

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 830**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01) C12N 9/80	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01) A61P 33/02	(2006.01)
A61K 38/46	(2006.01)	
A61K 38/50	(2006.01)	
A61K 35/74	(2015.01)	
A61K 35/741	(2015.01)	
A61K 35/744	(2015.01)	
C07K 14/335	(2006.01)	
C12N 15/74	(2006.01)	
A23L 33/135	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2015** **PCT/EP2015/068334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016** **WO16020544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2015** **E 15750388 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.06.2021** **EP 3177306**

54 Título: **Composiciones para la inhibición de *Giardia lamblia***

30 Prioridad:

08.08.2014 EP 14306265

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.12.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (33.3%)
147 rue de l'Université
75007 Paris, FR;
MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
(33.3%) y
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**BERMUDEZ-HUMARAN, LUIS G.;
ALLAIN, THIBAUT;
FLORENT, ISABELLE;
LANGELLA, PHILIPPE;
GRELLIER, PHILIPPE;
TRAVERS, MARIE-AGNÈS y
POLACK, BRUNO**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 885 830 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

Composiciones para la inhibición de *Giardia lamblia*

- 5 La presente descripción se refiere a una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para su utilización para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, comprendiendo dicha composición una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), una bacteria que segrega una BSH, una célula hospedadora recombinante que segrega una BSH, o una combinación de las mismas. La presente descripción asimismo se refiere a la utilización de una composición que exhibe una actividad de BSH para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, y a una
10 composición farmacéutica o una composición alimenticia que comprende, como principio activo, una BSH, una bacteria que segrega una BSH, o una célula hospedadora recombinante capaz de segregar una BSH.

- El *Giardia lamblia* es un protozoo parásito responsable de la giardiasis, una enfermedad caracterizada por malabsorción intestinal aguda o crónica, diarrea, pérdida de peso, deshidratación, y dolor abdominal en seres
15 humanos y una variedad de animales. Es uno de los parásitos intestinales más comunes del mundo. La giardiasis tiene un alto impacto veterinario y un alto impacto en la salud pública, es responsable de una importante morbilidad humana, especialmente causando deficiencias nutricionales en los niños de los países en desarrollo (Ali y Hill, 2003). Los países desarrollados asimismo están preocupados por la giardiasis, y los brotes se han asociado con la contaminación del agua potable resultante de la escorrentía de suelos contaminados por lluvias, prácticas
20 agrícolas, y disfunciones de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Mons. et al., 2009).

- El *G. lamblia* entra en los vertebrados cuando los quistes se ingieren con alimentos, agua o fómites contaminados con heces de hospedadores infectados. Los quistes siguen siendo infecciosos durante meses en aguas ambientales. Son altamente resistentes a los desinfectantes clorados utilizados en los tratamientos de agua
25 potable, y las dosis infecciosas son bajas (10 a 100 quistes). Después de la ingestión, las formas infecciosas se exquistan, liberando trofozoítos que establecen infecciones en la parte superior del intestino delgado (duodeno) en la que interactúan con la barrera intestinal. El duodeno es un entorno muy específico en el que entran los alimentos del estómago, la bilis de la vesícula biliar, y las enzimas digestivas del páncreas. Allí, *G. lamblia* se divide por fisión binaria, y finalmente sale del hospedador con las heces una vez que los trofozoítos han vuelto a formar quistes. El fármaco de elección para el tratamiento de la giardiasis sigue siendo el metronidazol, un 5-nitroimidazol, que se
30 reduce a compuestos tóxicos por la enzima del parásito piruvato:ferredoxin oxido-reductasa. Se informa de efectos secundarios del tratamiento farmacológico, y aparece resistencia al metronidazol *in vitro* y en entornos clínicos (se dio a conocer que hasta el 20% de las cepas ambientales eran resistentes) (Upcroft y Upcroft, 2001).

- 35 Todavía no está claro cómo se produce la patología por *Giardia*, pero probablemente sea multifactorial (Farthing et al., 1997). Las fisiopatologías observadas comprenden daños en la superficie de la mucosa del hospedador por atrofia de microvellosidades y criptas, disminución de la permeabilidad epitelial, y deterioro de la actividad de las enzimas digestivas. Estos cambios pueden deberse tanto a factores del hospedador como a los del parásito.

