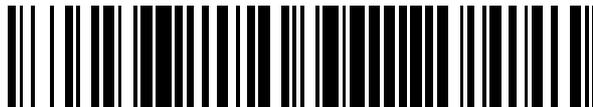


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 947**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.01.2013 PCT/EP2013/051065**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107913**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2013 E 13708357 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2828375**

54 Título: **Bacterias cultivables productoras de GABA derivadas del tracto gastrointestinal humano**

30 Prioridad:

19.01.2012 EP 12151768

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

20.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY COLLEGE CORK-NATIONAL
UNIVERSITY OF IRELAND, CORK (50.0%)**

College Road

Cork, IE y

**AGRICULTURE AND FOOD DEVELOPMENT
AUTHORITY (TEAGASC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

STANTON, CATHERINE;

ROSS, PAUL;

CRYAN, JOHN y

DINAN, TED

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 659 947 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

Bacterias cultivables productoras de GABA derivadas del tracto gastrointestinal humano

5 **Introducción**

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitorio principal del sistema nervioso central de los vertebrados. Está implicado en la regulación de estados cardiovasculares tales como tensión arterial y frecuencia cardiaca, y desempeña un papel en la sensación de dolor y ansiedad. Se han descrito varios de los posibles beneficios para la salud adicionales de GABA, incluyendo control de la secreción de la hormona del crecimiento, efecto protector contra la insuficiencia renal aguda inducida por glicerol en ratas y actividad antiproliferativa (una reducción de la actividad migratoria inducida de la célula de carcinoma de colon SW480).

En Japón ha crecido recientemente el interés en el posible papel de GABA como componente dietético antihipertensivo. Esto se debió en particular a la alta ingesta de sodio en la dieta en ese país, donde se estimó que la ingesta diaria de sal era de 11,2 g/d en 2003. De manera interesante, los alimentos enriquecidos en GABA se han definido como "alimentos para uso específico de salud" (FOSHU) en Japón. Esto condujo a un aumento de la investigación sobre el desarrollo de productos fermentados que contuviesen GABA. Se desarrolló un producto de leche fermentada que contenía GABA que se demostró que tenía un efecto hipotensor en ratas espontáneamente hipertensas y en personas ligeramente hipertensas. En los últimos años también se ha presenciado un aumento del desarrollo de productos lácteos, de soja, *kimchi* y zumo fermentados enriquecidos en GABA adicionales, que podrían usarse como posibles vehículos de administración de GABA.

Además del interés intensificado en los posibles efectos fisiológicos tras el consumo de alimentos fermentados enriquecidos en GABA, hubo un aumento concomitante en el aislamiento de cultivos de fermentos lácteos o derivados de alimentos fermentados novedosos con la capacidad de producir GABA. Se ha demostrado que las bacterias del ácido láctico (LAB) de fuentes alimenticias tienen la capacidad de producir ácido γ -aminobutírico (GABA). GABA se produce principalmente a partir de la α -descarboxilación irreversible de L-glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), una enzima dependiente de piridoxal 5'-fosfato PLP). Se ha encontrado en animales, plantas superiores y bacterias, donde desempeña un papel en la resistencia a los ácidos. Muchos estudios han notificado la presencia de un gen *gad* en LAB y efectivamente, GABA se ha producido por fermentos del queso durante la maduración del queso. Es evidente que un enfoque para aumentar los niveles de GABA en seres humanos es mediante el consumo de productos alimenticios enriquecidos en GABA. Sin embargo, cuando se toma como complemento, la dosificación recomendada de GABA es de 1-2 g al día, que es mucho agente activo para incorporar en un único producto alimenticio tal como un yogur o una bebida. Lyte *et al* describen bacterias del ácido láctico productoras de GABA de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Mark Lyte, Bioassays 33: 574-581; 2011; Wiley Periodicals Inc).

Un objeto de la invención es superar al menos uno de los problemas a los que se hizo referencia anteriormente.

40 **Declaraciones de la invención**

El solicitante se ha dado cuenta de que otra posible forma de aumentar los niveles de GABA en el intestino es aprovechando la capacidad de producción de la microbiota intestinal o bacterias probióticas ingeridas, que podrían usar glutamato dietético para generar GABA. Hasta la fecha, no se han descrito bacterias derivadas del tracto gastrointestinal humano que tienen la capacidad de producir GABA. Determinado con el objetivo de identificar tales bacterias, el solicitante ha descubierto con éxito tres cepas de bacterias que pueden idealmente cultivarse, que se derivan del tracto gastrointestinal neonatal humano (GIT), y que pueden producir eficazmente ácido γ -aminobutírico (GABA) a partir de una fuente de glutamato. Las bacterias son *Lactobacillus brevis* DPC6108, *Bifidobacterium dentium* DPC6333 y *Bifidobacterium adolescentis* DPC6044. El solicitante también ha descubierto que la cepa *Bifidobacterium infantis* UCC35624, que se derivó originalmente del GIT humano, y la cepa *Bifidobacterium dentium* depositada ante la NCFB (National Collection of Food Bacteria) NCFB2243, derivada originalmente de la caries dental, son productores eficaces de GABA a partir de una fuente de glutamato.

En particular, se ha encontrado que la cepa *Lactobacillus brevis* DPC6108 demuestra una conversión altamente eficaz de glutamato monosódico en GABA en una prueba de conversión *in vitro* (conversión del 100% de 10 y 20mg/ml de MSG- tabla 1). Además, las pruebas de comportamiento *in vivo* incluyendo la prueba de campo abierto y la prueba de natación forzada indican que la administración de *Lactobacillus brevis* DPC6108 a ratas confiere efectos clínicamente significativos en comparación con un grupo de placebo (véase el final de la sección de resultados).

