

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 685**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21	(2006.01) A61K 38/22	(2006.01)
C12N 15/90	(2006.01) A61K 8/64	(2006.01)
C12N 15/16	(2006.01) A61Q 19/06	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01) C07K 14/575	(2006.01)
A61K 38/26	(2006.01) C07K 14/435	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01) C12N 9/10	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01)	
A61P 3/10	(2006.01)	
C12R 1/46	(2006.01)	
A61K 35/744	(2015.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2016 PCT/CN2016/077184**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16150392**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2016 E 16767769 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3260531**

54 Título: **Transformante utilizado para perder peso y reducir la grasa, procedimiento de construcción para el transformante y aplicación del transformante**

30 Prioridad:

26.03.2015 CN 201510136916

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2020

73 Titular/es:

**NANJING SINOGEN BIOTECH &
PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
No. 101 of Tongtian Road, Science Park,
Jiangning District
Nanjing, Jiangsu 211100, CN**

72 Inventor/es:

**LIN, YAN;
XIANG, RONG;
ZHAO, ALLANZIJIAN y
LI, FANGHONG**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 750 685 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

Transformante utilizado para perder peso y reducir la grasa, procedimiento de construcción para el transformante y aplicación del transformante.

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la medicina biológica, en particular a un transformante para perder peso y reducir lípidos en sangre, y al procedimiento de construcción y a la utilización del mismo.

Antecedentes

La obesidad es un problema de salud en el mundo actualmente. En Europa, Estados Unidos de América y otros países desarrollados, más de la mitad de las personas presentan sobrepeso, de las cuales, el 20-30% son pacientes obesos. La obesidad puede afectar no solamente a la calidad de vida de las personas, sino asimismo puede inducir una serie de enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, y enfermedades renales, etc., provocando grandes peligros para la salud humana. Las encuestas han mostrado que el riesgo de hipertensión se incrementa en 10% cada incremento de una unidad en el IMC.

Aunque muchos factores, tales como genética, trastornos endocrinos, estructuras de la dieta, y estilo de vida pueden contribuir a la obesidad, la inmensa mayoría de pacientes obesos presentan estructuras de dieta y estilos de vida nada saludables. Actualmente, los tratamientos de obesidad incluyen principalmente terapia de comportamiento, terapia de fármacos, y tratamiento quirúrgico, etc. La terapia de comportamiento, tal como hacer dieta e incrementar los ejercicios, no puede lograr un buen efecto en la pérdida de peso. El peso corporal es fácil de recuperar, y la mayoría de las personas no pueden lograr una pérdida de peso persistente a largo plazo. El tratamiento quirúrgico puede conllevar un riesgo elevado, que no es fácilmente aceptado por la mayoría de los pacientes. Por lo tanto, la mayoría de los pacientes obesos tienden a recibir terapia de fármacos.

Actualmente, los fármacos para la pérdida de peso incluyen medicinas químicas y medicinas herbarias chinas. Las medicinas químicas generalmente actúan en el sistema nervioso central para suprimir el apetito para lograr la pérdida de peso, tal como fentermina, dexfenfluramina y sibutramina, etc. Sin embargo, estos fármacos podrían provocar síndrome serotoninérgico, con el efecto secundario de cambios en el estado mental (tales como ansiedad, manía, etc.), o incluso podrían provocar hipertensión y angina de pecho. El inhibidor de lipasa pancreática orlistat (orlistat, nombre comercial Xenical) es un fármaco químico para perder peso, que puede bloquear la hidrólisis de triacilglicerol e inhibir la absorción de grasa. Pero presenta los efectos adversos de esteatorrea, deficiencia de vitaminas liposolubles. Las medicinas herbarias chinas para la pérdida de peso son principalmente extractos vegetales y fibras dietéticas, que pueden lograr una pérdida de peso al promover el movimiento del intestino con una dieta. El uso a largo plazo de medicinas herbarias puede provocar un desequilibrio nutricional, desequilibrio hidroelectrolítico, fatiga, etc.

La oxintomodulina (OXM) es una hormona intestinal peptídica corta segregada por células L epiteliales intestinales. Está codificada por el gen de proglucagón, que sufre una variedad de procesamiento diferentes para producir OXM, glicentina, péptido 1 similar a glucagón (GLP-1), GLP-2, y otras hormonas peptídicas activas. La OXM humana contiene 37 aminoácidos, con el efecto inhibidor de la ingestión de alimentos y del apetito, incrementando la movilización de la grasa. La expresión de OXM está muy relacionada con la incidencia de obesidad. Los pacientes obesos presentan una menor secreción de OXM, mientras que los pacientes con anorexia (tales como diarrea tropical, yuyenostomía) tienen una mayor secreción de OXM. La OXM puede regular el apetito y la absorción de energía a través de tres enfoques: en primer lugar, OXM actúa directamente sobre el receptor de GLP-1 de la célula epitelial de la mucosa gastrointestinal para inhibir la absorción de glucosa y lípido; en segundo lugar, OXM actúa sobre el nervio vago para reducir la secreción de grelina y suprimir el apetito. Los estudios han mostrado que la OXM subcutánea puede reducir las concentraciones sanguíneas de grelina en roedores en un 20%, mientras que, en el ser humano, en un 44%. En tercer lugar, OXM estimula la síntesis y secreción de la hormona tiroidea, para incrementar el consumo de energía y la movilización de la grasa. La OXM subcutánea puede reducir la absorción de alimentos y el peso corporal de roedores, y reducir las grasas. En el Reino Unido, participaron 26 pacientes obesos en un ensayo bienmascarado. La OXM se administró subcutáneamente 30 minutos antes de las comidas durante 4 semanas. Los resultados mostraron que los pesos corporales de los pacientes en el grupo de tratamiento se redujeron en 2.3 kg, mientras que aquellos en el grupo de control se redujeron solamente en 0.5 kg, y los hábitos y gustos alimentarios de los sujetos no cambiaron. La compañía British Thiakis sintetizó químicamente péptidos similares a OXM TKS1225, que ha entrado en ensayo clínico de fase III. La farmacéutica Wyeth de los Estados Unidos de América ha adquirido el derecho exclusivo a usar TKS1225. Se espera que desarrolle TKS1225 en un nuevo fármaco para la pérdida de peso en años venideros. Sin embargo, TKS1225 y otros péptidos similares a OXM son producidos generalmente mediante síntesis química o bioingeniería. Los productos son mayoritariamente en polvo, y se administran mediante inyecciones, que presentan el inconveniente de costes elevados de producción, semivida *in vivo* corta, y el inconveniente de la medicación. De este modo, no es fácilmente aceptado por pacientes con obesidad.

