



(11) PI 0909760-0 B1

(22) Data do Depósito: 18/03/2009

(45) Data de Concessão: 22/08/2023

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(54) Título: COMPOSIÇÃO DE CEPA DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS

(51) Int.Cl.: C12R 1/225; A23C 9/123; A23L 33/135.

(52) CPC: C12R 1/225; A23C 9/1234; A23L 33/135; A23Y 2220/73.

(30) Prioridade Unionista: 19/03/2008 FR 0801507.

(73) Titular(es): COMPAGNIE GERVAIS DANONE.

(72) Inventor(es): ARTEM KHLEBNIKOV; ANNE-CATHERINE VILLAIN; THIERRY SAINT DENIS;
ISABELLE CHAMBAUD; GIANFRANCO GROMPONE.

(86) Pedido PCT: PCT FR2009000284 de 18/03/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/122042 de 08/10/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/09/2010

(57) Resumo: "CEPA DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS" A invenção se refere a uma nova cepa de Lactobacillus rhamnosus que possui propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras, assim como às composições que contêm a dita cepa.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO DE CEPA DE *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS***".

[001] A presente invenção refere-se a uma nova cepa de *Lactobacillus rhamnosus* dotada de propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras.

[002] Estudos científicos muito numerosos relataram os efeitos benéficos sobre a saúde de certos micro-organismos presentes em alimentos fermentados, notadamente produtos do leite. Esses micro-organismos são comumente denominados "probióticos". De acordo com a definição geralmente admitida atualmente, os probióticos são: "micro-organismos vivos, que quando eles são consumidos em quantidades adequadas, têm um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro" (Relatório FAO/OMS sobre a avaliação das propriedades sanitárias e nutricionais dos probióticos nos alimentos, inclusive o leite em pó que contém bactérias lácticas vivas; Córdoba, Argentina; 1-4 de outubro de 2001).

[003] Foi mostrado que o consumo de produtos alimentares que contêm bactérias probióticas pode produzir efeitos favoráveis sobre a saúde, por intermédio notadamente do re-equilíbrio da flora intestinal, da melhora da resistência às infecções, e da modulação da resposta imunitária.

[004] Os micro-organismos probióticos utilizados em alimentação humana são geralmente bactérias lácticas, que pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

[005] Os efeitos benéficos sobre a saúde não são, no entanto geralmente comuns ao conjunto das bactérias de um mesmo gênero, nem mesmo de uma mesma espécie. Eles só se encontram, na maior parte das vezes, em certas cepas; por outro lado, os efeitos observados podem variar qualitativamente e/ou quantitativamente de uma cepa probiótica para a outra, inclusive dentro de uma mesma espécie.

[006] Para que um micro-organismo possa ser considerado como sendo potencialmente utilizável como probiótico, ele deve satisfazer a pelo menos um, e idealmente vários, dos critérios seguintes:

- apresentar uma atividade inibidora em relação a micro-organismos patogênicos que podem estar presentes na flora intestinal, essa atividade podendo resultar ou da capacidade para aderir às células intestinais, excluindo ou reduzindo assim a aderência dos patogênicos, ou da capacidade para produzir substâncias que inibem os patogênicos, ou da combinação dessas duas características;

- [007] - apresentar propriedades imunomoduladoras, e notadamente imunoestimulantes e/ou anti-inflamatórias.

[008] Por outro lado, se esse micro-organismo é destinado a ser incorporado em um produto lácteo, ele deve de preferência apresentar um crescimento satisfatório em leite.

[009] Finalmente, ele deve conservar uma boa viabilidade, no decorrer da produção e da conservação do alimento no qual ele é incorporado, assim como depois da ingestão desse alimento pelo consumidor, de maneira a poder atingir o intestino e a sobreviver no meio intestinal.

[0010] Deve, no entanto ser notado que ainda que a viabilidade seja essencial para responder à definição atual de “probiótico”, foi mostrado que alguns dos efeitos benéficos associados a cepas probióticas poderiam ser obtidos mesmo na ausência de bactérias vivas, e eram atribuíveis a certas frações bacterianas ou a frações ativas de seus sobrenadantes de cultura. Por exemplo, o Pedido PCT WO2004093898 descreve uma preparação imunomoduladora obtida por fracionamento do sobrenadante de cultura da cepa CNCM I-2219.

[0011] Os Inventores conseguiram agora isolar uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que responde aos critérios indicados acima.

[0012] A presente invenção tem como objeto essa cepa que foi

depositada de acordo com o Tratado de Budapeste, junto à CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes - Coleção Nacional de Culturas de Micro-organismos - , 25 rue du Docteur Roux, Paris), em 9 de novembro de 2006, sob o número I-3690.