De este modo, en un primer aspecto, la invención proporciona una bacteria aislada de *Lactobacillus brevis* DPC6108, estando caracterizada la bacteria porque puede idealmente cultivarse, se deriva preferiblemente de un tracto gastrointestinal de mamífero (especialmente el GIT neonatal humano), y tiene la capacidad de producir ácido γ -aminobutírico (GABA). Normalmente, la bacteria aislada puede derivarse de una muestra de heces neonatal

humana. Idealmente, la bacteria aislada puede realizar una conversión eficaz de MSG en GABA en una prueba de conversión *in vitro*, por ejemplo, al menos una conversión del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de MSG en GABA. De manera adecuada, la bacteria aislada de la invención es una bacteria probiótica.

5 Cepa de *Lb. brevis* DPC6108

En una realización preferida, la invención se refiere a una bacteria aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) depositada ante la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 y se le concedió el número de registro NCIMB 41903, estando caracterizada la bacteria porque es cultivable y se deriva de un tracto gastrointestinal neonatal humano.

Se realizó un depósito de *Lb. brevis* DPC6108 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 por la Autoridad de Desarrollo Agrícola y Alimentario (Teagasc) de Oak Park, Carlow, Irlanda y se le concedió el número de registro NCIMB 41903.

Normalmente, la cepa aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) de la invención puede realizar una conversión del 100% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) en una prueba de conversión *in vitro* descrita a continuación.

De manera adecuada, la cepa aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) de la invención, se deriva de una muestra fecal neonatal humana.

Normalmente, la cepa aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) comprende una secuencia de ARNr 16S de SEQ ID NO: 1.

25
 NATGACGTGCTTGCCTGATTTNAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGG
 AAATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAA
 TCCGCATGGATTTTGTGGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTAT
 TAGTTAGTTGGTgAGGTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAAT
 CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAYTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
 ACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAA
 CTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAACCAG
 AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
 TTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAA
 CCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTG
 TAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTA
 ACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCC
 GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
 GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAC
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCT
 TCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGT
 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGT
 TGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTGGTGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGARGAAGGTGGGGAT
 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACCACCGTGCTACAATGGACGGTACAAC
 GAGTCGCGAAGTTCGTGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCT
 GCAACTCGCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
 GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTtGTAACACCCAAAGCCGGTG
 AGANACCTCG

30 En una realización, la cepa aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) de la invención se proporciona en forma de células vivas, células muertas, componentes celulares, extractos celulares o lisados celulares.

Cepa de *B. dentium* DPC6333

35 Se realizó un depósito de *B. dentium* DPC6333 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 por la Autoridad de Desarrollo Agrícola y Alimentario (Teagasc) de Oak Park, Carlow, Irlanda y se le concedió el número de registro NCIMB 41904.

Normalmente, la cepa aislada de *B. dentium* DPC6333 puede realizar una conversión del 50% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) en la prueba de conversión *in vitro* descrita a continuación.

De manera adecuada, la cepa aislada de *B. dentium* DPC6333 se deriva de una muestra fecal neonatal humana.

En una realización, la cepa aislada de *B. dentium* DPC6333 se proporciona en forma de células vivas, células muertas, componentes celulares, extractos celulares o lisados celulares.

B. adolescentis DPC6044

Se realizó un depósito de *B. adolescentis* DPC6044 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 2 de diciembre de 2011 por la Autoridad de Desarrollo Agrícola y Alimentario (Teagasc) de Oak Park, Carlow, Irlanda y se le concedió el número de registro NCIMB 41908.

Normalmente, la cepa aislada de *B. adolescentis* DPC6044 puede realizar al menos una conversión del 20% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) en la prueba de conversión *in vitro* descrita a continuación.

De manera adecuada, la cepa aislada de *B. adolescentis* DPC6044 se deriva de una muestra fecal neonatal humana.

En una realización, la cepa aislada de *B. adolescentis* DPC6044 se proporciona en forma de células vivas, células muertas, componentes celulares, extractos celulares o lisados celulares.

B. infantis UCC35624

Se realizó un depósito de *B. infantis* UCC35624 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 13 de enero de 1999 y se le concedió el número de registro NCIMB 41003. Las características de la bacteria se describen en la publicación de patente estadounidense n.º: US2010/0112003A1 (cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia).

Normalmente, la cepa aislada de *B. infantis* UCC35624 puede realizar al menos una conversión del 25% o el 35% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) en la prueba de conversión *in vitro* descrita a continuación.

De manera adecuada, la cepa aislada de *B. infantis* UCC35624 se deriva de una muestra fecal neonatal humana.

En una realización, la cepa aislada de *B. infantis* UCC35624 se proporciona en forma de células vivas, células muertas, componentes celulares, extractos celulares o lisados celulares.

Composiciones

La invención también se refiere a una composición que comprende una bacteria aislada de la invención, preferiblemente la cepa de *Lb. brevis* DPC6108.

Normalmente, la composición se proporciona en forma de un producto formulado para la ingestión humana, por ejemplo, un producto alimenticio, una bebida, un complemento alimenticio o un medicamento.