La patente china concedida (200910041386.X) dio a conocer que el *bifidobacterium* que expresa el gen de oxintomodulina humana ha logrado un efecto positivo sobre la pérdida de peso y reducción de lípidos, pero este sistema de expresión de *bifidobacterium* presenta un inconveniente significativo. El vector plasmídico pBBADs porta el gen de resistencia a ampicilina, que introducirá el alérgeno ampicilina en el cuerpo humano. Si se usa durante un tiempo prolongado, puede provocar trastornos de la flora intestinal y producir resistencia a fármacos de los hospedantes. En esta invención, la cepa *L. lactis* no contiene un gen de resistencia a antibióticos; es una nueva composición farmacéutica que no introducirá alérgenos extraños, con un grado elevado de seguridad biológica.

Sumario

Un objetivo de la presente invención es proporcionar el transformante para la pérdida de peso y reducción de lípidos en sangre; y el transformante presenta una expresión elevada de oxintomodulina humana sin el gen de resistencia a antibióticos. De este modo, es seguro para el ser humano y la biosfera.

El segundo objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de construcción del transformante.

El tercer objetivo de la invención es proporcionar las utilidades del transformante.

Para resolver los problemas técnicos anteriores, la invención adopta las siguientes soluciones técnicas.

Un transformante para la pérdida de peso y reducción de lípidos en sangre, obtenido mediante inserción en el gen thyA (timidilato sintasa, thyA) de *L. lactis* con el gen de oxintomodulina humana optimizado por codones, a través de recombinación homóloga.

En el que, el gen de OXM humana, cuya secuencia de ácido nucleico se puede optimizar según los codones preferidos del hospedante seleccionado, sin cambiar las secuencias de aminoácidos, de manera que se puede incrementar el nivel de expresión de oxintomodulina humana en el transformante. Preferentemente, la secuencia nucleotídica es como se muestra en SEC ID n°: 1.

En el que, la *L. lactis* es *L. lactis* NZ9000, *L. lactis* NZ3900 o *L. lactis* MG1363.

Un procedimiento para construir el transformante para la pérdida de peso y reducción de lípidos en sangre, que comprende las siguientes etapas:

(1) Cortar y empalmar (del inglés, "splice") sucesivamente la secuencia en sentido 5' (del inglés, "upstream") del gen thyA de *L. lactis*, la secuencia del gen de oxintomodulina humana optimizado por codones y la secuencia en sentido 3' (del inglés "downstream") del gen thyA de *L. lactis*, y sintetizar artificialmente el fragmento del gen recombinante;

(2) Electrotransformar el fragmento del gen recombinante recientemente construido en *L. lactis* para la recombinación homóloga, y seleccionar las cepas thyA⁺ OXM⁺.

En la invención, el gen thyA en el genoma de *L. lactis* se sustituye por el gen de OXM humana a través de recombinación homóloga, obteniendo la expresión constitutiva de oxintomodulina humana en *L. lactis*.

Las utilidades del transformante para preparar fármacos y alimentos para la pérdida de peso y reducción de lípidos en sangre están comprendidas dentro del alcance de protección de la presente invención. En las que las medicinas son un líquido oral, polvo de bacterias viables, medicamentos orales en comprimidos o en cápsulas, y los alimentos son alimentos sólidos o bebidas.

Las utilidades del transformante para la pérdida de peso y la reducción de lípidos en sangre para preparar agentes hipoglucémicos en pacientes obesos asimismo están comprendidas dentro del alcance de protección de la presente invención. En las que los medicamentos son un líquido oral, polvo de bacterias viables, comprimido o cápsula oral.

Las utilidades del transformante para preparar fármacos para la reducción de lípidos en sangre para pacientes con hígado graso asimismo están comprendidas dentro del alcance de la protección de la presente invención. En las que los medicamentos son un líquido oral, polvo de bacterias viables, comprimido o cápsula oral.

La invención presenta las siguientes características prominentes: las características de crecimiento a largo plazo y colonización de *L. lactis* en los intestinos, recombinación homóloga del gen, las bacterias de ácido láctico con expresión constitutiva de oxintomodulina se criban y se obtienen. La meta es lograr la función biológica de oxintomodulina en la regulación del apetito y absorción de energía, pérdida de peso y reducción de lípidos en sangre. Este procedimiento no requiere la separación y la purificación del polipéptido de oxintomodulina, con un procedimiento de producción simple y de bajo coste. Se puede tomar oralmente y de manera conveniente. De este modo, este procedimiento supera los inconvenientes del elevado coste de producción y el inconveniente de la

medicación en la producción de péptidos similares a oxintomodulina usando ingeniería genética o síntesis química.

La invención puede lograr los siguientes efectos beneficiosos. En comparación con la técnica anterior, la invención presenta las siguientes ventajas.

1. La presente invención construye la *L. lactis* recombinante que expresa de forma constitutiva OXM humana, que es una cepa auxótrofa para timina. Puesto que la timidina es un nutriente esencial para el crecimiento de *L. lactis*, la timidina no está disponible cuando el gen *thyA* se suprime del genoma. Por lo tanto, las bacterias de ácido láctico tras la transformación no pueden reproducirse ni crecer en el entorno externo, ni producir ninguna contaminación en el entorno o producir ningún efecto en otros microorganismos en el entorno.
2. La cepa construida según la presente invención no implica ningún elemento dañino para el cuerpo humano y el entorno, incluyendo antibióticos, plásmidos y genes que pueden producir proteínas tóxicas; por lo tanto, se puede usar de forma segura en el cuerpo humano. El *Bifidobacterium* transgénico que expresa OXM en la patente china 200910041386 contiene el gen de resistencia a ampicilina. El uso a largo plazo de esta cepa puede inducir resistencia a fármacos; además, tras ser excretada en las heces fuera del cuerpo, se puede recombinar con otras cepas en el entorno para producir "superbacterias"; además, muchas personas son alérgicas a la ampicilina.
3. Las bacterias tienen un mejor efecto sobre la pérdida de peso en ratones obesos que el del *Bifidobacterium* transgénico que expresa OXM dado a conocer en la patente china 200910041386.X. En el mismo período de tiempo y a las mismas dosis, el *Bifidobacterium* puede reducir el peso corporal en 21.4%, mientras que la *L. lactis* puede reducir el peso corporal en 31.1%, un incremento significativo. Además, los niveles de colesterol en sangre y en el hígado se reducen significativamente, próximos a los niveles normales, después del tratamiento con la *L. lactis* que expresa OXM. Los experimentos con animales han mostrado que, tras alimentarlos con *L. lactis* transgénica productora de OXM durante 1 mes, los pesos corporales de los ratones se reducen hasta niveles normales, y sus niveles de glucosa en sangre en ayunas asimismo están próximos al normal.
4. Las bacterias presentan el efecto sobre la pérdida de peso y reducción de lípidos en sangre para ratones diabéticos. Sus poblaciones diana se extenderán a pacientes obesos, pacientes diabéticos, y pacientes con síndrome metabólico con trastornos del metabolismo de lípidos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa los resultados del genotipado mediante PCR.