[0013] Ela possui as características seguintes:

- Morfologia: pequenos bacilos maciços às vezes esféricos, isolados ou pequenas cadeias.

- Fermentação dos açúcares seguintes (resultados obtidos em uma galeria api 50 CH - Meio MRS API a 37°C durante 48 h): Ribose, galactose, D-glicose, D-frutose, D-manose, L- sorbose, ramnose, manitol, sorbitol, Metil-D glicosida, N-acetilglicosamina, arbutina, esculina, salicina, maltose, lactose, trealose, melezitose, beta gentiobiose, D-turanose, D-tagatose, gluconato.

[0014] Ela possui por outro lado propriedades antimicrobianas, que se traduzem por uma grande capacidade para inibir o crescimento em cultura de micro-organismos patogênicos.

[0015] Ela apresenta por outro lado propriedades de adesão ao manose. É conhecido que glicoconjugados ricos em manose presentes na superfície das células epiteliais intestinais desempenham um papel na fixação de bactérias patogênicas, tais como as *Escherichia coli* enterotóxicas, as salmonelas, *Vibrio cholerae* ou *Pseudomonas aeruginosa*, e foi relatado que as propriedades de adesão ao manose de certas bactérias probióticas permitia que elas entrassem em competição com esses patogênicos, e inibir a adesão dos mesmos à mucosa intestinal, conferindo assim aos mesmos propriedades anti-infecciosas (MICHAEL e ABERNATHY, *Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 35, 350-355, 2002; MANGELL e al., *DIG Dis Sci.*, 47, 511-506, 2002). Essas propriedades tinham, no entanto sido observadas principalmente em bactérias da espécie *Lactobacillus plantarum* (notadamente a cepa *L. plantarum* 229v, descrita no Pedido EP0817640 e a cepa *L. plantarum*

WCFS1), mas não em bactérias da espécie *Lactobacillus rhamnosus*.

[0016] A cepa CNCM I-3690 possui também propriedades imunomoduladoras, e notadamente anti-inflamatórias.

[0017] A presente invenção engloba também como objeto cepas de *Lactobacillus rhamnosus* suscetíveis de serem obtidas por mutagenese ou por transformação genética da cepa CNCM I-3690. De preferência, essas cepas conservam pelo menos as propriedades antimicrobianas, ou as propriedades imunomoduladoras da cepa CNCM I-3690. Pode se tratar de cepas nas quais um ou vários genes endógenos da cepa CNCM I-3690 sofreu (sofreram) mutação(ções), por exemplo de maneira a modificar algumas de suas propriedades metabólicas (e.g. a capacidade dessa cepa de metabolizar açúcares, sua resistência ao trânsito intestinal, sua resistência à acidez, sua pós acidificação ou sua produção de metabólitos). Pode se tratar também de cepas que resultam da transformação genética da cepa CNCM I-3690 por um ou vários gene(s) de interesse, que permite(m) por exemplo confere à dita cepa características fisiológicas suplementares, ou expressar proteínas de interesse terapêutico ou vacinal, que se deseja administrar por intermédio da dita cepa.

[0018] Essas cepas podem ser obtidas a partir da cepa CNCM I-3690 pelas técnicas clássicas de mutagenese aleatória ou dirigida e de transformação genética de lactobacilos, tais como aquelas descritas por exemplo por GURY e al., (Arch. Microbiol., 182, 337-45, 2004) ou por VELEZ et. al. (Appl Environ Microbiol., 73, 3595-3604, 2007), ou pela técnica denominada "genome shuffling" (PATNAIK et. al. Nat Biotechnol, 20, 707-12, 2002; WANG Y e al., J Biotechnol., 129, 510-15, 2007).

[0019] A presente invenção tem também como objeto frações celulares que podem ser obtidas a partir de uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acordo com a invenção. Trata-se notadamente de pre-

parações de DNA ou de preparações de paredes bacterianas obtidas a partir de culturas da dita cepa. Pode se tratar também de sobrenadantes de cultura ou de frações desses sobrenadantes.

[0020] A presente invenção tem também como objeto composições que compreende uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acordo com a invenção, ou uma fração celular obtida a partir dessa última.

[0021] Essas composições podem ser notadamente fermentos lácticos, que associam uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acordo com a invenção com uma ou várias outra(s) cepa(s) de bactérias lácticas, probiótica(s) ou não.

[0022] Pode se tratar também de produtos alimentares, e notadamente de produtos do leite, ou de produtos farmacêuticos ou cosméticos que compreendem uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acordo com a invenção, ou uma fração celular obtida a partir dessa última.