De manera adecuada, la composición de la invención incluye además al menos un cultivo bacteriano seleccionado del grupo que consiste en:

- *Bifidobacterium dentium* (DPC6333) NCIMB 41904 depositada el 28 de noviembre de 2011;

- *Bifidobacterium adolescentis* (DPC6044) NCIMB 41908 depositada el 2 de diciembre de 2011;

- *Bifidobacterium infantis* (UCC35624) NCIMB 41003 depositada el 13 de enero de 1999; y

- *Bifidobacterium dentium* NCFB2243

Normalmente, la composición comprende una fuente de glutamato, por ejemplo, una sal de glutamato tal como, por ejemplo, glutamato monosódico.

Indicaciones médicas

La invención también se refiere a una bacteria aislada de la invención, o una composición de la invención, para su uso como medicamento.

La invención también se refiere a una bacteria aislada de la invención, o una composición de la invención, para su uso en la regulación o tratamiento de la función cardiovascular, secreción de la hormona del crecimiento, alteración del estado de ánimo, ansiedad, estrés, dolor, insuficiencia renal o estados proliferativos.

5 Normalmente, la composición se administra a un individuo por vía oral. Tras la ingestión, la bacteria aislada de la composición que se ha administrado formará parte de la microbiota del individuo.

De manera adecuada, la composición incluye glutamato libre.

10 En una realización preferida, la indicación es ansiedad.

En otra realización, la indicación es tensión arterial desregulada.

15 En otra realización, la indicación es alteración del estado de ánimo.

En otra realización, la indicación es un trastorno proliferativo.

20 En una realización particularmente preferida, la invención se refiere a una composición para su uso en la regulación o tratamiento de la ansiedad, en la que la composición comprende una bacteria aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) depositada ante la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 y a la que se concedió el número de registro NCIMB 41903, estando caracterizada la bacteria porque es cultivable, se deriva de un tracto gastrointestinal neonatal humano, y puede opcionalmente realizar una conversión del 70%, el 80%, el 90% o el 100% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) *in vitro*.

30 En otra realización, la invención se refiere a una composición para su uso como medicamento, en la que la composición comprende una bacteria aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) depositada ante la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 y a la que se concedió el número de registro NCIMB 41903, estando caracterizada la bacteria porque es cultivable, se deriva de un tracto gastrointestinal neonatal humano, y puede opcionalmente realizar una conversión del 70%, el 80%, el 90% o el 100% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) *in vitro*.

35 En otra realización, la invención se refiere a una composición para su uso en la producción de ácido γ -aminobutírico, en la que la composición comprende una bacteria aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) depositada ante la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 y a la que se concedió el número de registro NCIMB 41903, estando caracterizada la bacteria porque es cultivable, se deriva de un tracto gastrointestinal humano, y puede opcionalmente realizar una conversión del 70%, el 80%, el 90% o el 100% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) *in vitro*.

40 La invención también se refiere a un método de regulación o tratamiento de la función cardiovascular, secreción de la hormona del crecimiento, alteración del estado de ánimo, ansiedad, estrés, dolor, insuficiencia renal o estados proliferativos en un mamífero, normalmente un ser humano, que comprende una etapa de administrar al mamífero una bacteria aislada de la invención o una composición de la invención.

45 Las bacterias a las que se hace referencia anteriormente son bacterias probióticas que debe entenderse que significan microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud al huésped.

50 Breve descripción de la figura

Figura 1: Crecimiento y producción de GABA por *Lactobacillus brevis* DPC6108 en mMRS en presencia de 30 mg/ml de glutamato monosódico. Log UFC/ml; ▲ GABA μ g/ml.

55 Figura 2: Producción de GABA mediante bacterias cultivables del intestino y *L. brevis* DPC6108 en una fermentación fecal con pH controlado que contiene 30 mg/ml de glutamato monosódico. Sujeto 1 Sujeto 2 Sujeto 3 más $\sim 10^8$ *L. brevis* DPC6108 ■

60 Descripción detallada de la invención

65 Se realizó un depósito de *Lb. brevis* DPC6108 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 y se le concedió el número de registro NCIMB 41903. La cepa de bacteria se aisló de la muestra fecal neonatal usando las técnicas descritas en Wall *et al*, FEMS Microbiol Ecol 59 (2007) 127-137 (cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia).

Se realizó un depósito de *B. dentium* DPC6333 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 y se le concedió el número de registro NCIMB 41904. La cepa de bacteria se aisló de la muestra fecal neonatal usando las técnicas descritas en Barrett *et al*, Applied and Environmental Microbiology, abril de 2007, págs. 2333-2337 (cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia).

Se realizó un depósito de *B. adolescentis* DPC6044 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 2 de diciembre de 2011 y se le concedió el número de registro NCIMB 41908. La cepa de bacteria se aisló de la muestra fecal neonatal usando las técnicas descritas en Rosberg-Cody *et al*, Applied and Environmental Microbiology, agosto de 2004, págs. 4625-4641 (cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia).

Se realizó un depósito de *B. infantis* UCC35624 en la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 13 de enero de 1999 y se le concedió el número de registro NCIMB 41003. Las características de las bacterias se describen en la publicación de patente estadounidense n.º: US2010/0112003A1 (cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia).

La molécula GABA se ha implicado como medio para proporcionar beneficios para la salud a seres humanos, por ejemplo, regulación de la función cardiovascular, función renal y secreción de la hormona del crecimiento, y tratamiento de la ansiedad, alteración del estado de ánimo (es decir, mal estado de ánimo) y trastornos proliferativos. El término “trastornos proliferativos” debe entenderse que significa cáncer, tumores y metástasis. La invención, por tanto, también se refiere a un método de mejorar la salud en un individuo que comprende una etapa de administrar al individuo una bacteria aislada de la invención en la que el cultivo bacteriano una vez administrado se vuelve parte de la microbiota intestinal del individuo y produce GABA *in vivo* a partir de glutamato dietético.