La figura 2 representa el análisis de inmunotransferencia de la expresión de OXM en *L. lactis*.

La figura 3 representa la concentración de OXM en suero 5 horas tras la alimentación con *L. lactis*.

La figura 4 representa la curva de cambio de peso corporal tras alimentar ratones obesos con *L. lactis*.

La figura 5 representa la curva de ingestas de alimento 6 semanas tras alimentar ratones con *L. lactis*.

La figura 6 representa el efecto de *L. lactis* en comparación con *Bifidobacterium*.

La figura 7 representa el barrido mediante CT del abdomen tras alimentar ratones obesos con *L. lactis* durante 6 semanas. A muestra los ratones normales; B muestra ratones obesos alimentados con NZ9000; C muestra ratones obesos alimentados con NZ9000-OXM (el área de color gris claro en la línea blanca representa el área de grasa).

La figura 8 representa la pérdida de grasas corporales en ratones obesos tras alimentarlos con *L. lactis* durante 6 semanas.

La figura 9 representa la concentración de glucosa en sangre en ayunas en ratones obesos tras alimentarlos con *L. lactis* durante 6 semanas.

La figura 10 representa el nivel de colesterol en suero en ratones obesos alimentados con *L. lactis* durante 6 semanas.

La figura 11 representa la curva de cambio de peso corporal en ratones diabéticos alimentados con *L. lactis* durante 5 semanas.

La figura 12 representa el nivel de colesterol en suero de ratones diabéticos alimentados con *L. lactis* durante

5 semanas.

Descripción detallada

5 La presente invención se puede poner más claramente de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos. Sin embargo, los expertos en la materia apreciarán fácilmente que las formas de realización descritas son proporcionadas a título ilustrativo y no limitativo de la invención, como se expone en las reivindicaciones.

Ejemplo 1: preparación de *L. lactis* transformado con el gen de OXM

(1) Construcción del fragmento de recombinación homóloga:

Según la secuencia publicada del genoma de *L. lactis*, se encuentran respectivamente la secuencia de 1000 pb en sentido 5' del codón de partida del gen *thyA*, y de 1000 pb en sentido 3' del codón de terminación.

Las secuencias de ácidos nucleicos de OXM se optimizan según las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos de OXM humana, y en referencia a las frecuencias de uso de codones de *L. lactis*. La secuencia resultante se muestra en SEC ID n°: 1.

Síntesis química del fragmento génico OXM-M: la secuencia comprende 1000 pb en sentido 5' del codón de partida de *thyA* de *L. lactis*, la secuencia del gen de OXM humana, y 1000 pb en sentido 3' del codón de terminación del gen *thyA* de *L. lactis*.

(2) Preparación y selección de *L. lactis* transgénica que expresa OXM

Electrotransformar el fragmento de oxintomodulina humana OXM-M a la cepa *L. lactis* NZ9000, denominada *L. lactis* OXM.

Añadir 2 µl de OXM-M a 40 µl de *L. lactis* bacteriana competente, mezclar bien, colocar en hielo durante 5 min., y transferir después a una cubeta de electroporación de 0.4 cm.

Colocar la cubeta de electroporación en la cámara de descarga del aparato de electroporación, y cargar el capacitor; la condición se ajustó a voltaje 2000 V, capacitancia 25 µF, resistencia 200 Ω, y duración del pulso 4 ms.

Tras la electroporación, retirar la cubeta rápidamente, añadir a 1 ml de medio de cultivo M17, colocar entonces en hielo durante 5 min., e incubar después durante 1 h a 30°C, después extender en un medio sólido que contiene desoxitimidina y cultivar toda la noche. Al día siguiente, recoger colonias individuales para inocularlas al medio sólido deficiente en desoxitimidina y que contiene desoxitimidina, respectivamente; si la cepa crece en un medio sólido que contiene desoxitimidina, pero no crece en un medio sólido deficiente en desoxitimidina, entonces las cepas son bacterias positivas.

(3) Genotipado de los transformantes que expresan OXM

Se diseñan tres pares de cebadores de PCR para el genotipado.

Cebador 1: IF (SEC ID No: 2) 5'-GGTTTTATTGTTTCATTAGT-3', situado en la secuencia en sentido 5' de *thyA*;

1R (SEC ID No: 3) 5'-GAGATAATCTTTTTTTCAT-3', situado al comienzo de la secuencia del gen de OXM.

Cebador 2: 2F (SEC ID No: 4) 5'-GGAATAACATTGCCTAATGA-3', situado en el extremo de la secuencia del gen de OXM;

2R (SEC ID No: 5) 5'-TTTATTATTAGGGAAAGCAA-3', situado en la secuencia en sentido 3' de *thyA*.

Cebador 3: 3F (SEC ID No: 6) 5'-ATGACTTACGCAGATCAAGT-3', situado al comienzo de la secuencia del gen *thyA*;

3R (SEC ID No: 7) 5'-TTAAATTGCTAAATCAAATT-3', situado en el extremo de la secuencia del gen *thyA*.

Para la reacción de PCR estándar, se usan 2 µl de cultivos bacterianos.

Los productos de la PCR se someten a electroforesis en gel de agarosa. Los resultados se muestran en la figura 1. La cepa NZ9000 no se somete a recombinación génica, solamente la secuencia de *thyA* se amplifica mediante el cebador 3. Puesto que la cepa recombinante NZ9000-OXM carece del gen *thyA*, no existe ningún producto para la PCR amplificada mediante el cebador 3, mientras que los fragmentos que contienen la secuencia del gen de

OXM son amplificados por el cebador 1 y el cebador 2 respectivamente.

(4) Identificación de la expresión de OXM

- 5 Inocular 5 ml de medio de cultivo e incubar toda la noche a 30°C.

Al día siguiente, centrifugar la disolución bacteriana, añadir 1/3 volúmenes de ácido tricloroacético (TCA) al 100% al sobrenadante y mezclar bien, colocar en hielo durante 20-30 minutos, centrifugar 10 min. a 12000 rpm para precipitar la proteína, descartar entonces el sobrenadante; añadir 3 volúmenes (del volumen de muestra original) de acetona. Permitir a las muestras reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min. para permitir que el TCA se disuelva en la acetona, centrifugar entonces 10 min. a 12000 rpm para precipitar la proteína, descartar entonces el sobrenadante; añadir 1 X de amortiguador de carga SDS, para disolver la proteína. Añadir lisozima a los sedimentos bacterianos, incubara durante 30 min. a 37°C. Mezclar bien, y añadir 500 µl de amortiguador de lisis de RIPA para la extracción ultrasónica en hielo, centrifugar entonces 10 min. a 12000 rpm para descartar los sedimentos, añadir 1 X de amortiguador de carga SDS para disolver la proteína.

Tras hervirlas a 95°C durante 5 min., todas las muestras se separan mediante electroforesis en SDS-PAGE al 18%, después se transfieren a una membrana de PVDF a voltaje constante en una condición de baño de hielo, después se bloquean con BSA a temperatura ambiente durante 1 h, se enjuagan con TBST durante 3×5 min., después se incuban con el anticuerpo de conejo anti-OXM (1:500) toda la noche a 4°C. El aclarado con TBST se llevó a cabo 3 veces, 5 min. cada vez, se añadió anticuerpo secundario anticonejo marcado con HRP (1:5000), se incubó 1 h a temperatura ambiente, se enjuagó con TBST durante 3 veces, 5 min. cada vez, y después se desarrolló usando la quimioluminiscencia potenciada (ECL).

Los resultados se muestran en la figura 2. La expresión de OXM no se detecta en *L. lactis* NZ9000 mediante inmunotransferencia, mientras que las expresiones de OXM se detectan en células de la cepa NZ9000-OXM de *L. lactis* y el sobrenadante del medio de cultivo, sugiriendo que la OXM es expresada con éxito en NZ9000-OXM de *L. lactis*, y que es segregada extracelularmente.

Ejemplo 2: experimentos farmacodinámicos de bacterias de ácido láctico transformadas con OXM para la pérdida de peso y la reducción de lípidos

- (1) Preparar varios ratones B6 destetados, y alimentar con dietas ricas en grasas hasta que se construyan con éxito los modelos de ratones obesos. Criterios de obesidad: (peso corporal de ratones en el grupo experimental – peso corporal medio de ratones normales)/peso corporal medio de ratones normales > 20%. Los ratones obesos se dividen en dos grupos, 10 ratones en cada grupo, y los animales son alimentados continuamente con dietas ricas en grasa. Un grupo es el grupo de control, alimentado con *L. lactis* NZ9000; otro grupo es el grupo experimental, alimentado con *L. lactis* NZ9000-OXM. Al mismo tiempo, el grupo de control normal está formado por ratones B6 alimentados con dietas normales, sin alimentación con *L. lactis*.

- (2) Cada ratón recibió 5×10^9 CFU de *L. lactis* mediante administración intragástrica una vez cada 2 días. Se observaron los pesos corporales, las ingestas de alimentos y otros signos vitales de los ratones. Cinco horas tras la primera administración intragástrica, la concentración de OXM en suero se detectó mediante espectrometría de masas. Los resultados se muestran en la figura 3; tras la administración intragástrica de NZ9000-OXM, el contenido de OXM en suero en ratones aumentó significativamente casi 2.5 veces, alrededor de 497 ng/ml. El resultado demuestra además que *L. lactis* NZ9000-OXM segrega y expresa OXM en ratones. Los experimentos comparativos muestran que, cuando se alimenta una cantidad igual de *Bifidobacterium* recombinante con OXM (patente nº 200910041386.X), la concentración de OXM en suero en los ratones es alrededor de 380 ng/ml, que es menor que la de *L. lactis* recombinante con OXM. En la figura 4 se representan los datos de monitorización del peso corporal. Después de que los ratones obesos son alimentados con *L. lactis* NZ9000-OXM durante 4 semanas, sus pesos corporales se reducen significativamente. En la 5ª semana, sus pesos corporales están próximos a los de los ratones normales. Hasta el final del experimento de 9 semanas, su peso corporal permanece en alrededor de 24 g, mientras que el peso corporal de los ratones alimentados con *L. lactis* NZ9000 se redujo significativamente. En comparación con *Bifidobacterium* recombinante con OXM, que ha obtenido el derecho de patente concedido (200910041386.X), la OXM de *L. lactis* puede reducir los pesos corporales de ratones obesos en 31.1%, mientras que *Bifidobacterium* recombinante con OXM puede reducir el peso corporal en 21.4% (figura 6) a igualdad de tiempo. De este modo, *L. lactis* NZ9000-OXM logra una mejor pérdida de peso.

- (3) Después de 6 semanas de alimentación continua de *L. lactis*, se detectaron las ingestas de alimentos de ratones en jaulas metabólicas durante 24 h. Los resultados se muestran en la figura 5. Las ingestas de alimentos de ratones alimentados con *L. lactis* NZ9000-OXM se reducen significativamente, alrededor de 1/2 de aquella en el grupo de NZ9000. NZ3900-OXM disminuye las ingestas de alimento de ratones obesos en 42.1% en comparación con el grupo de control. En comparación con *Bifidobacterium* transgénico con OXM, dado a conocer en la patente china 200910041386.X, *Bifidobacterium* transgénico con OXM puede reducir las ingestas de alimento de ratones en 28.2% en comparación con el grupo de control (figura 6). De

este modo, *L. lactis* NZ9000-OXM puede controlar mejor el peso corporal al suprimir el apetito y reducir las ingestas de alimento.

(4) Seis semanas tras la alimentación de *L. lactis*, se midió la distribución de la grasa abdominal con barrido de CT. La figura 7 es un barrido en sección transversal de la cavidad abdominal, y el área de color gris claro delineada por las líneas blancas representa el tejido adiposo. La figura A representa los ratones en el grupo de control con dietas normales. La figura B representa los ratones en el grupo de alimentación *L. lactis* NZ9000, la figura C representa los ratones en el grupo de alimentación con *L. lactis* NZ9000-OXM. Se puede observar que el contenido de grasa corporal de los ratones en el grupo de NZ9000-OXM disminuye significativamente. El porcentaje de grasas entre el cuerpo total se calcula mediante software de análisis de CT, y después se puede calcular el peso de la grasa para cada ratón. En la figura 8 se muestra el análisis de los datos. Estos resultados muestran que, los ratones alimentados con *L. lactis* NZ9000 todavía tienen una gran cantidad de grasas abdominales, mientras que los ratones alimentados con *L. lactis* OXM tienen mucha menos grasa abdominal, y la redujeron hasta niveles de ratones normales, sugiriendo que *L. lactis* NZ9000-OXM tiene el efecto de reducir la grasa corporal.

(5) Tras la inducción de la obesidad en ratones con dietas ricas en grasas, la glucosa en sangre en ayunas aumenta hasta alrededor de 7 mmol/l (figura 9), que es significativamente mayor que la de los ratones normales. Sin embargo, tras 6 semanas de alimentación con *L. lactis*, la glucosa en sangre en ayunas de los ratones en el grupo de *L. lactis* NZ9000 es alrededor de 6.5 mmol/l. El nivel de glucosa en sangre en ayunas de ratones en el grupo de *L. lactis* OXM vuelve al nivel normal de 5 mmol/l. Los experimentos comparativos muestran que el *Bifidobacterium* transgénico con OXM, dado a conocer en la patente 200910041386.X, no puede regular la glucosa en sangre en ayunas en ratones. Por lo tanto, *L. lactis* recombinante con OXM es superior a las bifidobacterias recombinantes con OXM a la hora de reducir la glucosa en sangre en ayunas.