- 40 Ahora se reconoce ampliamente que la microbiota intestinal desempeña un papel en la protección del hospedador contra la colonización intestinal por patógenos (Travers et al., 2011). Diferentes mecanismos pueden ser responsables de los efectos protectores: competencia por los sitios receptores de patógenos, barrera para el acceso de patógenos, producción de compuestos antimicrobianos, competencia por sustratos nutricionales, y mejora de las respuestas inmunes innatas y adaptativas del hospedador (Tancrede et al., 1992). Las estrategias
45 nutricionales se basan en un aumento de los componentes de la microbiota intestinal que están asociados con la actividad protectora (Brassard D. y Schiffrin EJ., 1997). La colonización del intestino por *G. lamblia* depende en gran medida de la microbiota intestinal (Singer y Nash, 2000). Las pruebas sugieren fuertemente la participación de la bacteria *Enterococcus faecium* en la respuesta inmune del hospedador contra *G. lamblia* (Benyacoub et al., 2005). Los factores extracelulares de *L. johnsonii* La1 bloquean el crecimiento *in vitro* de *G. lamblia* en la fase G1, lo que indica que las bacterias pueden afectar directamente el desarrollo del parásito (Perez et al., 2001). Se demostró que las bacterias probióticas *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizan el establecimiento de *G. lamblia*
50 en un modelo de roedor (Humen et al., 2005).

- El creciente número de brotes de giardiasis debido a la contaminación del agua potable, los efectos secundarios de los fármacos anti-*Giardia* disponibles, así como la creciente aparición de resistencias a estos fármacos, hacen que la giardiasis sea un tema preocupante, y existe una necesidad real de estrategias terapéuticas alternativas. La presente invención proporciona composiciones que exhiben una actividad de hidrolasa de sales biliares (BSH) como inhibidores efectivos para *Giardia lamblia*, para la prevención o el tratamiento de la giardiasis. De hecho, los
55 inventores han demostrado que la inhibición del crecimiento de parásitos está mediada por la o las actividades de hidrolasa de sales biliares de bacterias segregada que producen sales biliares desconjugadas a partir de la bilis presente en el medio de cultivo, y que, a diferencia de las sales biliares conjugadas normales que son las principales componentes de la bilis, las sales biliares desconjugadas se consideran tóxicas para *Giardia*.

- Se estudió la actividad anti-*Giardia* *in vivo* e *in vitro* para *L. johnsonii* La1 (LjLa1) (Perez et al. 2001, Humen et al. 2005). Se secuenciaron los genomas de *L. johnsonii* La1 y *G. lamblia* (Pridmore et al. 2004, Morrison et al. 2007). Halliday et al (1995) describen que *G. lamblia* internaliza las sales biliares conjugadas; sin embargo, este
65

documento no menciona el papel de las sales biliares no conjugadas. Shukla et al. (2011, 2012, 2013) describen que la administración de *Lactobacillus rhamnosus* disminuye la gravedad de la giardiasis. La patente US nº 6.905.679 describe un método para el tratamiento de un trastorno asociado con la colonización del intestino por *Giardia intestinalis*, que comprende la administración de bacterias *Lactobacillus acidophilus* La10 (número de referencia CNCM 1-2332), de *Bifidobacterium bifidum* (1-2333) o de *Bifidobacterium infantis* (1-2334). El efecto inhibidor de las bacterias del ácido láctico se atribuye posiblemente a ácidos orgánicos particulares segregados por dichas bacterias del ácido láctico.

Sin embargo, ninguno de estos documentos describe el papel de la actividad de hidrolasa de sales biliares, en presencia de sales biliares, para la inhibición de *Giardia lamblia*.

Una composición según la presente invención representa una nueva estrategia terapéutica contra *Giardia lamblia*, basada en la actividad catalítica natural de las hidrolasas de sales biliares, para prevenir o tratar la giardiasis. Una composición según la invención representa además un interés de salud pública al proporcionar un medio para contrarrestar la aparición de cepas de *Giardia* resistentes a los fármacos.

La invención se entenderá más completamente a partir de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria y de los dibujos adjuntos, proporcionados únicamente a título ilustrativo y no limitativo del alcance pretendido de la invención.

La presente invención se refiere a materias como se definen en las reivindicaciones 1 a 13.

La presente invención se refiere en primer lugar a una composición como se define en las reivindicaciones 1 a 7 que presenta una actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o la prevención de la giardiasis.

La expresión “actividad de hidrolasa de sales biliares” o “actividad de BSH” se refiere a la capacidad de una composición según la invención para hidrolizar sales biliares conjugadas para generar sales biliares desconjugadas, y glicina o taurina. BSH escinde el enlace peptídico de los ácidos biliares, lo que da como resultado la eliminación del grupo de aminoácidos del núcleo esteroideo, y la producción de ácidos biliares desconjugados o no conjugados, que precipitan a pH bajo.