El término “cultivable” tal como se aplica a las cepas bacterianas de la invención debe entenderse que significa que las cepas son viables y pueden hacerse crecer y enumerarse en un laboratorio usando un medio de crecimiento sintético.

El término “prueba de conversión *in vitro*” tal como se emplea en el presente documento se refiere a la prueba de medición de ácido γ -aminobutírico descrita a continuación en la que el caldo de mMRS se complementa con 10 mg/ml de MSG.

Las cinco especies bacterianas descritas anteriormente tienen la capacidad de producir GABA a partir de una fuente de glutamato *in vitro* y, de manera ideal, también *in vivo*. La fuente de glutamato es idealmente glutamato libre (es decir, glutamato que no está bloqueado en una molécula tal como una proteína o péptido) por ejemplo una sal de glutamato tal como glutamato monosódico. Las especies bacterianas descritas anteriormente tienen idealmente la capacidad de producir GABA a partir de una fuente de glutamato *in vivo*, idealmente *in vivo* en un ser humano. Esto significa que cuando se ingiere un cultivo de la bacteria, al menos parte del cultivo toma residencia en la microbiota intestinal del huésped y emplea glutamato dietético (o glutamato derivado de producto en la dieta) para generar GABA en el GIT.

El término “regulación de la función cardiovascular” debe entenderse que significa modulación de la función desregulada. En el caso de la tensión arterial, el término debe entenderse que significa que ayuda a que una tensión arterial alta o una tensión arterial baja vuelvan a un nivel sano normal. En el caso de la frecuencia cardiaca, el término debe entenderse que significa que ayuda a que una frecuencia cardiaca desregulada vuelva a una frecuencia sana normal.

El término “composición” tal como se emplea en el presente documento significa una composición de materia que incluye al menos un cultivo bacteriano tal como se describió anteriormente. De manera adecuada, la composición es un producto adecuado para la ingesta humana o animal, por ejemplo, un producto alimenticio o bebida, por ejemplo, un producto lácteo incluyendo yogur o bebida de yogur, un producto de leche, mantequilla, queso o producto de queso, un producto de soja, una barrita de aperitivo u otro tipo de producto alimenticio. La composición también puede tomar la forma de un complemento para la salud, por ejemplo un polvo para mezclar con un líquido para hacer, por ejemplo, un batido, o una cápsula o píldora. La composición también puede tomar la forma de una composición farmacéutica que comprende un cultivo bacteriano tal como se describió anteriormente y un portador farmacéutico aceptable, cuyos detalles los conocerán bien los expertos en la técnica. La composición farmacéutica puede tomar la forma de un comprimido, una cápsula, un líquido o una suspensión.

El término “tratamiento” tal como se aplica a una patología debe entenderse generalmente que significa reducir los síntomas de la patología, curar la patología, prevenir el desarrollo de la patología, o detener el desarrollo de la patología. En el caso de la alteración del estado de ánimo, tratamiento debe entenderse que significa ayudar a que el estado de ánimo vuelva a un estado de ánimo sano normal, y también a prevenir el desarrollo de alteración del estado de ánimo. En el caso de la ansiedad, tratamiento debe entenderse que significa que ayuda a reducir o eliminar los sentimientos de ansiedad, o prevenir el desarrollo de sentimientos de ansiedad. En el caso del dolor, tratamiento debe entenderse que significa que ayuda a reducir o eliminar el dolor, o prevenir el desarrollo del dolor.

En el caso del estrés, tratamiento se refiere a reducir o mejorar los sentimientos de estrés, o la prevención del desarrollo de estrés.

5 El término "para su uso como medicamento" tal como se emplea en el presente documento significa que la composición se emplea con un propósito de mejorar la salud, por ejemplo, un producto alimenticio que proporciona uno o más beneficios para la salud o una composición farmacéutica para una indicación médica o veterinaria específica, o un complemento para la salud.

10 La composición, los usos y los métodos de la invención están destinados para su uso con mamíferos, pero especialmente para su uso con seres humanos y animales de compañía (por ejemplo perros, gatos y caballos) y animales para agricultura (por ejemplo, animales bovinos y porcinos).

15 Los cultivos bacterianos a los que se ha hecho referencia anteriormente, o los derivados de los mismos, pueden estar en forma de bacterias vivas, bacterias muertas o componentes celulares, o extractos o lisados celulares de las mismas. Los métodos para preparar componentes celulares, extractos celulares o lisados celulares los conocerán bien los expertos en la técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

20 *Mantenimiento y cultivo de cepas bacterianas:*

25 Las cepas derivadas de seres humanos empleadas en el presente documento se mantuvieron en la colección de cultivos del Teagasc Moorepark Food Research Centre. Se cultivaron cepas de lactobacilos y bifidobacterias en caldo MRS (Difco, Detroit, Mich.) complementado con clorhidrato de L-cisteína al 0,05% (p/v) (mMRS) (98% puro Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) en condiciones anaerobias (frascos anaerobios con Anaerocult®A Gas Packs; Merck, Darmstadt, Alemania) a 37°C. Cuando se requirió medio sólido, se añadió agar al 1,5% (p/v) (Oxoid, Hampshire, R.U.) al medio mMRS. Se prepararon cultivos convencionales mediante inoculación de 10 ml de caldo mMRS con 10 µl de una disolución madre congelada (-80°C) seguido por incubación a 37°C durante 16-24 h. Entonces se subcultivaron cepas en 10 ml de caldo de mMRS durante 16-24 h a 37°C antes de la inoculación en el recipiente de fermentación.