(6) Después de que se induce la obesidad en ratones con dietas ricas en grasas, su nivel de colesterol en suero es 2.42 moles/l. Al final del experimento, los ratones se sacrifican, y se miden los niveles de colesterol en suero. Como se muestra en la figura 10, el nivel de colesterol en suero de ratones normales es 2.167 moles/l, el nivel de colesterol en suero de ratones alimentados con *L. lactis* NZ9000 es 3.478 moles/l, y el nivel de colesterol en suero de ratones alimentados con *L. lactis* NZ9000-OXM disminuye hasta 1.83 moles/l, significativamente menor que el de los ratones alimentados con *L. lactis* NZ9000. Las *Bifidobacteria* recombinantes con OXM, dadas a conocer en la patente china 200910041386.X, pueden reducir el nivel de colesterol hasta aproximadamente 2.4 moles/l en un tiempo igual. De este modo, *L. lactis* NZ9000-OXM proporcionado en la invención puede reducir significativamente el nivel de colesterol en suero.

Ejemplo 3: experimentos farmacodinámicos de bacterias de ácido láctico transformadas con OXM para perder peso y reducir lípidos en ratones diabéticos deficientes en el gen

1. Preparar veinte ratones db/db de 8 semanas, dividir en dos grupos, 10 ratones en cada grupo. Un grupo es el grupo de control, alimentado con *L. lactis* NZ9000; otro grupo es el grupo del experimento, alimentado con *L. lactis* NZ9000-OXM. Al mismo tiempo, el grupo de control normal está formado por ratones B6 alimentados con dietas normales sin alimentación con *L. lactis*.
2. Cada ratón recibió 5×10^9 CFU de *L. lactis* mediante administración intragástrica cada día. En la figura 11 se muestran los datos de monitorización de los pesos corporales. Los pesos corporales de los ratones alimentados con OXM pueden mantenerse sin cambio en comparación con su propio peso antes de la administración. Los pesos corporales de ratones en el grupo de NZ9000 aumentan gradualmente; en la 5ª semana, aumentaron en alrededor de 8%. El experimento muestra que *L. lactis* NZ9000-OXM puede controlar eficazmente la ganancia de peso de ratones diabéticos.
3. Al mismo tiempo, se extrae sangre para detectar los niveles de colesterol en suero (figura 12). Los niveles de colesterol en suero en ratones alimentados con OXM disminuyen significativamente hasta 5.58 moles/l, significativamente menor que el del grupo de control. Este resultado sugiere que *L. lactis* NZ9000-OXM puede reducir significativamente los lípidos en sangre en ratones diabéticos.

La presente invención ha mostrado que las bacterias de ácido láctico transformadas con OXM pueden expresar y segregar OXM en los tubos digestivos de los ratones, y la OXM expresada puede suprimir el apetito e inhibe la absorción de energía al actuar sobre los receptores correspondientes en el cuerpo, sugiriendo que *L. lactis* recombinante con OXM tiene efectos biológicos significativos de pérdida de peso, reducción de lípidos, y reducción de glucosa.

Listado de secuencias

<110> Nanjing SinoGen Biomedicine Technology Co., Ltd.

<120> Transformante microbiano para la pérdida de peso y la reducción de lípidos, procedimiento para construir el transformante y aplicación del mismo

<130> SG20150324001

5

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 201

<212> ADN

<213> Gen de OXM optimizado por codones

15

<400> 1

atgaaaaaaa agattatctc agctatttta atgtctacag tgatactttc tgctgcagcc 60

ccgtgtgcag gtgtttatgc ttcaaacat tctcaaggaa catttacatc agattattca 120

aaatatttag attctcgtag agctcaagat ttgttcaat ggcttatgaa taaaaacgt 180

aatagaaata atattgcata a 201

20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> 1F

<400> 2

30

ggttttattg ttccattagt 20

<210> 3

<211> 20

35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 1R

40

<400> 3

gagataatct ttttttcat 20

45

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> 2F

<400> 4

55

ggaataacat tgcctaataga 20

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 2R
 <400> 5
 10 ttattatta gggaaagcaa 20
 <210> 6
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> 3F
 20 <400> 6
 atgacttacg cagatcaagt 20
 25 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> 3R
 <400> 7
 35 ttaaattgct aaatcaaatt 20

Listado de secuencias

40 <110> Nanjing SinoGen Biomedicine Technology Co., Ltd.
 <120> Transformante microbiano para la pérdida de peso y la reducción de lípidos, procedimiento para construir el transformante y aplicación del mismo
 45 <130> SG20150324001
 <160> 7
 <170> PatentIn versión 3.5
 50 <210> 1
 <211> 201
 <212> ADN
 <213> Gen de OXM optimizado por codones
 55 <400> 1
 atgaaaaaaa agattatctc agctatttta atgtctacag tgatactttc tgctgcagcc 60
 ccgtgtgcag gtgtttatgc ttcacaacat tctcaaggaa catttacatc agattattca 120

ES 2 750 685 T3

	aaatatttag attctcgtag agctcaagat tttgttcaat ggcttatgaa tacaaaacgt	180
	aatagaaata atattgcata a	201
5	<210> 2 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> 1F <400> 2	
	ggttttattg ttcattagt	20
15	<210> 3 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> 1R <400> 3	
25	gagataatct ttttttcat	20
30	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> 2F <400> 4	
35	ggaataacat tgcctaatga	20
40	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> 2R <400> 5	
45	tttattatta gggaaagcaa	20
50	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> 3F <400> 6	
55	atgacttacg cagatcaagt	20
60		

ES 2 750 685 T3

<210> 7
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> 3R
10 <400> 7

ttaaattgct aaatcaaatt 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Transformante para la pérdida de peso y la reducción de lípidos en sangre, en el que el transformante se obtiene sustituyendo el gen *thyA* de *L. lactis* por el gen de oxintomodulina humana optimizado por codones mediante recombinación homóloga.
- 10 2. Transformante para la pérdida de peso y la reducción de lípidos en sangre según la reivindicación 1, en el que la secuencia nucleotídica del gen de oxintomodulina humana optimizado por codones se representa en SEC ID nº: 1.
3. Transformante para la pérdida de peso y la reducción de lípidos en sangre según la reivindicación 1, en el que la *L. lactis* es *L. lactis* NZ9000, *L. lactis* NZ3900 o *L. lactis* MG1363.
- 15 4. Procedimiento de construcción del transformante para la pérdida de peso y la reducción de lípidos en sangre según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas siguientes:
 - 20 (1) cortar y empalmar sucesivamente la secuencia en sentido 5' del gen *thyA* de *L. lactis*, gen de oxintomodulina humana optimizado por codones y la secuencia en sentido 3' del gen *thyA* de *L. lactis*, para construir un fragmento de gen recombinante;
 - (2) electrotransformar el fragmento de gen recombinante obtenido en la etapa (1) en *L. lactis* para la recombinación homóloga, para cribar las cepas *thyA*⁻ OXM⁺.
- 25 5. Transformante obtenido sustituyendo el gen *thyA* de *L. lactis* por el gen de oxintomodulina humana optimizado por codones mediante recombinación homóloga para una utilización en terapia.
6. Transformante obtenido sustituyendo el gen *thyA* de *L. lactis* por el gen de oxintomodulina humana optimizado por codones mediante recombinación homóloga para una utilización en el tratamiento de la obesidad y la diabetes mediante una reducción de glucosa en sangre.
- 30 7. Transformante obtenido sustituyendo el gen *thyA* de *L. lactis* por el gen de oxintomodulina humana optimizado por codones mediante recombinación homóloga para una utilización en el tratamiento del hígado graso mediante una reducción de lípidos en sangre.
- 35 8. Transformante según la reivindicación 5 o para una utilización según la reivindicación 6 o 7, en el que la secuencia nucleotídica del gen de oxintomodulina humana optimizado por codones se representa en SEC ID nº: 1.
- 40 9. Transformante según la reivindicación 5 o para una utilización según la reivindicación 6 o 7, en el que la *L. lactis* es *L. lactis* NZ9000, *L. lactis* NZ3900 o *L. lactis* MG1363.

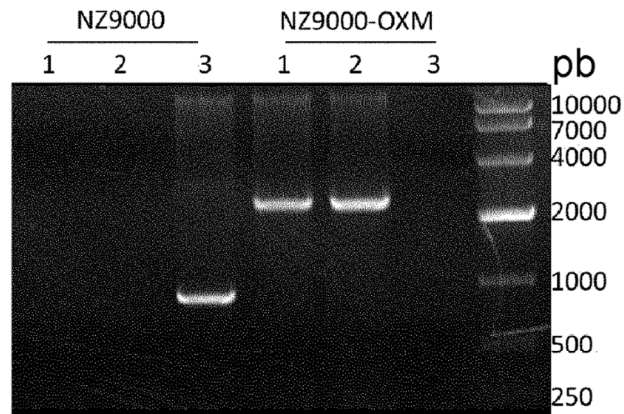


FIG. 1

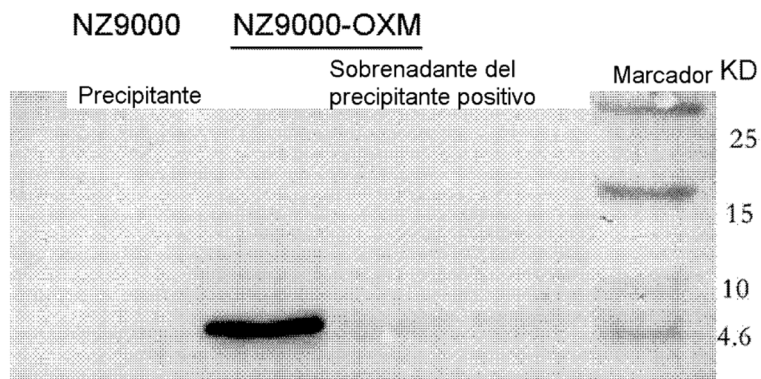


FIG.2

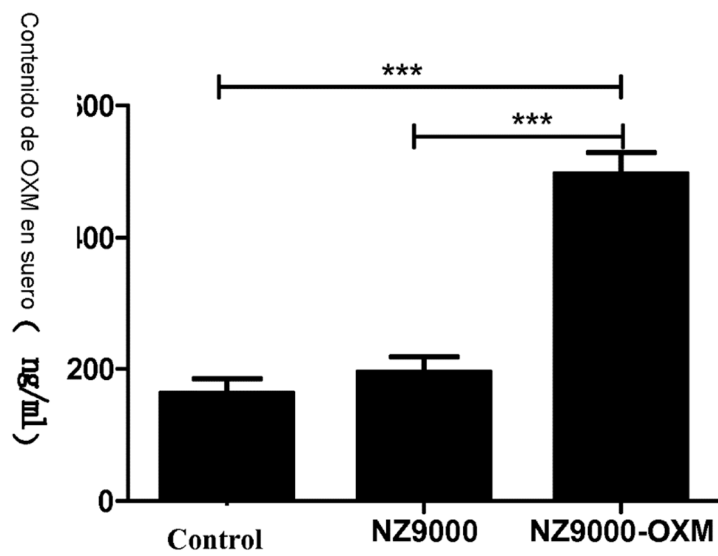


FIG.3

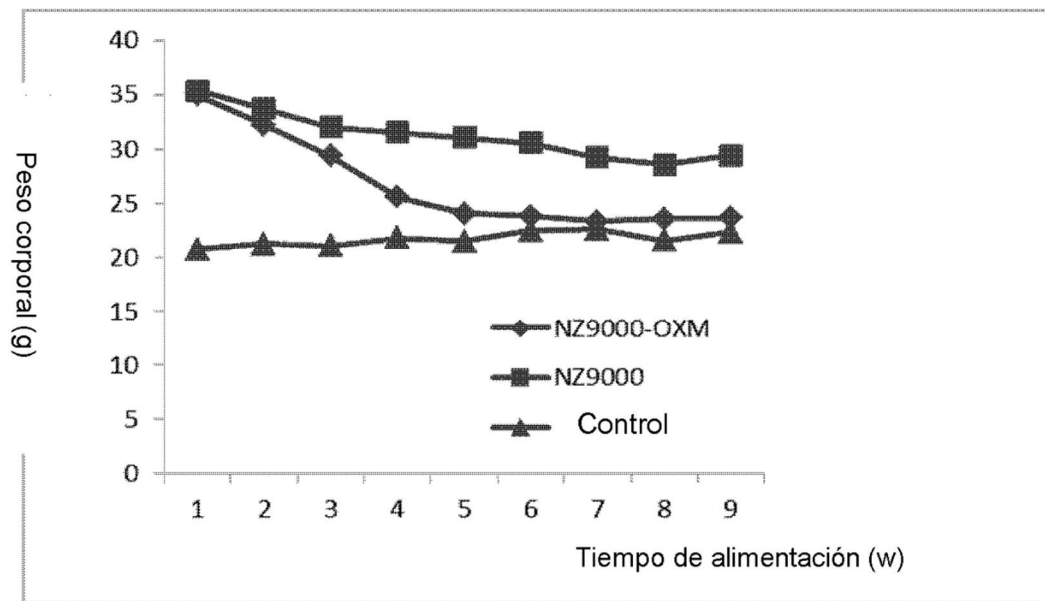


FIG.4

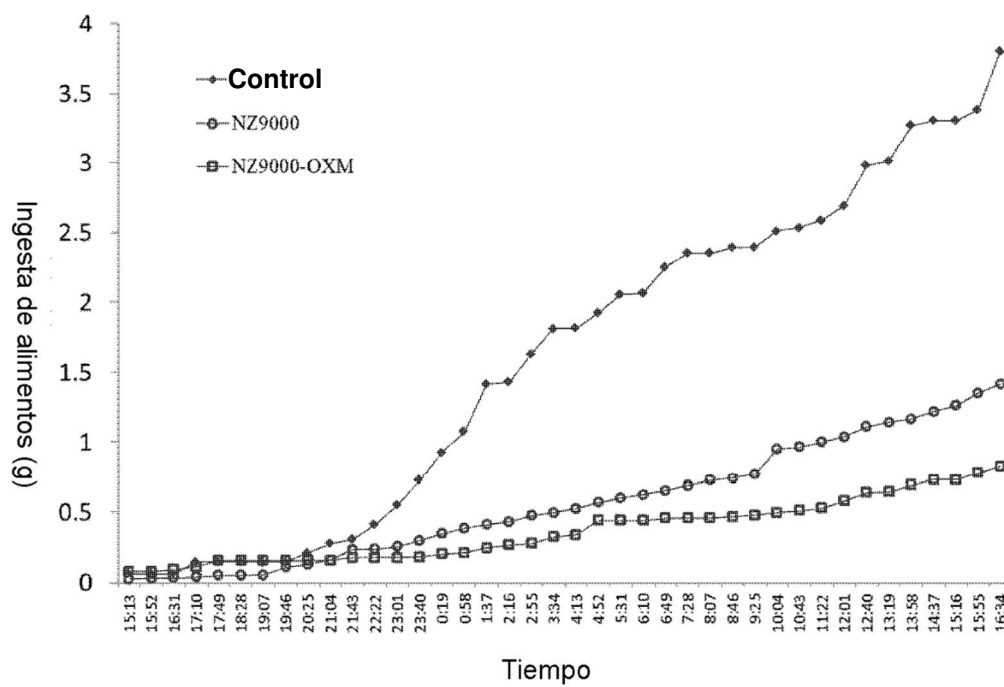


FIG.5

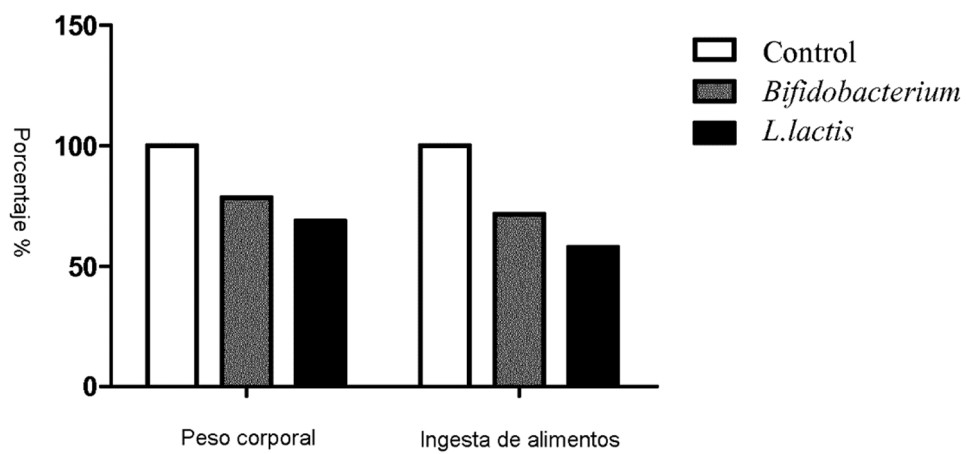


FIG.6

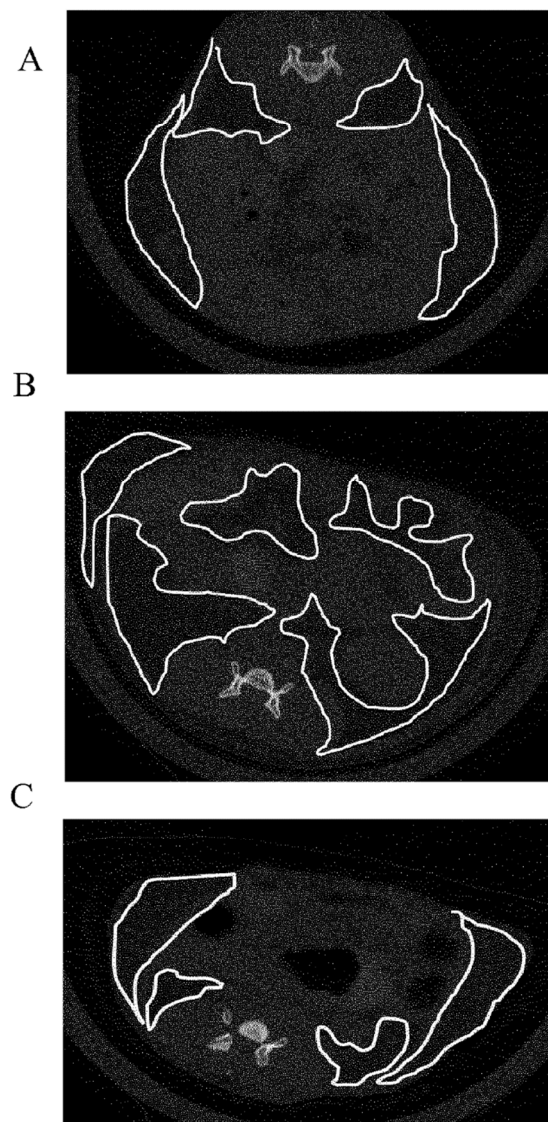


FIG.7

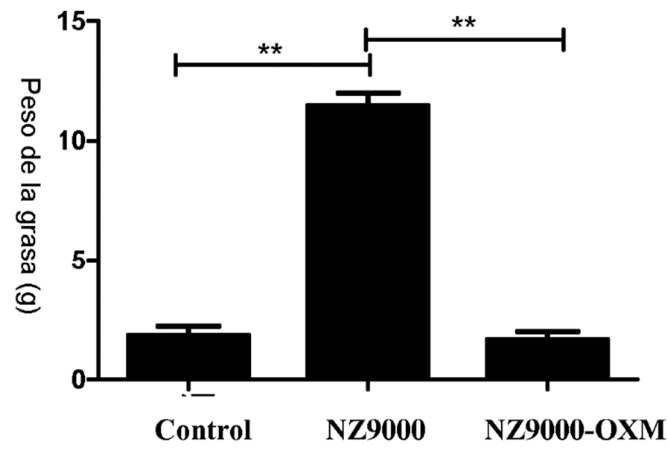


FIG.8

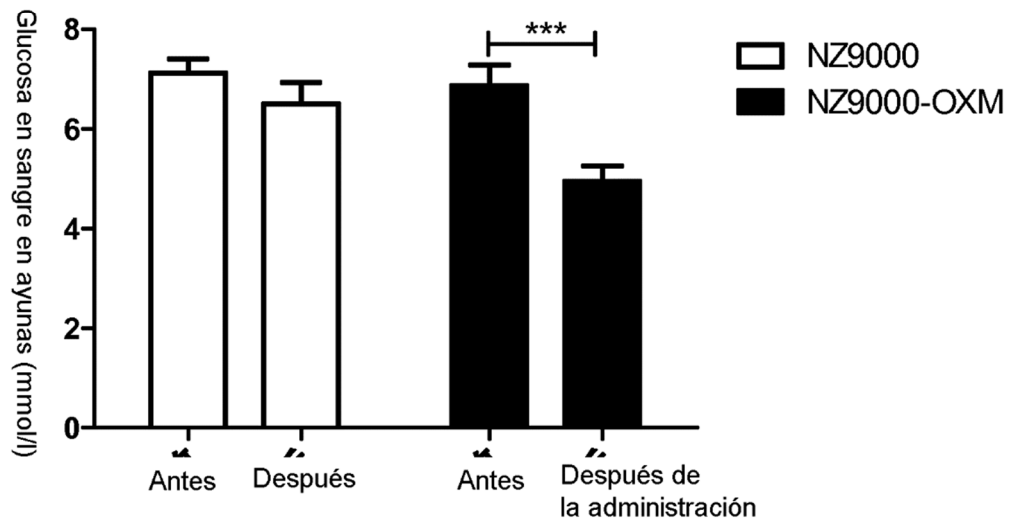


FIG.9

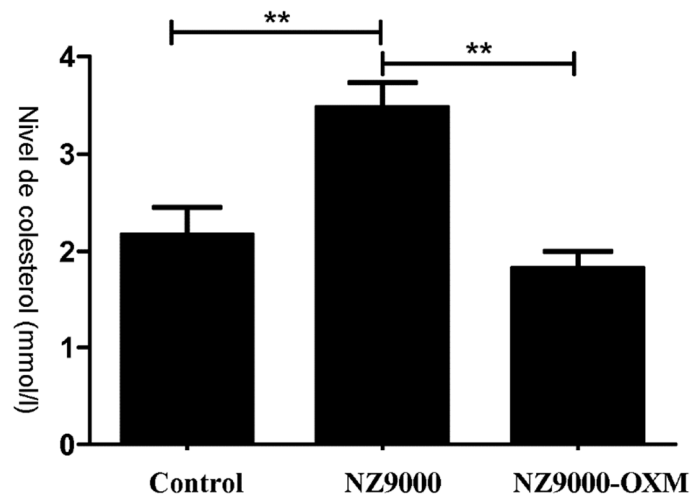


FIG. 10

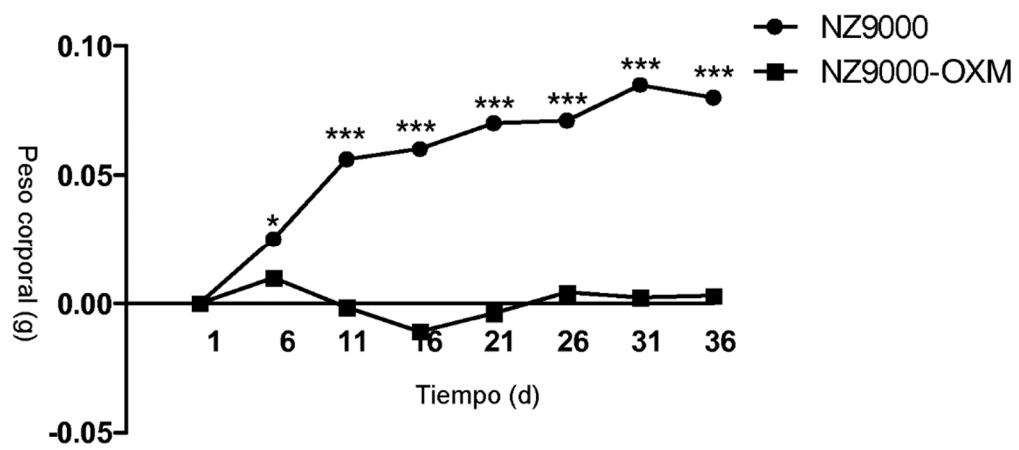


FIG. 11

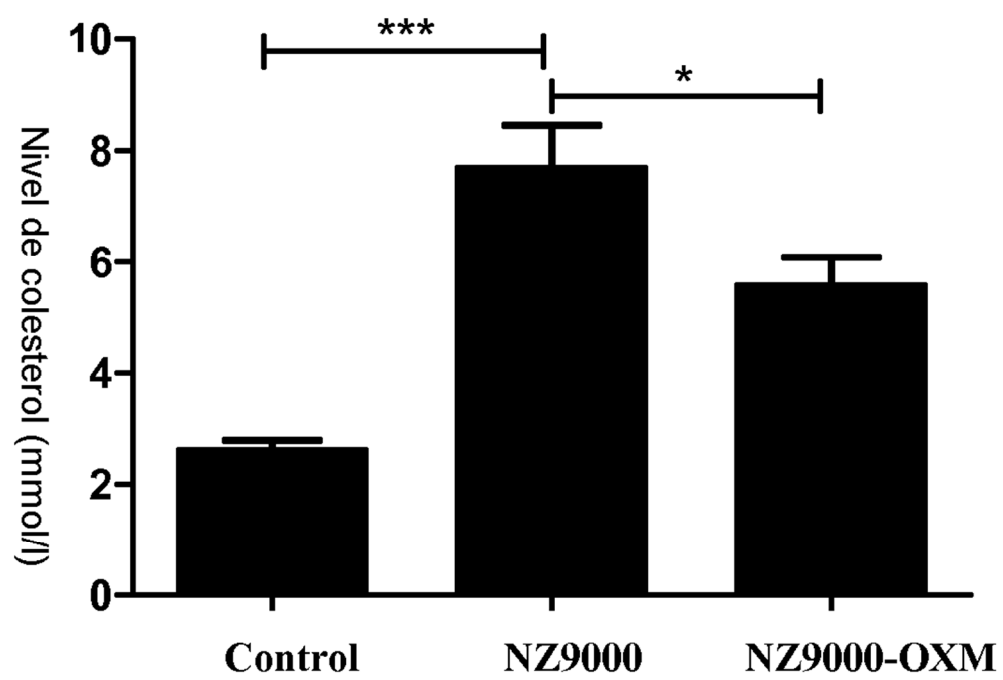


FIG. 12