[0023] Quando a dita cepa está presente sob a forma de bactérias vivas, essas últimas estarão de preferência presentes à razão de pelo menos 10⁵ ufc por grama, vantajosamente pelo menos 10⁶ ufc por grama de produto, mais vantajosamente pelo menos 10⁷ ufc por grama e ainda mais vantajosamente pelo menos 10⁸ ufc por grama.

[0024] A presente invenção será melhor compreendida com o auxílio do complemento de descrição que vai se seguir que se refere a exemplos que ilustram as propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras e anti-infecciosas da cepa CNCM I-3690.

EXEMPLO 1: COMPARAÇÃO DAS PROPRIEDADES DA CEPA CNCM I-3690 COM AQUELAS DE CEPAS PROBIÓTICAS CONHECIDAS

[0025] As propriedades da cepa CNCM I-3690 foram comparadas com aquelas de diferentes cepas da arte anterior, conhecidas por suas propriedades probióticas.

[0026] A lista dessas cepas é dada na Tabela I abaixo.

Tabela I

Gênero	Espécie	Denominação(ões)	Número de publicação de Pedidos de Patente
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=CNC M I-1225	EP0577903
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	WO2004032639
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC 55544	
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	US4839281
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	WO9910476
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v - DSM 9843	WO9391823
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112: ATCC 55730	WO2004034808
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = CNCM I-2219	EP1189517

Gênero	Espécie	Denominação(ões)	Número de publicação de Pedidos de Patente
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	WO9910476

Material e Métodos

1 - Atividade Antimicrobiana

[0027] A pesquisa de atividades antimicrobianas foi efetuada contra três bactérias patogênicas alvo: *Escherichia coli* E1392-75-2A, *Salmonella enteritidis* NIZO B1241 e *Listeria monocytogenes* 4B. As bactérias lácticas foram colocadas em cultura em placas de Petri em diferentes meios: LM17 (meio M17 (TERZAGHI & SANDINE, Appl. Microbiol. 29, 807-813, 1975) adicionado de 1% de lactose, meio Elliker (ELLIKER e al., J. Dairy Sci., 39, 1611-1612, 1956), e meio TGV (Tryptone-Glucose-Meat Extract).

[0028] As placas são incubadas a 37°C até o aparecimento de colônias bacterianas. As culturas de *Bifidobacterium* foram efetuadas sob anaerobiose. Uma camada de Agar que contém meio BHI (brain-heart infusion) e o patogênico é então vertida na superfície das placas. As

placas são incubadas de novo a 37°C durante 24 h. Os diâmetros das zonas de inibição do patogênico são em seguida medidas em torno de cada colônia de bactérias lácticas. A pontuação 1 corresponde a um diâmetro entre 1 e 3 mm. A pontuação 2 corresponde a um diâmetro entre 4 e 6mm. A pontuação 3 corresponde a um diâmetro superior a 6 mm. Cada experiência foi feita três vezes independentemente para cada cepa.

[0029] As pontuações obtidas nos patogênicos alvos em cada experiência foram adicionadas, para obter, para cada bactéria láctica, uma pontuação global de atividade antimicrobiana.

[0030] Os resultados são dados na Tabela II abaixo.

[0031] Esses resultados mostram que entre as cepas testadas, a cepa CNCM I-3690 é com a cepa ATCC55544 aquela que possui a atividade antimicrobiana maior.

Tabela II

Gênero	Espécie	Referência	(1) coli/ Elliker	(2) coli/ LM17	(3) Listeria/ Elliker	(4) Listeria/ TGV	(5) coli/ LM17	(6) Salmonella /Elliker	(7) Salmonella /TGV	Pontuação antipa- togênicos (1+2+3+4+5+6+7)
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 ou CNCM I- S3690	2	1	3	2	0	3	3	14
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=AT CC55544	2	0	3	3	1	3	2	14
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG=ATCC 53103	2	0	1	2	0	3	2	10
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 1491=DSMZ 20174- WCFS1	2	0	3	1	0	1	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	2	0	3	1	0	1	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001=NM9 7/09514	1	0	1	2	0	3	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La 1=I-1225	1	0	1	1	1	2	1	7
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 229v=DSM 9843	1	0	1	1	0	1	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	1	0	1	2	0	0	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	1	0	1	1	0	0	1	4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	BB12=ATCC 27536	1	0	0	0	0	0	2	3

Tabela II (continuação)