La expresión “tratamiento o prevención de la giardiasis” se refiere al tratamiento o la prevención de trastornos asociados con la presencia en el intestino de *Giardia lamblia* o de *Giardia intestinalis*, y en particular trastornos asociados con la infestación y/o colonización del intestino por dichos parásitos.

Las sales biliares conjugadas, o ácidos biliares, son ácido glicocólico (GCA), ácido taurocólico (TCA), ácido glicodesoxicólico (GDCA), ácido taurodesoxicólico (TDCA), ácido glicoquenodesoxicólico (GCDCA), y ácido tauroquenodesoxicólico (TCDCA). Las sales biliares no conjugadas, asimismo denominadas sales biliares desconjugadas, son: ácido cólico (CA), ácido desoxicólico (DCA), y ácido quenodesoxicólico (CDCA).

La actividad de BSH se evalúa mediante la detección de los productos generados por la reacción enzimática, en particular la detección:

- de glicina y/o taurina, liberada de sales biliares conjugadas,
- de ácido cólico (CA), ácido desoxicólico (DCA), y/o ácido quenodesoxicólico (CDCA)

mediante métodos de detección clásicos bien conocidos por un experto en la materia de la enzimología, que incluyen, sin restricción, cromatografía, espectrometría de masas, análisis proteómico, espectrofotometría, fluorometría, colorimetría, o quimioluminiscencia, y cualquier método tal como se describe en la presente memoria descriptiva. En una forma de realización particular, CA, DCA y/o CDCA se detectan mediante análisis de espectrometría de masas (análisis LC/ESI-MS) de componentes biliares, y análisis proteómico.

Un método específico para la detección de la actividad de BSH incluye un método tal como el descrito en la presente memoria descriptiva, usando análisis de espectrometría de masas (análisis LC/ESI-MS) y análisis proteómico de componentes biliares. Asimismo puede detectarse, en bacterias, mediante un método que comprende el crecimiento de dichas bacterias en un caldo adaptado, el esparcimiento de las bacterias sobre un medio suplementado, o no, con ácido glicodesoxicólico al 0,2% (p/vol), e incubación anaeróbica durante 48 h. Los precipitados blancos alrededor de las colonias y el aclaramiento del medio son indicativos de la actividad de BSH.

Por lo tanto, la presente descripción se refiere a una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, comprendiendo dicha composición por lo menos uno de los siguientes elementos, o una combinación de los mismos:

- Una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH),
- Una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de las cepas bacterianas

Lactobacillus johnsonii La1 (referencia pública NCC533, CNCM 1-1225), *Lactobacillus acidophilus* La10 (NCC90, CNCM 1-2332), *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333) y *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334),

- 5 - Una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH.

La presente invención se refiere a una composición que presenta actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, comprendiendo dicha composición por lo menos uno de los siguientes elementos, o una combinación de los mismos:

- 10 - Una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH),
- Una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (referencia pública NCC90, CNCM 1-2332), *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333) y *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334),
- 15 - Una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH,

en la que dicha actividad de BSH se determina mediante la detección de la presencia de glicina o taurina, liberada de sales biliares conjugadas, o mediante la detección de la presencia de ácido cólico (CA), ácido desoxicólico (DCA), y/o ácido quenodesoxicólico (CDCA).

La actividad de BSH de una enzima BSH se expresa como unidades enzimáticas (U) cuando se ensaya usando un sustrato taurodesoxicólico y/o glicodesoxicólico. Un ejemplo de esta determinación se describe en el Ejemplo 13 de la presente solicitud de patente. El nivel de la actividad de una BSH, en una composición según la descripción, puede expresarse por referencia a la actividad de BSH de *C. perfringens* comercial, y posiblemente usando un ensayo para dicha actividad como se describe en el aviso del fabricante de *C. perfringens*.

En un aspecto particular, la presente descripción se refiere a una composición que exhibe una actividad de BSH para utilización en el tratamiento o prevención de la giardiasis, en la que dicha actividad de BSH está comprendida entre 0,0001 U y 100 U, entre 0,001 U y 10 U, entre 0,01 U y 1 U, entre 0,1 U y 0,5 U.

En un primer aspecto particular, la presente invención se refiere a una composición que presenta actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o prevención de la giardiasis, en la que la actividad de hidrolasa de sales biliares está asociada con la presencia de por lo menos una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH).