Medición de ácido γ -aminobutírico:

35 Antes del examen de las cepas para la producción de GABA, se subcultivó cada cepa en mMRS. Se inocularon las cepas (1% (v/v)) de manera anaerobia en caldo mMRS complementado con 30 mg/ml de ácido glutámico monosódico (MSG) (Sigma) a 37°C durante 72 h. Se centrifugó un ml del caldo de cultivo a 14.000 x g durante 1 min y se determinó el nivel de GABA en el sobrenadante del cultivo analizando el contenido de aminoácidos libres con un analizador de aminoácidos de alto rendimiento Beckmann 6300 tal como se describe a continuación.

40 *Crecimiento de *Lactobacillus brevis* DPC6108 en presencia de MSG:*

45 Se monitorizó el crecimiento de *Lactobacillus brevis* DPC6108 en mMRS complementado con MSG (30 mg/ml). Se inoculó la cepa a partir de un cultivo cultivado durante la noche recién preparado a una densidad celular final de 10^6 UFC/ml y se hizo crecer el cultivo de manera anaerobia a 37°C. Se monitorizaron el crecimiento bacteriano (recuentos celulares en agar mMRS, tras dilución en serie en diluyente de recuperación máximo (MRD), a 37°C durante 48 h), y conversión de MSG en GABA (determinado analizando el contenido de aminoácidos libres con un analizador de aminoácidos de alto rendimiento Beckmann 6300 tal como se describe a continuación), por triplicado a intervalos de tiempo regulares durante más de 55 h.

50 *Producción de ácido γ -aminobutírico mediante bacterias del intestino seleccionadas en fermentaciones fecales con control de pH:*

55 Se preparó el medio de fermentación fecal tal como se describió anteriormente (Fooks y Gibson 2003), con una única modificación que implicó la adición de 30 mg/ml de MSG. Se dejó enfriar el medio durante la noche a temperatura ambiente tras esterilización y se transfirieron 160 ml a un recipiente de fermentación y se purgó con nitrógeno durante 30 min antes de la inoculación. Se obtuvieron muestras fecales recién preparadas de tres adultos sanos, a quienes no se les había recetado antibióticos en los 3 meses previos. Sin embargo, los niveles de ingesta de MSG en su dieta en los días antes del muestreo eran desconocidos. Se preparó una suspensión fecal recién preparada (20% (p/v)) en MRD anaerobio que contenía cisteína al 0,05% (p/v). Se inoculó el medio de fermentación anaerobio con 40 ml de suspensión fecal recién preparada en cada recipiente de fermentación. Para determinar el efecto de añadir adiciones conocidas al medio de fermentación con bacterias productoras de GABA derivadas de seres humanos, *Lb. brevis* DPC6108 se hizo crecer de manera anaerobia a 37°C en mMRS complementado con 30 mg/ml MSG durante 48 h. Se recogieron las células mediante centrifugación a 4.000 x g durante 10 min, se lavaron una vez con MRD anaerobio que contenía cisteína al 0,05% (p/v) y se inocularon en la suspensión de fermentación fecal para dar un número inicial de $\sim 10^8$ células/ml en el recipiente de fermentación. Se llevaron a cabo fermentaciones a 37°C bajo nitrógeno, y se mantuvieron a pH 6,8 durante 24 h. Se retiraron las muestras a las 0, 4,

9, 21 y 24 h para análisis de GABA. Se llevaron a cabo fermentaciones fecales por duplicado.

Análisis de aminoácidos:

- 5 Se desproteinizaron las muestras mezclando volúmenes iguales de ácido tricloroacético al 24% (p/v) (TCA) y muestra. Entonces se dejaron en reposo durante 10 min antes de centrifugar a 14.000 x g (Microcentaur, MSE, R.U.) durante 10 min. Se retiraron los sobrenadantes y se diluyeron con tampón citrato de sodio 0,2 M, pH 2,2 para dar aproximadamente 250 nmol de cada residuo de aminoácido. Entonces se diluyeron las muestras 1 en 2 con el patrón interno, norleucina, para dar una concentración final de 125 nm/ml. Se cuantificaron los aminoácidos usando un analizador de aminoácidos JLC-500/V de Jeol (Jeol (R.U.) Ltd., Garden City, Herts, R.U.) equipado con una columna de intercambio catiónico de alto rendimiento de Na⁺ de Jeol.

Estudios con animales:

- 15 Probiótico: *Lactobacillus brevis* DPC 6108
Control negativo (placebo): trehalosa al 15%
Control positivo: polvo de GABA comercial (alrededor de 2,6 mg/kg de peso corporal)
- 20 Método de administrar el probiótico: se resuspenden GABA y polvos liofilizados en el agua para beber
Dosis de probiótico: ~1 x 10⁹ UFC al día
- 25 Duración: 5 semanas
Dieta: dieta de pienso convencional – contiene el sustrato (glutamato) y cofactor (fosfato de piridoxal) en la concentración necesaria para la producción de GABA por la cepa probiótica
- 30 Modelo: rata Sprague-Dawley
Número de animales: 10 por grupo
Enjaulado: alojamiento en grupo (5 por jaula)
- 35 Diseño del experimento:
Las ratas se dividen en tres grupos (A-C, n = 10) y se someten a los siguientes tratamientos dietéticos diariamente:
- 40 *Grupo A* Polvo liofilizado de placebo (trehalosa al 15% en dH₂O).
Grupo B Polvo de GABA (2,6 mg/kg de peso corporal) en combinación con polvo liofilizado de placebo (trehalosa al 15% en dH₂O).
- 45 *Grupo C* *Lactobacillus brevis* DPC 6108
Administración de *L. brevis* DPC 6108
Semana 0-final: se resuspenden *L. brevis* DPC 6108, polvo de placebo y polvo de GABA en el agua para beber cada día. El probiótico a una concentración basándose en que cada rata obtiene ~10⁹ UFC al día (basándose en que las ratas beben aproximadamente 10 ml/100g de peso corporal) y el GABA a una concentración de 2,6 mg/kg de peso corporal/día.
- 50 Parámetros medidos durante el estudio:
- 55 • Peso (tres veces a la semana)
• Análisis de comportamiento: en la semana 4 (prueba de campo abierto y natación forzada) y semana 5 (distensión colorrectal).
- 60 Análisis de criterio de valoración
• Razón de glutamato/GABA en plasma y colon
- 65 • Recogida de suero para análisis de glucosa, insulina, hormona del crecimiento y corticosterona

- Expresión génica (receptores GABA_A, GABA_B) en regiones específicas del cerebro
- Niveles de neurotransmisores en regiones específicas del cerebro (DOPA, 5-HT, NE)

5 • Perfil de citocinas del bazo

- qPCR para cuantificación de *Lactobacillus* sp. a partir de contenido fecal

- Niveles de colesterol en el hígado

10

Resultados

Selección de lactobacilos y bifidobacterias intestinales cultivables para la producción de ácido γ -aminobutírico:

15 Los detalles de las cepas con la capacidad de producir GABA a partir de MSG se muestran en la tabla 1. Las capacidades de conversión de estas cepas variaron cuando se hicieron crecer en diferentes concentraciones de MSG. *Lb. brevis* DPC6108 pudo realizar una conversión del 100% de 10 y 20 mg/ml de MSG en 11,03 +/-0,31 y 20,47 +/- 0,23 mg/ml de GABA en mMRS. Aumentar las concentraciones de MSG hasta 30, 40 ó 50 mg/ml dio como resultado un porcentaje de conversiones disminuido del 94,4% (28,02 +/- 0,23 mg/ml de GABA), 75,98% (30,39 +/- 0,56 mg/ml de GABA) y 64,64% (32,32 +/- 1,24 mg/ml de GABA) respectivamente mediante *Lb. brevis* DPC6108

20 (tabla 1). Las tres cepas productoras de GABA restantes, *B. dentium* DPC6333, *B. infantis* UCC35624 y *B. adolescentis* DPC6044 también convirtieron de manera eficaz MSG en GABA (tabla 1). Las eficacias de conversión de MSG en GABA oscilaron entre el 22% (2,2 +/- 0,43 mg/ml de GABA) y el 60,9% (6,09 +/- 0,22 mg/ml de GABA) y entre el 15,86% (3,17 +/-0,39 mg/ml de GABA) y el 61,6% (12,32 +/- 0,69 mg/ml de GABA) en 10 y 20 mg/ml de

25 MSG en mMRS, respectivamente, mediante las 4 cepas de bifidobacterias. De manera similar a *Lb. brevis* DPC6108, aumentar las concentraciones de MSG hasta 30, 40 ó 50 mg/ml dio como resultado un porcentaje de conversiones de MSG en GABA disminuido (tabla 1). Todas las 86 cepas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* restantes sometidas a ensayo en este estudio crecieron en mMRS que contenía 30 mg/ml de MSG, pero no convirtieron MSG en GABA en cualquier nivel significativo.

30

TABLA 1

Especie	Fuente de cepa	GABA (mg/ml) convertido a partir de concentraciones crecientes de MSG (mg/ml)				
		10 (mg/ml) MSG	20 (mg/ml) MSG	30 (mg/ml) MSG	40 (mg/ml) MSG	50 (mg/ml) MSG
<i>Lactobacillus brevis</i> DPC6108	Heces de lactante	11,01+/-0,31	20,47+/-0,13	28,02+/-0,23	30,39+/-0,56	32,32+/-1,24
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> DPC6044	Heces de lactante	2,2+/-0,43	3,17+/-0,39	2,76+/-0,37	1,24+/-0,1	3,07+/-0,26
<i>Bifidobacterium dentium</i> DPC6333	Heces de lactante	5,25+/-0,33	7,69+/-0,75	8,62+/-0,86	5,54+/-0,28	6,16+/-0,47
<i>Bifidobacterium dentium</i> NFBC2243	Caries dental	6,09+/-0,22	12,32+/-0,69	12,48+/-0,60	5,68+/-0,03	8,63+/-0,70
<i>Bifidobacterium infantis</i> UCC35624	Región ileocecal	3,46+/-0,05	3,26+/-0,13	2,63+/-0,223	5,68+/-0,146	2,04+/-0,144

*Producción de γ -aminobutírico mediante *Lactobacillus brevis* DPC6108 en presencia de 30 mg/ml de glutamato monosódico:*

35

Lactobacillus brevis DPC6108 fue la cepa más eficaz sometida a prueba para determinar la conversión de MSG en GABA. Se monitorizó el crecimiento de *Lb. brevis* DPC6108 en mMRS con 30 mg/ml a lo largo del tiempo (figura 1). Se asoció a la producción de GABA la fase estacionaria de crecimiento del cultivo. Se logró el recuento celular máximo a las 28 h y la máxima conversión de MSG en GABA fue a las 55 h (figura 1).

40

*Producción de ácido γ -aminobutírico mediante la microbiota cultivable del intestino y *Lactobacillus brevis* DPC6108 en presencia de 30 mg/ml de glutamato monosódico:*

45

Se investigó el efecto de 30 mg/ml de MSG y $\sim 10^8$ *L. brevis* DPC6108 vivo en la microbiota cultivable del intestino usando una fermentación simple basada en heces anaerobia con pH controlado (Fooks y Gibson 2003). Se obtuvieron muestras de deposiciones obtenidas de tres sujetos adultos y se llevaron a cabo fermentaciones fecales por duplicado con cada muestra. Se retiraron las muestras a las 0, 4, 9, 21 y 24 h para el análisis de GABA. No se detectó GABA en la fermentación fecal usando la muestra recogida del sujeto número 1 a las 0, 4, 9 o 21 h. Sin

embargo, se detectó a las 24 h, a una concentración de 0,56 µg/ml de fermentación fecal (figura 2). Se detectó GABA en una fermentación basada en heces usando una muestra recogida del sujeto número 2. La concentración de GABA alcanzó un máximo a las 4 h y posteriormente disminuyó a las 9, 21 y 24 h, con concentraciones de 5,82, 5,03, 1,75 y 0,94 µg/ml, respectivamente (figura 2). También se detectó GABA en una fermentación basada en heces usando una muestra recogida del sujeto número 3. La concentración de GABA máxima de 1,83 µg/ml se registró a las 0 h y la concentración de GABA disminuyó posteriormente a las 4, 9, 21 y 24 h, con concentraciones de 0,39, 0, 0 y 0 µg/ml, respectivamente (figura 2). Se añadió *Lb. brevis* DPC6108 a una fermentación basada en heces para examinar el efecto de añadir una posible cepa productora de GABA probiótica en una fermentación fecal a pH fisiológico. Se obtuvo la muestra fecal usada para hacer la suspensión fecal del sujeto 3. La concentración de GABA aumentó hasta 66,25 µg/ml tras 4 h y alcanzó un máximo a las 9 h de 70,72 µg/ml (figura 2). De manera similar a otras fermentaciones basadas en heces, la concentración de GABA disminuyó a las 21 y 24 h hasta 4,18 y 0,47 µg/ml, respectivamente (figura 2).

Estudios con animales:

No se registraron diferencias en el aumento de peso corporal, peso de la glándula suprarrenal, niveles de glucosa en suero, o contenido en colesterol de los hígados durante el estudio.

Se llevaron a cabo pruebas de comportamiento incluyendo la prueba de campo abierto, como indicador de ansiedad, al final del experimento. No se encontraron diferencias en la distancia total movida por los animales, pero los animales pasaron significativamente ($p > 0,05$) más tiempo en el grupo de GABA en la zona interna, y se registraron datos que se aproximaban a la significancia para el grupo de *L. brevis* DPC 6108, en comparación con el grupo de control de placebo, lo que sugiere un efecto de tipo ansiolítico en los dos grupos anteriores, en comparación con el último grupo. (Se obtuvo un valor de p de 0,0522 para el grupo tratado con *L. brevis* en la cantidad de tiempo pasado en la zona interna.).

Los resultados de la prueba de natación forzada (FST) fueron los siguientes: los resultados previos a la natación demuestran que no hay diferencias entre ninguno de los grupos en cuanto a inmovilidad, natación o escalada. La prueba de natación forzada en el día 2 reveló un aumento significativo en la inmovilidad en el grupo tratado con GABA en comparación con animales de control lo que indica una actividad de tipo depresor.

Lista de secuencias

<110> University College Cork - National University of Ireland, Autoridad de Desarrollo Agrícola y Alimentario de Cork (Teagasc)

<120> Bacterias cultivables productoras de GABA derivadas del tracto gastrointestinal humano

<130> Documento P10763PC00

<150> Documento EP 12151768.4

<151> 19-01-2012

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1396

<212> ADN

<213> *Lactobacillus brevis*

<220>

<221> misc_feature

<223> "n" en las posiciones 1, 23 y 1390 es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> n es a, c, g o t

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(23)

<223> n es a, c, g, o t

ES 2 659 947 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1390)..(1390)
 <223> n e s a, c, g, o t

5

<400> 1

```

natgacgtgc ttgcactgat ttnaacaatg aagcgagtgg cgaactggtg agtaacacgt      60
gggaaatctg cccagaagca ggggataaca cttggaaaca ggtgctaata ccgataaca      120
acaaaatccg catggattht gtttgaaagg tggcttcggc tatcacttct ggatgatccc      180
gcggcgtatt agttagtgg tgaggtaaag gccaccaag acgatgatac gtagccgacc      240
tgagagggta atcggccaca ttgggactga gacacggccc aaaytcctac gggaggcagc      300
agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc aatgccgctg gagtgaagaa      360
gggtttcggc tcgtaaaact ctgttgtaa agaagaacac ctttgagagt aactgttcaa      420
gggttgacgg tatttaacca gaaagccagc gctaactacg tgccagcagc cgcggaata      480
cgtaggtggc aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttttta      540
agtctgatgt gaaagccttc ggcttaaccg gagaagtgca tcggaaactg ggagacttga      600
gtgcagaaga ggacagtgga actccatgtg tagcggtgga atgcgtagat atatggaaga      660
acaccagtgg cgaaggcggc tgtctagtct gtaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg      720
tagcgaacag gattagatac cctggtagtc catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg      780
gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag cactccgctt ggggagtacg      840
accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg      900
tttaattcga agctacgca agaaccttac caggtcttga catcttctgc caatcttaga      960
gataagacgt tcccttcggg gacagaatga caggtggtgc atggttgcg tcagctcgtg     1020
tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgaaccc ttattatcag ttgccagcat     1080
tcagttgggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg argaaggtgg ggatgacgtc     1140
aatcatcat gcccttatg acctgggcta ccaccgtgct acaatggacg gtacaacgag     1200
tcgcgaagtc gtgaggctaa gctaactctt taaagccggt ctcagttcgg attgtaggct     1260
gcaactcgcc tacatgaagt tggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa     1320
tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcacacatg agagtttgta acaccxaaag     1380
ccggtgagan acctcg                                             1396
    
```

10

REIVINDICACIONES

1. Bacteria aislada de *Lactobacillus brevis* (DPC6108) depositada ante la National Collection of Industrial and Marine Bacteria (NCIMB) Limited el 28 de noviembre de 2011 y a la que se concedió el número de registro NCIMB 41903, estando caracterizada la bacteria porque puede producir ácido γ -aminobutírico (GABA).
5
2. Bacteria aislada según la reivindicación 1, que puede realizar una conversión del 100% de glutamato monosódico (MSG) en ácido γ -aminobutírico (GABA) en una prueba de conversión *in vitro*.
- 10 3. Bacteria aislada según la reivindicación 1, que se deriva de una muestra fecal neonatal humana.
4. Bacteria aislada según la reivindicación 1 ó 2, en forma de células vivas, células muertas, componentes celulares, extractos celulares o lisados celulares.
- 15 5. Bacteria aislada según cualquier reivindicación anterior, caracterizada por una secuencia de ARNr 16s de SEQ ID NO: 1.
6. Composición que comprende una bacteria aislada según cualquier reivindicación anterior.
- 20 7. Composición según la reivindicación 6, en forma de un producto formulado para la ingestión humana.
8. Composición según la reivindicación 7, en forma de un producto alimenticio, una bebida, un complemento alimenticio o un medicamento.
- 25 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y que incluye además al menos un cultivo bacteriano seleccionado del grupo que consiste en:
- *Bifidobacterium dentium* (DPC6333) NCIMB 41904 depositada el 28 de noviembre de 2011;

30 - *Bifidobacterium adolescentis* (DPC6044) NCIMB 41908 depositada el 2 de diciembre de 2011;

 - *Bifidobacterium infantis* (UCC35624) NCIMB 41003 depositada el 13 de enero de 1999; y

35 - *Bifidobacterium dentium* NCFB2243.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 y que comprende una fuente de glutamato.
11. Composición según la reivindicación 10, en la que la fuente de glutamato es una sal de glutamato.
- 40 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso como medicamento.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, para su uso en un método de regulación o tratamiento de la función cardiovascular, secreción de la hormona del crecimiento, alteración del estado de ánimo, ansiedad, estrés, dolor, insuficiencia renal o estados proliferativos.
- 45 14. Composición para su uso según la reivindicación 13, en la que la composición se administra a un individuo por vía oral y forma parte de la microbiota del individuo.
15. Composición para su uso según la reivindicación 13 ó 14, en la que la composición incluye glutamato libre.

FIG. 1

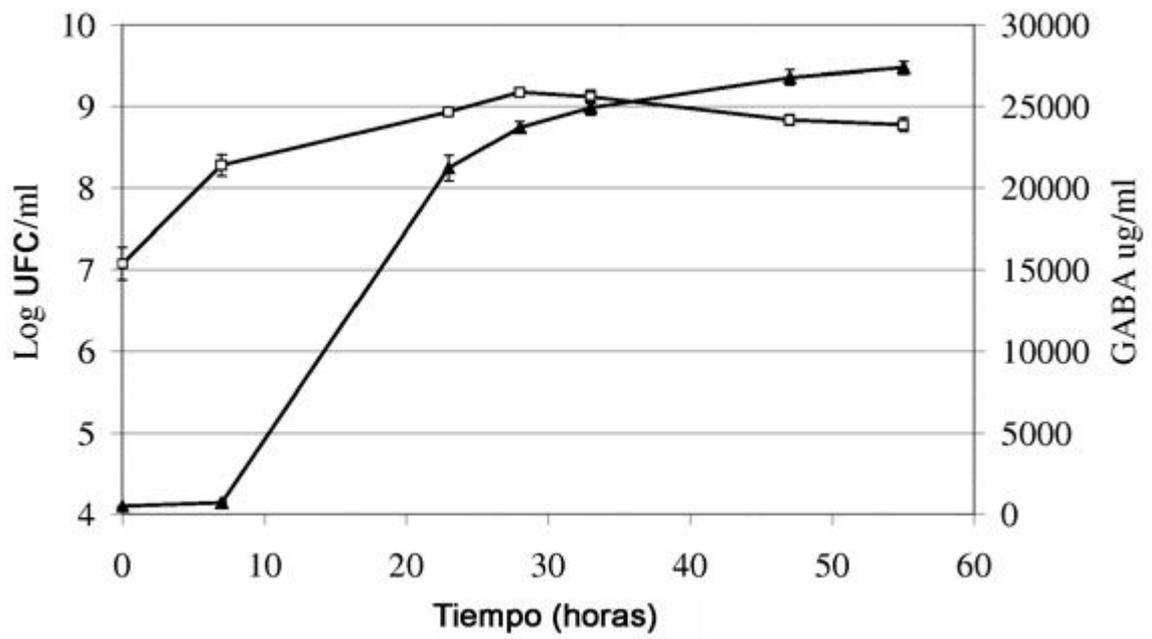


FIG. 2