Gênero	Espécie	Referência	(1) coli/ Elliker	(2) coli/ LM17	(3) Listeria/ Elliker	(4) Listeria/ TGV	(5) coli/ LM17	(6) Salmonella /Elliker	(7) Salmonella /TGV	Pontuação antipa- togênicos (1+2+3+4+5+6+7)
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC557 30	0	0	1	0	0	1	0	2
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/019 25	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNM I- 2618	0	0	0	0	0	0	0	0

2 - Imunomodulação

[0032] As propriedades imunomoduladoras das diferentes bactérias lácticas foram avaliadas por detecção da modulação induzida por essas bactérias na resposta inflamatória de células epiteliais de cólon (HT-29), medindo-se o efeito dessas bactérias sobre a ativação do regulador transcricional NF- κ B e a secreção da citocina pró-inflamatória IL-8 pelas células HT-29 na presença de uma mistura de TNF α , IL-1 β e IFN γ (Cytomix) estimulando as condições de uma agressão inflamatória.

Cultura das Bactérias Lácticas

[0033] O crescimento das bactérias lácticas é efetuado em meio MRS (DE MAN et. al., J. Appl. Bacteriol. 23, 130-135, 1960), ou MRS complementado com L-cisteína (1% final), em meio Elliker, de acordo com a espécie bacteriana testada. As bactérias foram inoculadas e cultivadas em uma primeira pré-cultura de 10 mL durante 16 h a 37°C, e recultivadas no dia seguinte em uma segunda cultura em 100 mL durante 16 h a 37°C, e colhidas no final da fase estacionária.

Cultura e Preparação das Células

[0034] As células HT29 são mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) complementado com 4,5 g/L de D-Glicose, L-Glutamina (1 mM final), aminoácidos (AA) não essenciais (1% final), Penicilina/Estreptomicina (1% final), Soro de vitela fetal (SVF) (10% final).

[0035] As células HT-29 são semeadas em placas de 12 cavidades à razão de $2 \cdot 10^5$ células por cavidade em 2 mL de meio, dois dias antes das experiências de interação com as bactérias e de estimulação pelo Cytomix.

[0036] Para a medição da ativação do regulador transcricional NF- κ B as células são transfectadas no dia seguinte da semeadura, com o plasmídeo relator Ig-kB-Luciferase, como descrito por TIEN et. al. (J.

Immunol., 176, 1228-37, 2006). Previamente à transfecção, as células são lavadas e o meio é substituído pelo menos meio sem antibióticos. A transfecção é efetuada colocando-se em cada cavidade 100 µL de uma mistura que contém 75 ng de plasmídeo plg-kB-luciferase e 1 µL de Lipofectamine 2000 em 99 µL de meio OptiPro. As placas são em seguida incubadas durante 24 h a 37°C e 5% de CO₂.

Interação com as Bactérias e Estimulação pelo Cytomix

[0037] As bactérias são recuperadas no final da fase estacionária, e lavadas duas vezes com PBS antes de serem colocadas em interação com as células.

[0038] Elas são em seguida incubadas durante 2 horas com as bactérias, com uma multiplicidade de infecção de 100 bactérias por célula. Depois de duas horas de interação com as bactérias, as células são incubadas durante 6 horas na presença das bactérias e do Cytomix, à razão de 50 ng/mL de TNF α , 2,5 ng/mL de IL-1 β e 7,5 ng/mL de IFN γ no meio de incubação. Todas as incubações são efetuadas a 37°C, e 5% de CO₂.

[0039] A fim de determinar o nível basal de ativação de NF- κ B e de secreção de IL-8 na ausência de bactérias lácticas, a mesma experiência foi realizada efetuando-se a estimulação pelo Cytomix durante 6 horas, depois de duas horas de incubação das células na ausência de bactérias.

[0040] No final das 8 horas de incubação, é recuperado 1 mL de meio para dosar a IL8 secretada. Essa dosagem é efetuada por ELISA utilizando-se o kit “Chimioluminescent ELISAs QuantiGlo Human IL-8” (R&D Systems).

[0041] Para medir a ativação de NF- κ B, as células são submetidas a uma lise em 100 microlitros de um tampão (Tris pH 7,9 25 mM, MgCl₂, Triton 1%, Glicerol 15%, adicionado de 1 mM DTT. Para medir a atividade luciferase, 10 microlitros de lisado celular são acrescenta-

dos a um tampão de leitura (Tris pH 7,9 25 mM, MgCl₂ 8 mM, Triton 1%, Glicerol 15%), adicionado de 1 mM DTT, 100 mM ATP e 2 mM de Luciferina/K₂HPO₄ - pH 7,58. A medição é efetuada com o auxílio de um luminímetro (BECKMAN COULTER).

[0042] Depois desse tempo total de interação de 8 horas, mede-se a ativação de NF- κ B, e a secreção de IL-8.

[0043] Os valores de ativação de NF- κ B e de secreção de IL-8 são expressos em porcentagens em relação ao nível basal observado na ausência de bactérias lácticas. Para cada cepa testada, uma pontuação média de imunomodulação é calculada adicionando-se a porcentagem de ativação de NF- κ B e a porcentagem de secreção de IL-8. Esses resultados estão reunidos na tabela III seguinte

Tabela III

Gênero	Espécie	Referência	NF- κ B-HT29 IL8-HT29		Pontuação média HT29 IL8/ NF- κ B (8+9)/2
			(8)	(9)	
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 ou CNCM I-3690	34,7	49,7	42
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=A TCC55544	58,7	101,5	80
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	78,0	81,0	80

Gênero	Espécie	Referência	NF-κB-HT29 IL8-HT29		Pontuação média HT29 IL8/ NF-κB (8+9)/2
			(8)	(9)	
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	80,7	91,9	86
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	94,0	99,7	97
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001=NM 97/09514	25,0	49,7	37
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=L a1=I-1225	86,9	92,7	90
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	93,9	107,7	101
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	93,8	89,5	92
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	85,8	95,0	90
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	99,4	98,0	99

Gênero	Espécie	Referência	NF-κB-HT29 IL8-HT29		Pontuação média HT29 IL8/ NF-κB (8+9)/2
			(8)	(9)	
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCCC55730	82,0	87,9	85
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	111,6	92,0	102
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	107,7	101,2	104
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	71,4	83,6	78
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	77,5	96,3	87
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	97,5	103,6	101
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	117,7	104,6	111
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	87,8	91,4	90

[0044] Esses resultados mostram que a cepa CNCM I-3690 inibe bastante a resposta inflamatória das células epiteliais HT-29. Entre as outras cepas testadas, somente a cepa HN001 possui propriedades

anti-inflamatórias comparáveis.

3 - Sobrevivência aos Estresses Gástrico e Intestinal

[0045] Um modelo in vitro que reflete as condições de estresse gástrico e intestinal foi utilizado.

[0046] Culturas de bactérias lácticas são realizadas em leite suplementado com extrato de levedura. As culturas são incubadas durante 24 a 48 h, de acordo com as espécies (até a fase estacionária de cultura).

[0047] Estresse intestinal: um suco intestinal artificial composto por sais biliares de porco (a 3,3 g/l) e por tampão carbonato NaHCO_3 (a 16,5 g/l) é realizado. O pH é ajustado a 6,3. 1 ml desse suco intestinal é acrescentado a 100 μl de cultura bacteriana. As culturas são em seguida incubadas 5 horas. Em seguida, as populações bacterianas antes e após o estresse são avaliadas em placas.

[0048] Estresse gástrico: um suco gástrico artificial é realizado. Ele é composto de ácido láctico (9 g/l), de pepsina (3,5 g/l) e de NaCl (2,2 g/l). O pH é ajustado a 3,1. 1 ml desse suco artificial é acrescentado a 100 μl de cultura bacteriana. As culturas são incubadas durante diferentes tempos: 10 min., 30 min. e 60 min. As populações bacterianas são avaliadas em placas.

[0049] Os valores são expressos da maneira seguinte:

[0050] Estresse gástrico = média $[\log (\text{ufc}_{10\text{min}}/\text{ufc}_0)$ e $\log (\text{ufc}_0/\text{ufc}_0)] * 10$ + média $[\log (\text{ufc}_{30\text{min}}/\text{ufc}_0)$ e $\log (\text{ufc}_{10\text{min}}/\text{ufc}_0)] * 20$ + média $[\log (\text{ufc}_{60\text{min}}/\text{ufc}_0)$ e $\log (\text{ufc}_{30\text{min}}/\text{ufc}_0)] * 30$.

[0051] Estresse intestinal = $\log (\text{ufc}_{5\text{h}}/\text{ufc}_{0\text{h}})$.

[0052] $\text{ufc}_{X\text{min}}$ sendo a concentração em bactérias expressa em Unidades que Formam Colônias (UFC) depois de X minutos de incubação.

[0053] Para o estresse gástrico, a sobrevivência é boa quando o valor é superior a -50, medianamente boa quando o valor está com-

preendido entre -50 e -100 e ruim quando o valor é inferior a -100.

[0054] Para o estresse intestinal, a sobrevivência é boa quando o valor é superior a -0,5, medianamente boa quando o valor está compreendido entre -0,5 e -1,5 e ruim quando o valor é inferior a -1,5.

[0055] Os resultados são dados na tabela IV.

Tabela IV

Gênero	Espécie	Referência	Estresse intestinal	Estresse gástrico
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 ou CNCM I-3690	0,31	-31,9
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	0,04	-47,4
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	-0,07	-44,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	-0,79	-68,5
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	-1,50	-139,2
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001=NM97/09514	0,00	-86,3
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	0,69	20,3
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	-1,04	-29,7
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	-0,23	43,3
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	-1,45	-63,0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	0,07	-70,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCCC55730	1,00	-4,6
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	-1,12	-438,7
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	3,40	114,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	-1,91	-80,0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	2,79	-412,9
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	-0,91	-333,8
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	-0,14	-370,2
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	-0,22	-319,2

[0056] Os resultados ilustrados nas Tabelas II, III e IV acima mostram que, entre as diferentes cepas testadas, a cepa CNCM I-3690 é a única a apresentar ao mesmo tempo propriedades antimicrobianas e propriedades anti-inflamatórias grandes, acompanhadas por outro lado

de propriedades de resistência aos estresses gástrico e intestinal muito boas.

[0057] Para ilustrar a superioridade dessa cepa, as diferentes pontuações obtidas por essa cepa no plano antimicrobiano foram adicionadas entre si e uma média foi feita entre os resultados obtidos por essa cepa no plano da imunomodulação. A figura 1 mostra a que ponto essa cepa se diferencia em relação às outras cepas testadas.

EXEMPLO 2: PROPRIEDADES DE ADESÃO AO MANOSE DA CEPA CNCM I-3690

[0058] A capacidade da cepa CNCM I-3690 de aderir especificamente ao manose foi determinada graças a um teste de aglutinação. Esse teste é baseado na presença de polissacarídeos que contêm manose na superfície das células de *Saccharomyces cerevisiae*. Quando bactérias que aderem ao manose são colocadas em contato com *S. cerevisiae*, um fenômeno de aglutinação, visível no microscópio, intervém.

[0059] Esse modelo permite avaliar propriedades anti-infecciosas potenciais de uma bactéria, que resultam de sua capacidade para entrar em competição com patogênicos ao nível da adesão à mucosa intestinal.

[0060] As cepas *L. plantarum* 229v e *L. plantarum* WCFS1, conhecidas por sua grande capacidade de adesão ao manose, foram utilizadas a título de controles positivos.

[0061] As cepas de *Lactobacillus* são cultivadas em meio MRS, a uma temperatura de 37°C. O crescimento das bactérias é interrompido na fase estacionária, e as bactérias são em seguida lavadas e ajustada em concentração. A cultura de *S. cerevisiae* é efetuada em meio "malt extract" (Oxoid).

[0062] Um volume de 5 µl de suspensão bacteriana é em seguida misturado com PBS ou metil- α -D-manopiranosídeo (concentração fi-

nal: 25 mM). E depois 100 µl de uma preparação a 1% de células de *S. cerevisiae*, é acrescentada. A mistura é agitada durante 10 min. à temperatura ambiente, e depois examinada no microscópio, e pontuações são atribuídas utilizando-se a notação seguinte:

[0063] Pontuação 0 = nenhuma aglutinação

[0064] Pontuação 1 = pequena aglutinação

[0065] Pontuação 3 = grande aglutinação

[0066] Pontuação 5 = aglutinação muito grande.

[0067] A experiência é feita três vezes independentemente para cada cepa.

[0068] Os resultados são dados na tabela V abaixo.

Tabela V

Gênero	Espécie	Referência	Pontuação Manose
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	DN 116 010 ou CNCM I-3690	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>Plantarum</i>	ATCC 14917 = DSMZ 20174 = WCFS1	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>Casei</i>	Shirota	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001=NM97/09514	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>Johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>Plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>Reuteri</i>	Biogaia SD 2112	0

Gênero	Espécie	Referência	Pontuação Manose
		ATCCC55730	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Longum</i>	BB536	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lac-</i> <i>tis</i>	HN019 = NM97/01925	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>Reuteri</i>	DSMZ 20016	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Infantis</i>	ATCC 15697	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Breve</i>	BBC50 = I-2219	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Breve</i>	ATCC 15700	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Longum</i>	NCC2705 = CNCM I- 2618	90

[0069] É observado que a porcentagem de células de *S. cerevisiae* aglutinadas pela cepa CNCM I-3690 é comparável à porcentagem de células de *S. cerevisiae* aglutinadas pelas cepas *L. plantarum* 229v e *L. plantarum* WCFS1.

EXEMPLO 3: CRESCIMENTO EM LEITE DA CEPA CNCM I-3690

[0070] As propriedades de crescimento em leite da cepa CNCM I-3690 foram testadas utilizando-se para isso o protocolo seguinte:

[0071] Um meio constituído de leite desnatado reconstituído com água adicionada de leite em pó desnatado foi semeado com a cepa CNCM I-3690, a taxas que variam entre $5,5 \times 10^6$ ufc/g e $3,3 \times 10^7$ ufc/g.

[0072] A atividade fermentativa da cepa, ligada a seu crescimento, é medida acompanhando-se de modo contínuo o pH do meio de crescimento.

[0073] Os resultados estão ilustrados pela figura 2.

[0074] Esses resultados mostram que a cepa CNCM I-3690 é capaz de crescer eficazmente em leite, e que ela pode, portanto ser utilizada na fabricação de produtos do leite fermentados.

REIVINDICAÇÃO

1. Composição compreendendo pelo menos 10^5 ufc por grama de uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que possui propriedades antimicrobianas, imunomoduladoras, e de adesão específica ao manose, depositada junto à CNCM sob o número I-3690, caracterizada pelo fato de que é um produto lácteo fermentado.

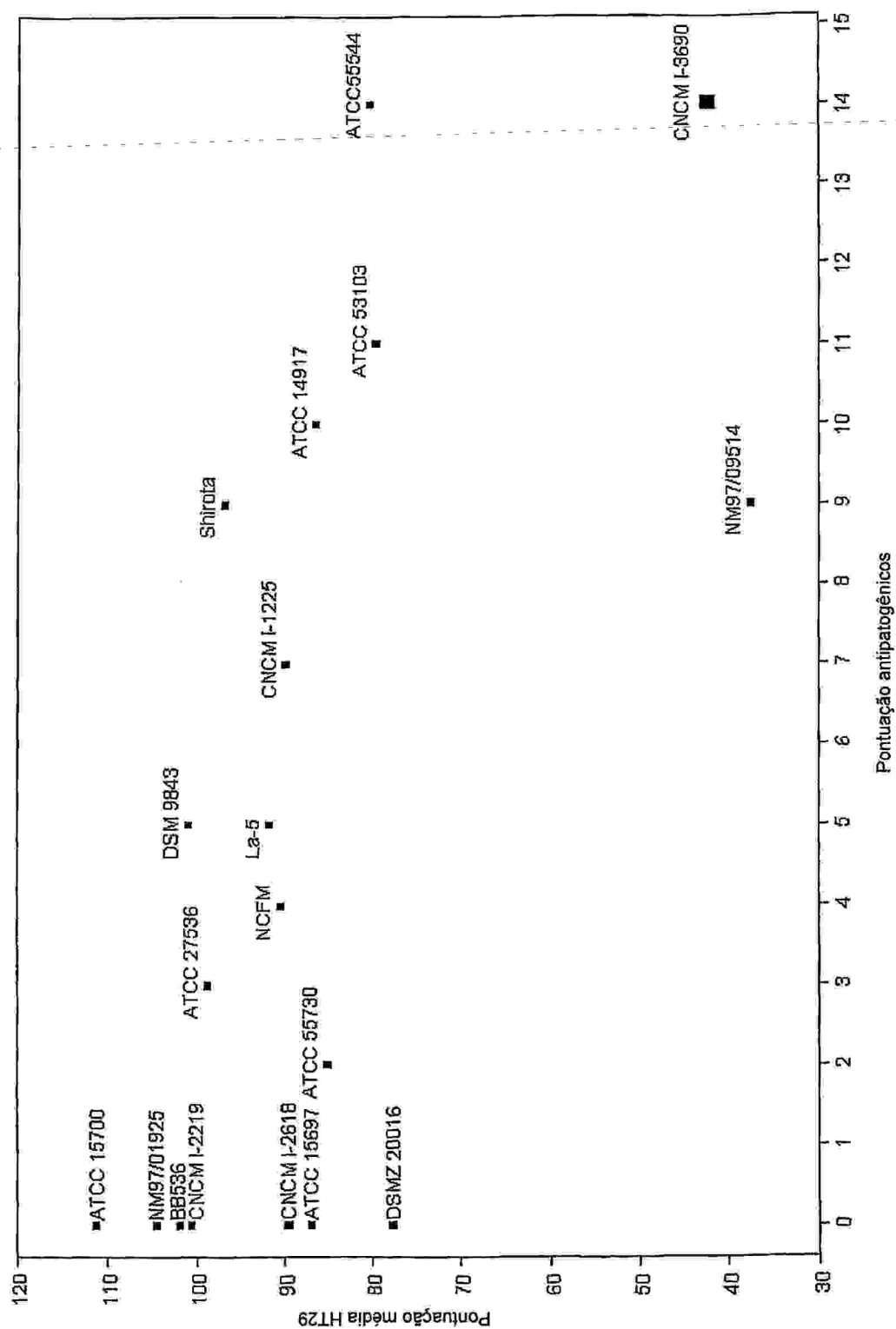


Fig 1

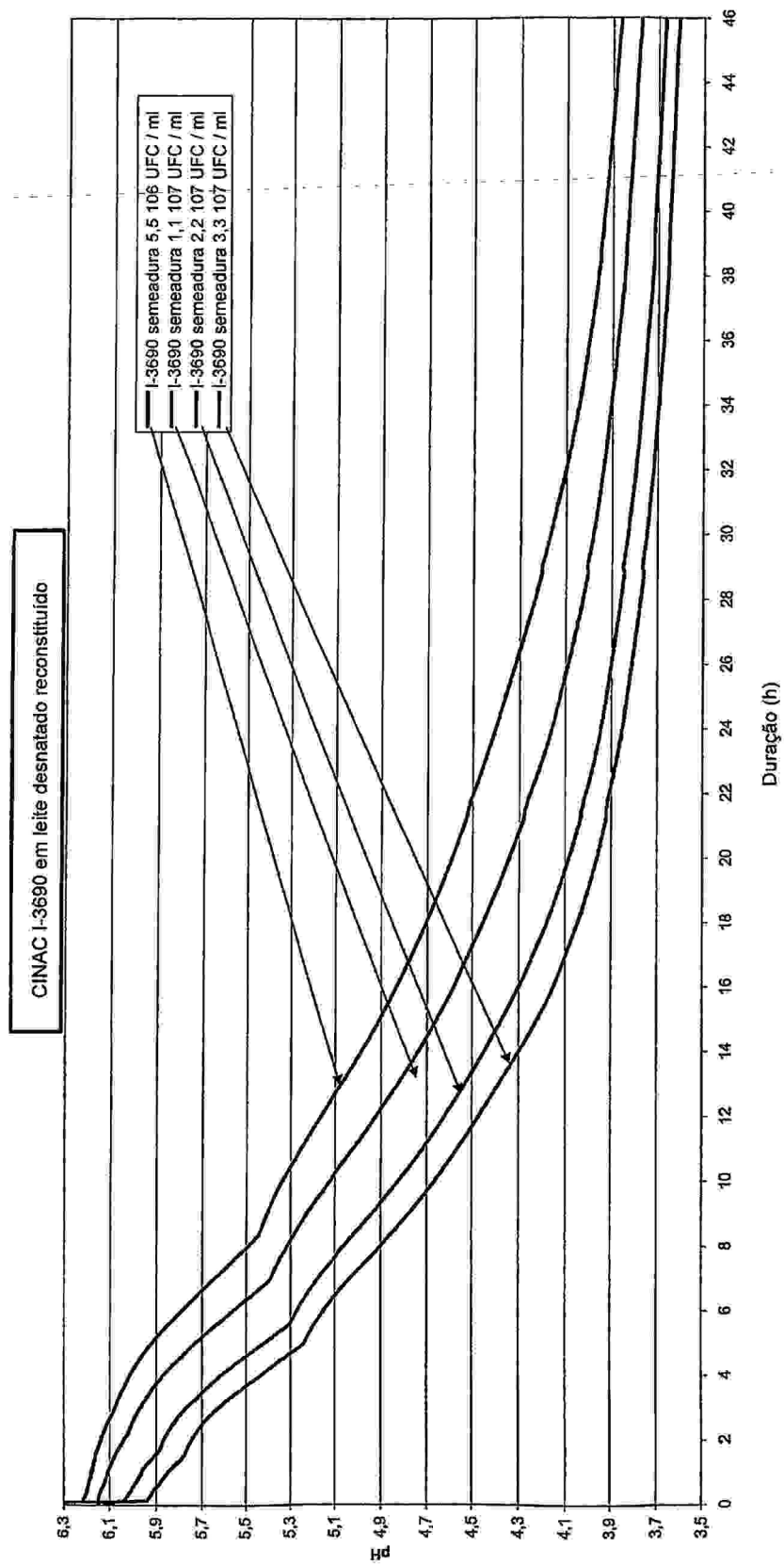


Fig 2