En otro aspecto particular, la presente descripción se refiere a una composición que exhibe una actividad de BSH para utilización en el tratamiento o prevención de la giardiasis, en la que dicha composición comprende una enzima BSH, o es capaz de segregar por lo menos una enzima BSH, en la que la concentración de BSH presente en dicha composición está comprendida entre 0,01 µg/ml y 10 mg/ml, entre 0,1 µg/ml y 1 mg/ml, entre 0,5 µg/ml y 200 µg/ml, entre 1 µg/ml y 100 µg/ml, entre 1 µg/ml y 50 µg/ml, o entre 5 µg/ml y 20 µg/ml.

En una forma de realización particular, una composición según la invención exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares asociada con la presencia de por lo menos una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), seleccionándose dicha enzima de entre BSH procariota, o BSH sintetizada por bacterias. En una forma de realización más particular, una composición según la invención exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares asociada con la presencia de por lo menos una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH) sintetizada por una bacteria del ácido láctico.

Una bacteria del ácido láctico se define como bacterias grampositivas que comparten características metabólicas y fisiológicas comunes, en las que el ácido láctico se produce como un producto final metabólico principal de la fermentación de hidratos de carbono. El grupo de bacterias del ácido láctico incluye en particular *Lactobacillus*, *Lactococcus*, y *Bifidobacterium*. En una forma de realización más particular, una composición según la invención exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares asociada con la presencia de por lo menos una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH) cuya secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con, o que es una variante natural de, una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

- 60 - *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-12 (LJ 1412) (SEC ID N°1, número de entrada de UniProtKB Q74IV4)
- *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-47 (LJ 1147) (SEC ID N°2, número de entrada de UniProtKB Q74JG0)
- *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-56 (LJ 0056) (SEC ID N°3, número de entrada de UniProtKB Q74LX7)
- 65 - *Lactobacillus gasserii* (referencia ATCC: 33323) BSH-A (SEC ID N°4, número de entrada de UniProtKB

B9V405)

- *Lactobacillus gasseri* BSH-B (SEC ID N°5, número de entrada de UniProtKB Q9AHJ7)
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 (SEC ID N°6, número de entrada de UniProtKB F4AEI5),
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 (SEC ID N°7, número de entrada de UniProtKB F4ACA3),
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 (SEC ID N°8, número de entrada de UniProtKB F4ADE7).

Un experto en la materia encuentra fácilmente la enzima BSH adecuada en una composición según la presente descripción, y puede seleccionarse, en particular, de entre las siguientes:

- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH, número de entrada de UniProtKB F4AEI5,
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH, número de entrada de UniProtKB F4ACA3,
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH, número de entrada de UniProtKB F4ADE7,
- *Lactobacillus johnsonii* pf01 BSH, número de entrada de UniProtKB F7SHH3, y
- *Lactobacillus johnsonii* pf01 BSH, número de entrada de UniProtKB F7SGA1.

La presente invención comprende la presencia de variantes de enzimas BSH que tienen por lo menos 80%, por lo menos 85%, preferentemente 90%, por lo menos 90%, más preferentemente 95%, por lo menos 95%, e incluso más preferentemente 98%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID N°1 a SEC ID N°7. Como se usa en la presente memoria, el término "identidad" significa en la presente memoria que dos secuencias de aminoácidos son idénticas (es decir, aminoácido por aminoácido) en la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparecen restos de aminoácidos idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia de una secuencia de aminoácidos asimismo se puede calcular usando el software BLAST con el parámetro por defecto o definido por el usuario. Según se aplica a los polipéptidos, la expresión identidad sustancial significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de manera óptima, comparten por lo menos alrededor de 80% de identidad de secuencia, preferentemente por lo menos 85% de identidad, preferentemente por lo menos alrededor de 90% de identidad de secuencia, más preferentemente por lo menos alrededor de 95% de identidad de secuencia, por lo menos 98% de identidad de secuencia o más (por ejemplo, 99% de identidad de secuencia). Como se usa en la presente memoria, un "derivado" o "secuencia derivada de", o "variante natural", se refiere a una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 80% de identidad, preferentemente por lo menos 85% de identidad, más preferentemente por lo menos 90% de identidad, e incluso más preferentemente por lo menos 95% de identidad o más, tal como por lo menos 98% de identidad de secuencia, o 99% de identidad con dicha secuencia de aminoácidos de referencia.

Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares asociada con una enzima BSH, para su utilización en la prevención o el tratamiento de la giardiasis, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha enzima se selecciona de entre las siguientes:

- *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-12 (SEC ID N°1),
- *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-47 (SEC ID N°2),
- *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-56 (SEC ID N°3),
- *Lactobacillus gasseri* BSH-A (SEC ID N°4),
- *Lactobacillus gasseri* BSH-B (SEC ID N°5),
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH (SEC ID N°6), número de entrada de UniProtKB F4AEI5,
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH (SEC ID N°7), número de entrada de UniProtKB F4ACA3,
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH (SEC ID N°8), número de entrada de UniProtKB F4ADE7.

En otra forma de realización particular, la invención se refiere a una composición que presenta actividad de hidrolasa de sales biliares para su utilización en la prevención o el tratamiento de la giardiasis, en la que dicha composición comprende una bacteria del ácido láctico capaz de segregar una BSH, seleccionándose dicha bacteria del ácido láctico de entre: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533, CNCM 1-1225) y de *Lactobacillus acidophilus* (NCC90, CNCM 1-2332), y *Bifidobacterium*, con la excepción de las cepas bacterianas *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333) y de *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334).

La expresión “bacterias del ácido láctico” se refiere a la presencia de por lo menos un microorganismo, en el que el microorganismo está presente preferentemente de aproximadamente 106 a 1012 cfu (unidad formadora de colonias). Los microorganismos pueden estar presentes como tales, u opcionalmente después de una etapa de purificación a partir de un medio de cultivo. En otra forma de realización, una composición según la descripción comprende el sobrenadante de un medio de cultivo de dicho microorganismo, que puede concentrarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia.

Por tanto, la invención se refiere a una composición que presenta actividad de hidrolasa de sales biliares para su utilización en la prevención o el tratamiento de la giardiasis, comprendiendo dicha composición un *Lactobacillus*, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533, CNCM 1-1225) y de *Lactobacillus acidophilus* (NCC90, CNCM 1-2332).

La invención asimismo se refiere a una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para su utilización en la prevención o el tratamiento de la giardiasis, comprendiendo dicha composición un *Bifidobacterium*, con la excepción de las cepas bacterianas *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333) y de *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334).

En un aspecto más particular, una composición según la invención comprende un *Lactobacillus* seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- *Lactobacillus johnsonii*, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533, CNCM 1-1225)
- *Lactobacillus gasseri*,
- *Lactobacillus acidophilus*, con la excepción de *Lactobacillus acidophilus* (NCC90, CNCM 1-2332), y
- *Lactobacillus reuteri*.

Las siguientes cepas bacterianas han mostrado una actividad particular en una composición según la invención, como se muestra en la parte de “Ejemplos” de la memoria descriptiva.

En un aspecto particular, la descripción se refiere a una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para su utilización en la prevención del tratamiento de la giardiasis, comprendiendo dicha composición un lactobacilo seleccionado de entre el grupo que consiste en las cepas bacterianas referenciadas como:

- *Lactobacillus johnsonii*:

Cepa bacteriana depositada en el CNCM, Institut Pasteur, París, con el número I-4885, el 7 de agosto de 2014

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP103614,

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP 103786,

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP 103620,

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP103652,

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP103653,

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP103654,

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP103781,

Cepa bacteriana depositada con la referencia CIP103782,

- *Lactobacillus gasseri*:

Cepa bacteriana depositada con la referencia ATCC33353,

Cepa bacteriana depositada en el CNCM, Institut Pasteur, París, con el número I-4884, el 7 de agosto de 2014,

Cepa bacteriana depositada con la referencia LMG11413,

- *Lactobacillus acidophilus*

Cepa bacteriana depositada con la referencia ATCC700396.

En una forma de realización particular, *Lactobacillus* se selecciona de entre el grupo que consiste en las cepas bacterianas referenciadas como:

Lactobacillus johnsonii: depositado en el CNCM, Institut Pasteur, París, con el número I-4885, el 7 de agosto de 2014

Lactobacillus gasseri: depositado en el CNCM, Institut Pasteur, París, con el número I-4884, el 7 de agosto de 2014.

En un aspecto particular, la presente invención se refiere a una composición que exhibe una actividad de BSH para la prevención o el tratamiento de la giardiasis, comprendiendo dicha composición una bacteria del ácido láctico capaz de segregar una BSH, en la que dichas bacterias están presentes en una cantidad comprendida entre 10^6 a 10^{12} cfu/g de bacterias.

En otra forma de realización particular, la presente invención se refiere a una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para su utilización en la prevención del tratamiento de la giardiasis, comprendiendo dicha composición una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica por lo menos una enzima hidrolasa de sales biliares, pudiendo dicha célula hospedadora segregar dicha enzima hidrolasa de sales biliares.

La expresión "célula hospedadora" se refiere a una célula viva capaz de recibir ácido nucleico heterólogo, y capaz de sintetizar por lo menos una proteína codificada por dicho ácido nucleico heterólogo. En una forma de realización preferida, dicho ácido nucleico heterólogo es un vector de expresión que contiene secuencias de ácido nucleico capaces de codificar una proteína de interés y todos los elementos reguladores necesarios para la producción de dicha proteína en dicha célula hospedadora.

En un aspecto particular, una composición según la invención comprende una célula hospedadora que comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico seleccionada de entre las siguientes:

- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-12 (SEC ID N°9), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural tiene una secuencia nucleotídica de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con SEC ID N°9,
- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-47 (SEC ID N°10), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural tiene una secuencia nucleotídica de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con SEC ID N°10,
- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-56 (SEC ID N°11), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural tiene una secuencia nucleotídica de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con SEC ID N°11.

En otro aspecto particular, la invención se refiere a una célula hospedadora para utilización en el tratamiento o la prevención de la giardiasis, comprendiendo dicha célula hospedadora por lo menos una secuencia de ácido nucleico, en la que dicha por lo menos una secuencia de ácido nucleico puede ser heterólogo, seleccionada de entre las siguientes:

- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-12 (SEC ID N°9), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural tiene una secuencia nucleotídica de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con SEC ID N°9,
- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-47 (SEC ID N°10), o una variante natural de

la misma, en la que dicha variante natural tiene una secuencia nucleotídica de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con SEC ID N°10,

- 5 - una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-56 (SEC ID N°11), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural tiene una secuencia nucleotídica de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% de identidad con SEC ID N°11.

10 Cualquier enzima BSH adecuada en una composición según la presente descripción puede ser seleccionada por un experto en la materia, y una secuencia nucleotídica que codifica dicha enzima puede encontrarse en bases de datos públicas, se puede seleccionar, en particular, de entre las siguientes:

- 15 - *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH, número de entrada de UniProtKB F4AEI5,
 - *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH, número de entrada de UniProtKB F4ACA3,
 - *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH, número de entrada de UniProtKB F4ADE7,
 20 - *Lactobacillus johnsonii* pf01 BSH, número de entrada de UniProtKB F7SHH3,
 - *Lactobacillus johnsonii* pf01 BSH, número de entrada de UniProtKB F7SGA1,
 - *Clostridium perfringens* BSH
 25 - *Lactobacillus acidophilus* BSH, cepa bacteriana referenciada como ATCC700396.

30 En un aspecto más particular, una composición según la presente invención comprende una célula hospedadora que comprende por lo menos una secuencia de ácido nucleico que codifica una BSH, seleccionándose dicha célula hospedadora de entre el grupo de bacterias del ácido láctico. Más particularmente, dicha bacteria del ácido láctico se selecciona de entre lactobacilos y lactococos. En una forma de realización particular de la invención, dicha bacteria del ácido láctico es *Lactococcus lactis*. En otra forma de realización particular de la invención, dicha bacteria del ácido láctico es un lactobacilo seleccionado de entre el grupo que consiste en:

- 35 - *Lactobacillus johnsonii*,
 - *Lactobacillus reuteri*, y
 40 - *L. Lactobacillus gasseri*.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una composición que exhibe actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, en el que dicha composición comprende:

- 45 - una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH),
 - una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de la cepa *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*,
 50 - una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH heteróloga, o
 - una combinación de las mismas.

55 En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a la utilización de una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares, en el que dicha composición comprende: una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de la cepa *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*, una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH heteróloga, o una combinación de las mismas, para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, en seres humanos.

60 En otra forma de realización más particular, la presente invención se refiere a la utilización de una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares, en el que dicha composición comprende: una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de la cepa *Lactobacillus johnsonii* La1, una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH heteróloga, o una combinación de las mismas, para el tratamiento o la prevención de la giardiasis en animales. De hecho, una composición según la invención puede usarse para el tratamiento o la prevención de la giardiasis en

cerdos y en vacas; por lo tanto, en una forma de realización particular, una composición según la invención es para utilización en el tratamiento o prevención de la giardiasis en cerdos o en vacas.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una BSH, una bacteria del ácido láctico capaz de segregar por lo menos una BSH, una célula hospedadora capaz de segregar una BSH, o una combinación de las mismas, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Una composición farmacéutica según la invención comprende una cantidad eficaz de una BSH, una bacteria del ácido láctico capaz de segregar por lo menos una BSH, una célula hospedadora capaz de segregar una BSH, o una combinación de las mismas, y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que dicha cantidad se define como unidades catalíticas (U), para la enzima BSH o la enzima BSH recombinante, o como una serie de unidades formadoras de colonias (cfu), para las bacterias vivas.

15 Una composición farmacéutica según la invención se selecciona de una composición administrable por vía oral, que incluye, sin restricción, comprimidos, suspensión bacteriana líquida, suplemento oral seco, suplemento oral húmedo, y composiciones de alimentación por sonda.

20 Otras preparaciones farmacéuticas o nutricionales adecuadas para la administración oral son cápsulas de gelatina duras o blandas hechas de gelatina y un plastificante tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden incluir el compuesto de la invención mezclado con cargas tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y si se desea, estabilizantes. En las cápsulas blandas, el compuesto de la invención se disuelve o suspende preferentemente en un líquido adecuado, tal como aceite graso, aceite de parafina, o un polietilenglicol líquido, al que se puede añadir un estabilizante.

25 En una forma de realización particular, una composición farmacéutica según la invención comprende una cantidad eficaz de una enzima BSH y un portador farmacéuticamente aceptable para una administración a animales. En un aspecto más particular, una composición farmacéutica de la invención comprende una enzima BSH-12, BSH-47 y/o BSH-56, y un portador que comprende un vehículo para la administración oral de moléculas, mezclado con un amortiguador de cultivo celular.

30 Un experto en la materia es capaz de seleccionar un vehículo adaptado, como ejemplo se puede citar SYRSPEND®, y preparar una mezcla adaptada para su administración oral, por ejemplo mezclando dicho vehículo con una disolución diluyente y/o con un amortiguador. Como ejemplo, una composición farmacéutica según la invención comprende una cantidad eficaz de una enzima BSH-12, BSH-47 y/o BSH-56 y un portador que comprende una mezcla de SYRSPEND® NaHCO₃ 16,4%, DMEM (Medio de cultivo modificado de Dulbecco).

35 Los núcleos de los comprimidos recubiertos se pueden proporcionar con recubrimientos adecuados, que si es apropiado son resistentes a los jugos gástricos, utilizando, entre otros, disoluciones concentradas de azúcar que pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de goma laca en disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados, o, para la preparación de recubrimientos resistentes a jugos gástricos, disoluciones de preparaciones de celulosa adecuadas tales como ftalato de acetilcelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Se pueden añadir tintes o pigmentos a los comprimidos o comprimidos recubiertos, por ejemplo, para identificar o indicar diferentes dosis del principio activo.

40 En una forma de realización más particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una BSH, una bacteria del ácido láctico capaz de segregar por lo menos una BSH, una célula hospedadora capaz de segregar una BSH, o una combinación de las mismas como principio activo, en la que dicho principio activo está encapsulado.

45 En otro aspecto particular, la presente descripción se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, comprendiendo dicha composición un portador y por lo menos uno de los siguientes elementos, o una combinación de los mismos:

- 50
- una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH),
 - una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (referencia pública NCC533, CNCM 1-1225), *Lactobacillus acidophilus* La10 (NCC90, CNCM 1-2332), *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333), y *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334),
 - una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH.
- 60

65 En un aspecto más particular, la presente descripción se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o la prevención de la

giardiasis, comprendiendo dicha composición un portador farmacéuticamente aceptable y por lo menos uno de los siguientes elementos, o una combinación de los mismos:

- una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH),
- una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (referencia pública NCC533, CNCM 1-1225), *Lactobacillus acidophilus* La10 (NCC90, CNCM 1-2332), *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333), y *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334),
- una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH.

En otro aspecto más particular, la presente descripción se refiere a un procedimiento para la preparación de una composición que exhibe una actividad de hidrolasa de sales biliares para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, comprendiendo dicha composición un portador aceptable para una composición alimenticia o un suplemento dietético y por lo menos uno de los siguientes elementos, o una combinación de los mismos:

- una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH),
- una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (referencia pública NCC533, CNCM 1-1225), *Lactobacillus acidophilus* La10 (NCC90, CNCM 1-2332), *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333), y *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334),
- una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH.

Un procedimiento según la descripción comprende por lo menos una etapa de poner en contacto dicho portador con una cantidad eficaz de dicha enzima y/o dicha bacteria y/o dicho hospedador/célula, y una etapa de mezclar dichos elementos a fin de preparar una composición adecuada para su utilización pretendida.

La presente descripción asimismo se refiere a un método para la prevención o para el tratamiento de la giardiasis, comprendiendo dicho método la administración, a un paciente que lo necesita, de una composición que comprende por lo menos uno de los siguientes elementos, o una combinación de los mismos:

- una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH),
- una bacteria capaz de segregar por lo menos una BSH, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (referencia pública NCC533, CNCM 1-1225), *Lactobacillus acidophilus* (NCC90, CNCM 1-2332), *Bifidobacterium bifidum* (NCC189, CNCM 1-2333), y *Bifidobacterium infantis* (NCC200, CNCM 1-2334),
- una célula hospedadora recombinante capaz de segregar por lo menos una BSH.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición alimenticia o un suplemento dietético que comprende, como principio activo, una BSH, una bacteria del ácido láctico capaz de segregar por lo menos una BSH, una célula hospedadora capaz de segregar una BSH, o una combinación de las mismas, y opcionalmente un portador.

Una composición alimenticia o un suplemento dietético según la invención comprende una cantidad eficaz de una BSH, una bacteria del ácido láctico capaz de segregar por lo menos una BSH, una célula hospedadora capaz de segregar una BSH, o una combinación de las mismas, y un portador farmacéuticamente aceptable, en el que dicha cantidad eficaz se define como unidades catalíticas (U), para la enzima BSH o enzima BSH recombinante, o como varias unidades formadoras de colonias (cfu), para las bacterias vivas.

Una composición alimenticia o un suplemento dietético según la invención se puede proporcionar como una composición seca o húmeda, y se puede seleccionar, sin restricción, entre leche, yogur, queso, leche en polvo, y alimento para mascotas.

Leyendas de las figuras

Figuras 1A y 1B: efecto inhibitor del sobrenadante de LjLa1 sobre *G. lamblia*. La figura 1A representa la concentración de parásitos en función del tiempo de incubación en presencia de KM-FCS con (símbolos en negro) o sin (símbolos en blanco) bilis bovina (0.75 g/l, concentración final), en presencia (cuadrados) o ausencia (diamantes) de sobrenadante bacteriano (LjLa1sn). La concentración de parásitos se estimó contando las células vivas con una cámara de células Malassez, como se indica en el ejemplo 1. N=2. La figura 1B representa el porcentaje de inhibición del crecimiento de *G. lamblia* después de 24 h de cultivo expresado en

función de la concentración de sales biliares (histogramas grises) o de la bilis bovina completa (histogramas negros, parte derecha de la figura). Se incubaron trofozoítos de *G. lamblia* en KM-FCS durante 24 h a 37°C en condiciones anaeróbicas con LjLA1sn y diversas concentraciones de sales biliares (0.016, 0.032, 0.048 g/l, concentración final) o bilis bovina completa (0.5, 0.6, 0.75 g/l, concentración final). Los valores de inhibición del crecimiento (%) se normalizaron según el control en KM-FCS acidificado con ácido láctico suplementado con concentraciones similares de bilis bovina o sales biliares. Número de experimentos independientes = 3.

Figuras 2A a 2C: porcentaje de inhibición del crecimiento de *G. lamblia* después de 24 h de cultivo. La figura 2A representa el porcentaje de *G. lamblia* en presencia de (de izquierda a derecha) LjLa1sn sin tratamiento con proteasa, LjLa1sn con proteinasa K, LjLa1sn con pronasa; LjLa1sn con catalasa o calentado a 90°C durante 10 min antes del ensayo de inhibición del crecimiento de *G. lamblia*. La inhibición del crecimiento (%) se normalizó según el control emparejado: medio MTYI ajustado con ácido láctico incubado con perlas acopladas a proteasa o tratado durante 10 min a 90°C. Número de experimentos independientes = 3.

La Figura 2B representa el porcentaje de inhibición del crecimiento de *G. lamblia* después de 24 h de cultivo a pH variable. El sobrenadante de LjLa1 en medio MTYI se ajustó a pH 6.2, 6.7, 6.9, o 7.2 (histogramas de izquierda a derecha) antes de los ensayos de inhibición del crecimiento de *Giardia*. La inhibición del crecimiento (%) se normalizó según el control, es decir, el MTYI ajustado con ácido láctico se elevó posteriormente a pH 6.2, 6.7, 6.9, o 7.2. