* BB 18 inhibe el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos patógenos (bacterias o levaduras), incluyendo cepas de *H. pylori*, debido a su actividad antimicrobiana.

Los inventores han aislado una nueva cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* y han encontrado, *in vitro* e *in vivo*, que esta cepa inhibe la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales. Esta cepa de *L. bulgaricus* (denominada DN\_100\_0602 o CNCM I-4428) puede utilizarse, por lo tanto, para el tratamiento o la prevención de infección por *H. pylori* buscando una etapa principal en el establecimiento de esta infección, concretamente, mediante la inhibición de la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales.

Por consiguiente, un tema de la presente invención es la cepa *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, depositada, de acuerdo con el Tratado de Budapest, en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, 25 rue du Docteur Roux, París) el 3 de febrero de 2011, con el número de acceso CNCM I-4428.

Esta cepa CNCM I-4428 tiene las siguientes características:

- Morfología: microorganismo Gram-positivo, bacilos inmóviles, en forma de varilla, largos con granulaciones,

- Metabolismo: homofermentivo, catalasa (-),

- Fermentación de azúcares (resultados obtenidos con un ensayo API 50 CH en un medio MRS a 37 °C durante 48 h): Glucosa, Fructosa, Manosa y Lactosa.

Además, esta cepa es capaz de inhibir la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales *in vitro* e *in vivo*.

5 Como se usa aquí, la expresión "inhibición de la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales" se refiere a una inhibición significativa (*es decir*, inhibición total o parcial) de la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales. La inhibición de la adhesión de cepas de *H. pylori* a las células epiteliales se puede medir *in vitro* como se muestra en el Ejemplo 1 a continuación.

10 También se describen en la presente memoria cepas mutantes o cepas transformadas genéticamente derivadas de la cepa parental CNCM I-4428, con la condición de que sean capaces de inhibir la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales. Estas cepas mutantes o transformadas genéticamente pueden ser cepas en las que uno o más genes endógenos de la cepa parental han sido mutados, por ejemplo para modificar algunas de sus propiedades metabólicas (*p. ej.*, su capacidad para fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia al transporte en el tracto gastrointestinal, sus propiedades post-acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa parental CNCM I-4428 por uno o más genes de interés, por ejemplo para conferir a dichas cepas transformadas genéticamente características fisiológicas adicionales o para permitir que expresen proteínas de interés terapéutico o vacunal que se desea administrar a través de dichas cepas. Estas cepas pueden obtenerse a partir de la cepa CNCM I-4428 por medio de las técnicas convencionales para la mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio y la transformación genética de *Lactobacilli*, tales como las descritas por Gury *et al.* (2004) o por Perea Vélez *et al.*, 2007, o por medio de la técnica conocida como "reordenamiento del genoma" (Patnaik *et al.*, 2002 y Wang *et al.*, 2007).

Un tema de la presente invención es también un método para obtener una cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* capaz de inhibir la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales, que comprende una etapa de mutagénesis o transformación genética de la cepa CNCM I-4428.

25 Se describen en esta memoria también fracciones celulares que pueden obtenerse a partir de una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, preferiblemente la cepa CNCM I-4428, siempre que sean capaces de inhibir la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales. Son en particular preparaciones de ADN o preparaciones de pared bacteriana obtenidas a partir de cultivos de dicha cepa. También pueden ser sobrenadantes de cultivo o fracciones de estos sobrenadantes. A modo de ejemplo, se puede obtener el sobrenadante libre de células (CFS) de la cepa CNCM I-4428 utilizando el método para obtener un CFS a partir de otra cepa de *L. bulgaricus*, descrito en Simova *et al.*, 2009.

Un tema de la presente invención es también un método para obtener una fracción celular que es capaz de inhibir la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales, que comprende las etapas de:

- 35 a) cultivar una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, preferiblemente la cepa CNCM I-4428, y  
b) obtener la fracción celular del cultivo en la etapa a).

Un tema de la presente invención es también una composición que comprende una cepa de *L. bulgaricus* de acuerdo con la presente invención, concretamente la cepa CNCM I-4428.

40 En la composición, dicha cepa se puede usar en forma de bacterias completas que pueden estar vivas o muertas. Alternativamente, dicha cepa se puede usar en forma de un lisado bacteriano o en forma de fracciones bacterianas; las fracciones bacterianas adecuadas para este uso se pueden elegir, por ejemplo, probando sus propiedades sobre la adhesión de cepas de *H. pylori* a células epiteliales. Preferiblemente, las células bacterianas están presentes como células vivas y viables.

45 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. Se prefiere generalmente 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 g de peso seco, de al menos una cepa bacteriana como se ha mencionado anteriormente.

50 La composición puede comprender además otras cepas de bacterias aparte de las cepas de acuerdo con la presente invención, en particular cepa (s) probiótica (s), tal como cepa(s) de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* o *Lactococcus*.

Cuando las bacterias están en forma de bacterias vivas, la composición puede comprender típicamente  $10^5$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos  $10^5$  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 g de peso seco de la

composición. En el caso de una composición líquida, esto corresponde generalmente 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.

5 La composición puede ser una composición nutricional, incluyendo productos alimenticios, suplementos alimenticios y alimentos funcionales. Un "suplemento alimenticio" designa un producto elaborado a partir de compuestos habitualmente utilizados en los productos alimenticios, pero que se presenta en forma de tabletas, polvo, cápsulas, poción o cualquier otra forma que normalmente no está asociada con alimentos y que tiene efectos beneficiosos para la salud. Un "alimento funcional" es un alimento que también tiene efectos beneficiosos para la salud. En particular, los complementos alimenticios y los alimentos funcionales pueden tener un efecto fisiológico - protector o curativo - contra una enfermedad, por ejemplo contra una enfermedad crónica.

10 La composición nutricional de acuerdo con la invención también incluye un alimento para bebés, una fórmula de leche para lactantes o una fórmula de seguimiento infantil. Preferiblemente, la presente composición es un producto nutracéutico o farmacéutico, un suplemento nutricional o un alimento médico.

15 La composición puede ser un producto lácteo, preferiblemente un producto lácteo fermentado. El producto fermentado puede estar presente en forma de un líquido o presente en forma de polvo seco obtenido secando el líquido fermentado. Ejemplos de productos lácteos incluyen la leche fermentada y/o el suero fermentado en forma asentada, batida o bebible, queso y yogur.

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

20 En una realización preferida, el producto fermentado es un producto fresco. Un producto fresco, que no ha sufrido etapas severas de tratamiento térmico, tiene la ventaja de que las cepas bacterianas presentes están en la forma viva.

25 Un tema de la presente invención es también una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, concretamente, la cepa CNCM I-4428, o una composición tal como se ha definido anteriormente para uso como medicamento.

Un tema de la presente invención es también una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, concretamente, la cepa CNCM I-4428, o una composición tal como se ha definido anteriormente para uso como un medicamento para tratar o prevenir la infección por *Helicobacter pylori*.

30 Se describe también en la presente memoria el uso de una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, concretamente, la cepa CNCM I-4428, o una composición tal como se ha definido anteriormente como un medicamento, preferiblemente un medicamento para tratar o prevenir la infección por *H. pylori*.

Se describe también en la presente memoria el uso de una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, concretamente, la cepa CNCM I-4428, o una composición tal como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento, preferiblemente un medicamento para tratar o prevenir la infección por *H. pylori*.

35 Se describe adicionalmente en la presente memoria un método para tratar o prevenir la infección por *H. pylori* en un sujeto que lo necesite, comprendiendo dicho método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, preferiblemente la cepa CNCM I-4428, o una composición tal como se ha definido anteriormente.

40 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz es bien conocida por el experto en la técnica, especialmente a la vista de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Se describe en la presente memoria también un método para la fabricación de un medicamento, preferiblemente un medicamento para tratar o prevenir una infección por *H. pylori*, comprendiendo dicho método incorporar una cepa de *L. bulgaricus* tal como se ha definido anteriormente, preferiblemente la cepa CNCM I-4428, o una composición tal como se ha definido anteriormente, en al menos un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 Como se usa en la presente memoria, el tratamiento o prevención abarca, entre otras cosas: infección preventiva, estabilización de la carga de *H. pylori* y/o disminución de la carga de *H. pylori*. El tratamiento o prevención también abarca abordar al menos uno de los síntomas asociados con el *H. pylori* mencionado a continuación.

50 Se conocen en la técnica métodos para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. A modo de ejemplo, el diagnóstico de la infección por *H. pylori* puede hacerse mediante un ensayo de anticuerpos en sangre, un ensayo de antígeno en heces o el ensayo de aliento de carbono urea. También puede realizarse mediante biopsia endoscópica seguida de un ensayo de ureasa, un examen histológico o un cultivo microbiano.

Los síntomas o enfermedades asociadas con la infección por *H. pylori* son dolor de estómago, acidez de estómago, reflujo ácido, dolor abdominal, regurgitación, vómitos, eructos, flatulencia, náusea, gastritis tal como la gastritis

crónica activa, enfermedades de la úlcera péptica, atrofia, metaplasia, displasia, cáncer gástrico y el linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT).

La presente invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción adicional, que se refiere a los ejemplos que ilustran las propiedades antiinfecciosas de la cepa CNCM I-4428 así como a las figuras adjuntas.

5 La Figura 1 muestra la evolución del peso (en gramos) de ratones infectados por *H. pylori* SS1 que reciben un producto controlado, o infectados por *H. pylori* SS1 y tratados con *L. bulgaricus* CNCM I-4428, o infectados por *H. pylori* SS1 y tratados con *L. bulgaricus* CNCM I-1632 (Lb 130), medido justo antes del tratamiento (primera barra), 3 semanas después del tratamiento (segunda barra) y justo antes del sacrificio (tercera barra).

10 La Figura 2 muestra la puntuación de la infección obtenida mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-*H. Pylori* en ratones (i) no infectados por *H. pylori*, (ii) infectados por *H. pylori* SS1 que reciben un producto controlado (leche no fermentada), (iii) infectados por *H. pylori* SS1 y tratados con *L. bulgaricus* CNCM I-1632 (Lb 130) y (iv) infectados por *H. pylori* SS1 y tratados con *L. bulgaricus* CNCM I-4428. Definición de puntuaciones: 0: ninguna glándula infectada, 1: pocas glándulas infectadas, 2: 25% de glándulas infectadas, 3: de 25 a 50% de glándulas infectadas, 4: > 50% de glándulas infectadas.

15 La figura 3 muestra la cuantificación de ADN de *H. pylori* SS1 obtenido por Real-Time PCR en ratones (i) no infectados por *H. pylori*, (ii) infectados por *H. pylori* SS1 pero que reciben un producto controlado (leche no fermentada), (iii) infectados por *H. pylori* SS1 y tratados con *L. bulgaricus* CNCM I-4428 y (iv) infectados por *H. pylori* SS1 y tratados con *L. bulgaricus* CNCM I-1632 (Lb 130).

## 20 **Ejemplo 1: selección de cepas de *L. bulgaricus* para su efecto en la adhesión de *Helicobacter Pylori* a células epiteliales gástricas**

El método descrito por Oleastro *et al.* (2008) se utilizó con modificaciones para evaluar el efecto de dos cepas de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (CNCM I-4428 y CNCM I-1632 depositadas en la CNCM el 25 de octubre de 1995) sobre las propiedades adhesivas de *H. pylori* a las células epiteliales.

### 25 1.1 Material y Métodos

Se ensayaron dos cepas de *H. pylori*: la cepa J99 (BabA2, número ATCC: 700824) y la cepa 09.193 (BabA1, aislada en Japón por Yoshio Yamaoka, de la Universidad de Oita). Estas cepas se ensayaron con una MOI (multiplicidad de infección, del inglés Multiplicity Of Infection) de 50. Las células de *H. pylori* se transfirieron en tampón PBS después de un cultivo de 24h en agar pylori (Biomérieux, Francia). La concentración de suspensiones bacterianas de las dos cepas de *H. pylori* respectivamente se normalizó a  $2 \cdot 10^8$  ufc/ml (correspondiente a  $DO_{600nm} = 1$ ).

Se ensayaron dos suspensiones de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* con una MOI de 50 (correspondiente a 25  $\mu$ l de suspensión normalizada del *L. bulgaricus* por pocillo).

Se inocularon 100.000 células AGS epiteliales (número ATCC: CRL-1739) el día antes del experimento de infección en 500  $\mu$ l de medio DMEM F12 complementado con suero bovino fetal al 10%.

### 35 Coloración de las suspensiones de *H. pylori*

Se centrifugó 1 ml de la suspensión de *H. pylori* 10 minutos a 10.000 g. El comprimido se resuspendió en 1 ml de Diluyente A (del Kit de Enlace de Células Fluorescentes Verdes PKH2, Sigma Aldrich, Saint-Louis) y se añadieron 2,5  $\mu$ l de PKH<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, Saint - Louis). La suspensión se incubó 2 minutos y 30 segundos a temperatura ambiente. La coloración se detuvo mediante la adición de 2 ml de suero bovino fetal. A continuación se añadieron 4 ml de medio DMEM/F12 antes de la centrifugación de la suspensión durante 10 minutos a 10.000 g. El comprimido se resuspendió en 4 ml de medio de cultivo y se centrifugó 10 minutos a 10.000 g. Esta etapa de lavado se repitió dos veces para eliminar el exceso de fluorocromo.

### Medición de la adhesión

45 Las células AGS epiteliales se disociaron con tripsina siguiendo condiciones estándar después de tres lavados con PBS para descartar bacterias no adherentes. La emisión fluorescente se analizó por citometría de flujo. La fluorescencia se midió usando el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). Cada condición se llevó a cabo por triplicado.

### La infección con *H. pylori* se llevó a cabo en dos condiciones

- 50 • En (pre) condición de pre-infección: la suspensión de *L. bulgaricus* a ensayar se añadió a las células AGS epiteliales 1h30 antes de la infección con *H. pylori*. Las células se analizaron por citometría de flujo 1h30 después de la infección (tiempo de incubación total 3h);

- En (co) condición de co-infección: Se añadieron la suspensión de *L. bulgaricus* a ensayar y una cepa de *H. pylori* a las células AGS epiteliales al mismo tiempo y se analizaron las células por citometría de flujo después de un tiempo de incubación de 1h30.

Control

- 5 El valor de control de la intensidad de fluorescencia se obtiene con las células AGS epiteliales incubadas con cepas de *H.pylori* durante 1h30.

Se dan valores de porcentajes de adhesión relativos a la adhesión de *H. pylori* a células AGS epiteliales sin exposición a *L. bulgaricus*, que se fijaron en el 100%.

- 10 Los resultados se analizaron a partir del valor medio obtenido a partir de triplicados y se puntuaron cuando eran significativamente diferentes según la prueba de Student ( $P < 0,05$ ).

1.2 Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: resultados obtenidos con 2 cepas de *L. bulgaricus* para su efecto en la adhesión de *H. pylori* a células AGS epiteliales.

Cepas de <i>H. pylori</i> \ Cepas de <i>L. bulgaricus</i>	J99		09.193	
	pre	co	pre	co
<i>L.bulgaricus</i> CNCM I-4428	1,5	0,9	2,1	1,4
Puntuaciones medias obtenidas				
<i>L.bulgaricus</i> CNCM I-1632	0	0	0	0
Puntuaciones medias obtenidas				

- 15 Definición de puntuaciones: -3: aumento significativo de la adhesión, 0: efecto no significativo sobre la adhesión, 1: inhibición significativa de la adhesión del 1 al 10%, 2: inhibición significativa de la adhesión del 11 al 20%, 3: inhibición significativa de la adhesión del 21 al 30%, 4: inhibición significativa de la adhesión superior al 30%.

- 20 Los resultados muestran que una suspensión bacteriana de la cepa CNCM I-4428 inhibe la adhesión de dos cepas de *H. pylori* (J99 y 09.193) a células AGS epiteliales en dos condiciones diferentes (pre- y co-incubación), pero que una suspensión bacteriana de la cepa CNCM I-1632 no tiene esta propiedad.

**Ejemplo 2: efecto de la cepa cncm i-4428 en la carga de *H. Pylori* en un modelo de ratones**

2.1 Material y Métodos

*Helicobacter pylori*

- 25 Se usó la cepa de *H. pylori* SS1 que tiene una muy buena capacidad de colonización de la mucosa gástrica de ratón (Lee et al., 1997). Se comprobó la identidad de la cepa secuenciando los genes *glm* y *hspA* y *vacA*.

*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

- 30 Se prepararon productos lácteos fermentados por 2 cepas diferentes de *L. bulgaricus* (CNCM I-4428 o CNCM I-1632) de la siguiente manera: Se preparó el primer cultivo en MRSn a partir de cepa congelada y se incubó a 37°C durante 17 h. Se preparó un segundo cultivo en leche desnatada enriquecida con extracto de levadura (2 g/l) mediante inoculación al 1% del primer cultivo y se incubó a 37°C durante 17 h. Se preparó un tercer cultivo en leche enriquecida con extracto de levadura (2 g/l) por inoculación al 1% del segundo cultivo e incubación a 37°C hasta que se alcanzó un pH de 4,7. El producto se preparó finalmente por inoculación de leche enriquecida con extracto de levadura (2 g/l) al 1% con el tercer cultivo hasta que se alcanzó un pH de 4,7. Los productos se almacenaron a -
- 35 80°C. El recuento bacteriano se llevó a cabo en MRSn después de 48 horas de incubación. El recuento bacteriano fue de  $6 \cdot 10^8$  y  $1,3 \cdot 10^9$  cfu/ml respectivamente para las cepas CNCM I-4428 y CNCM I-1632.

Ratones

5 Se dividieron en grupos 55 ratones hembra BALB/cBy/J de 5 semanas de edad (Charles River, Francia) y se ensayaron como SPF («libres de patógenos específicos libres», del inglés Specific Pathogen Free): se infectaron 3 grupos de 15 ratones y se usó 1 grupo de 10 ratones como control no infectado. Los ratones fueron alimentados con alimentos pobres en vitaminas para mejorar el desarrollo de la lesión inducida por *H. pylori*.

Infección (8 semanas)

10 Ratones de 6 semanas de edad recibieron una dieta hídrica durante 1 día y luego se alimentaron a la fuerza la mañana siguiente con 250 µl de una suspensión enriquecida de la cepa de *H. pylori* SS1 (1 a 2 placas Petri de *H. pylori* para 5 ratones). Los ratones se pusieron en una jaula con una dieta normal. Luego, los ratones recibieron una dieta hídrica de nuevo por la noche. Este protocolo se repitió durante 3 días.

Tratamiento (6 semanas)

15 Ocho semanas después de su infección, los ratones se trataron durante 6 semanas con productos lácteos que contenían una cepa de *L. bulgaricus*. Se administraron 120 g de producto lácteo por jaula al día en biberones en lugar de agua. Los biberones se cambiaban cada día. Para evaluar la cantidad de productos ingeridos por animal, se pesaron los biberones. Además, los ratones se pesaron justo antes del tratamiento, 3 semanas después del tratamiento y justo antes del sacrificio (los resultados se muestran en la Figura 1).

Los grupos de control de ratones recibieron leche enriquecida con extracto de levadura (2g/l) (*es decir*, sin ninguna cepa de *L. bulgaricus*).

Sacrificios

20 Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se realizó una laparotomía. Los estómagos se aislaron y la mucosa gástrica se lavó en suero fisiológico.

Se cortó el estómago por el centro desde el esófago al duodeno. Para el medio estómago derecho, se eliminó el cardias, y luego este medio estómago se puso en suero fisiológico para ser utilizado para el estudio molecular. La mitad izquierda del estómago se utilizó para la histología.

25 Histología

La mitad izquierda del estómago se fijó 1 noche en formol al 3,7% y se lavó con etanol al 70% y luego se embebió en parafina y se seccionó a un espesor de 3 µm.

30 La inmunohistoquímica se llevó a cabo con antígenos de anticuerpo anti-*H. Pylori*: anticuerpo primario: anti-*H. Pylori* (Dako, Ref. B0471); anticuerpo secundario y DAB: Dako EnVision + System-HRP (DAB) (Dako, Ref. K4011).

Estudio molecular (q RT-PCR)

Los estómagos derechos se homogeneizaron (se rompieron) en 0,2 ml de suero fisiológico con un Potter-Elvehjem (el tubo se pesó con y sin el tejido del estómago para conocer el peso del tejido).

35 El ADN total se extrajo del estómago machacado con el kit DNA Arrow Stool (NorDiag, Norvège) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para cada estómago machacado se resuspendió el ADN en 180 µl de tampón TRIS (10 mM).

40 La presencia de ADN de *H. pylori* se cuantificó en extractos de ADN por PCR en tiempo real. La amplificación se realizó con cebadores dirigidos a 23S rRNA, presente en dos copias en *H. pylori* siguiendo el método descrito por Oleastro *et al.* (2003). Para 20 µl de mezcla (MgCl<sub>2</sub> 25mM, cebadores HPY-A y HPY-S 20 µM descritos por Ménard *et al.*, 2002, sonda de sensor que está marcada en 5' con LC-Red 640 y fosforilada en 3' y sonda de anclaje que está marcada en 3' con fluoresceína (ambas sondas descritas por Oleastro *et al.* 2003) 20 µM, tampón que contiene la enzima (10X, kit de sondas de hibridación maestras de ADN FastStart, Roche Diagnostics), se añadieron 5 µl de ADN a 200 ng/µl para amplificarse en Light Cycler ROCHE usando el siguiente programa:

Desnaturalización:	95°C	10 Min
Amplificación:	50 Ciclos	20°C/s
	95°C	0 s
	60°C	20 s

	72°C	12 s	
Fusión:	95°C	0 s	
	38°C	50 s	20 ° C/s

## 2.2 Resultados

5 Las puntuaciones de infección obtenidas por inmunohistoquímica para las cepas de *L. bulgaricus* CNCM I-4428 y CNCM I-1632 (Lb 130) se muestran en la Figura 2. Estos resultados muestran que la administración de producto lácteo fermentado con la cepa CNCM I-4428 a ratones infectados por *H. pylori* disminuye significativamente la puntuación de la infección pero que el tratamiento con el producto lácteo fermentado con la cepa CNCM I-1632 no disminuye la carga de *H. pylori*.

10 Los resultados obtenidos por PCR en tiempo real para las cepas de *L. bulgaricus* CNCM I-4428 y CNCM I-1632 (Lb 130) se muestran en la Figura 3. Estos resultados muestran que, en ratones, el tratamiento con el producto lácteo fermentado con la cepa CNCM I-4428 disminuye significativamente la carga de *H. pylori* pero que el tratamiento con la leche fermentada con la cepa CNCM I-1632 no disminuye la carga de *H. pylori*.

## **REFERENCIAS**

- Boyanova L et al., Lett Appl Microbiol. 2009; 48: 579-84.
- Fox JG y Wang TC., J Clin Invest. 2007;117: 60-9.
- Gury J et al., Arch Microbiol. 2004;182: 337-45.
- 15 • Lee A et al., Gastroenterology. 1997;112: 1386-97.
- Ménard A et al., Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:1156-7.
- Oleastro M et al., J Clin Microbiol. 2003;41:397-402.
- Oleastro M, et al., J Infect Dis. 2008;198:1379-87.
- Patnaik R et al., Nat Biotechnol. 2002;20:707-12.
- 20 • Perea Vélez M et al., Appl Environ Microbiol. 2007;73:3595-604.
- Polk DB y Peek RM Jr., Nat Rev Cancer. 2010;10:403-14.
- Simova ED y col., J Appl Microbiol. 2009;106: 692-701.
- Wang Y et al., J Biotechnol. 2007;129:510-5.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa de *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* (*L. bulgaricus*) caracterizada por que se deposita en la CNCM bajo el número I-4428.
- 5 2. Un método para obtener una cepa de *L. bulgaricus* capaz de inhibir la adhesión de cepas de *Helicobacter pylori* a células epiteliales, que comprende una etapa de mutagénesis o transformación genética de la cepa de *L. bulgaricus* de la reivindicación 1.
3. Un método para obtener una fracción celular que es capaz de inhibir la adhesión de cepas de *H.pylori* a células epiteliales, que comprende las etapas de:
  - a) cultivar una cepa de *L. bulgaricus* de acuerdo con la reivindicación 1, y
  - 10 b) obtener la fracción celular del cultivo en la etapa a).
4. Una composición que comprende una cepa de *L. Bulgaricus* de acuerdo con la reivindicación 1.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizada por que comprende al menos  $10^5$  ufc, preferiblemente al menos  $10^6$  ufc, por gramo de peso seco, de una cepa de *L. bulgaricus* de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 6. La composición según las reivindicaciones 4 ó 5, caracterizado por que es una composición nutricional.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada por que es un producto lácteo.
8. La cepa según la reivindicación 1 o la composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 ó 5 para usar como un medicamento.
- 20 9. La cepa o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizada por que dicho medicamento es para tratar o prevenir la infección por *H. pylori*.

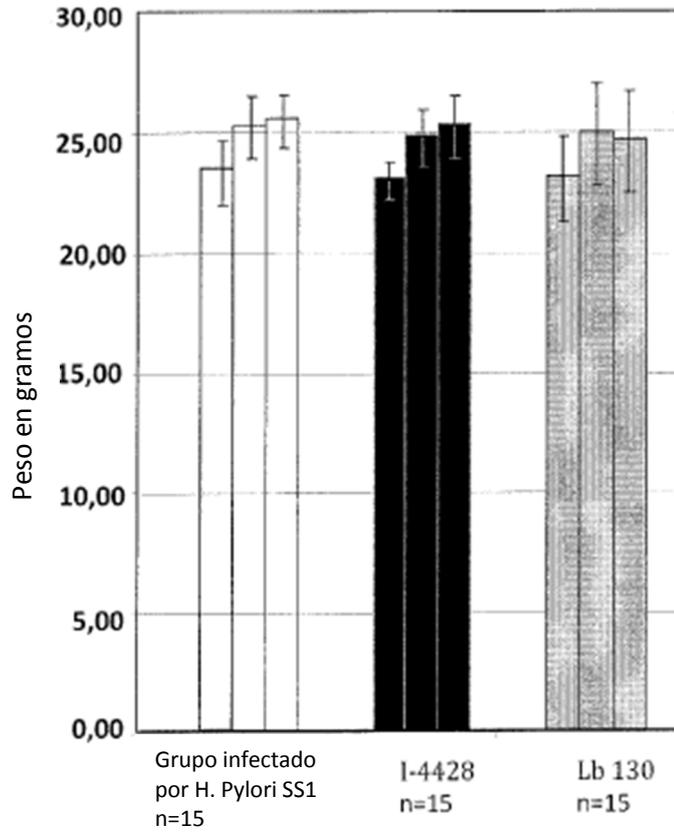


FIGURA 1

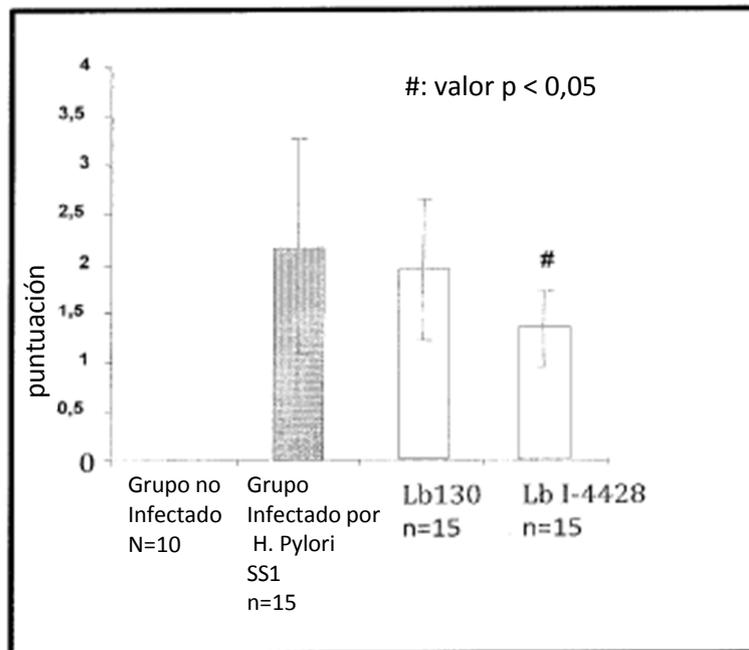


FIGURA 2

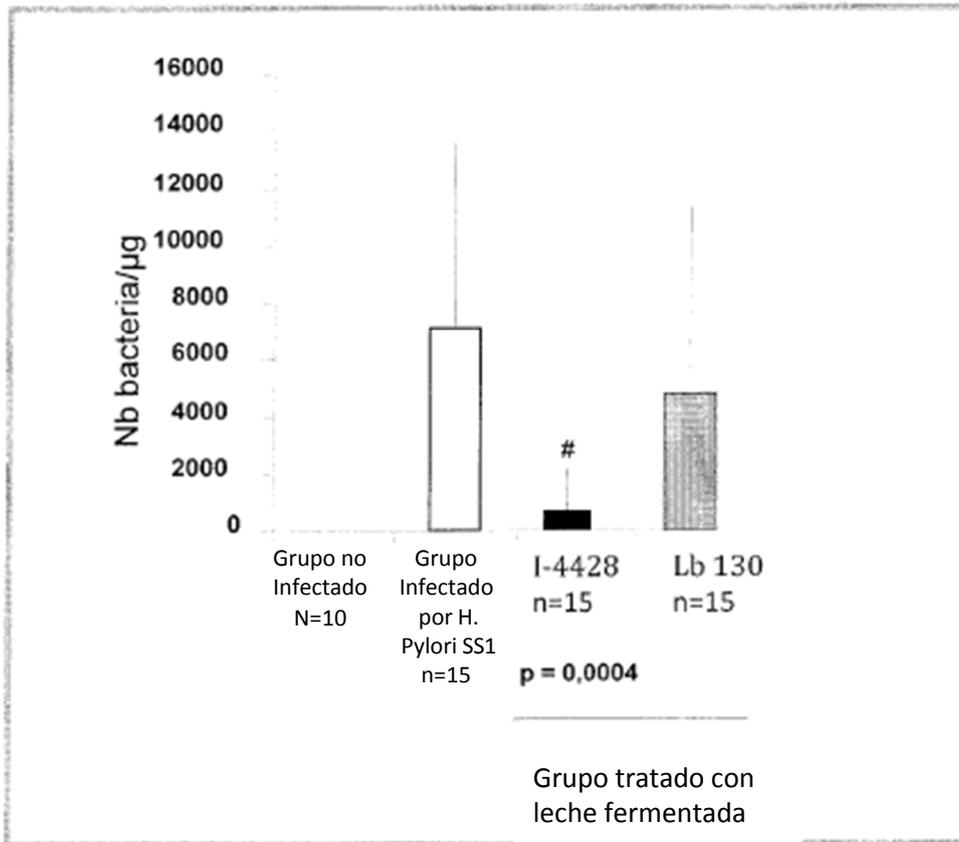


FIGURA 3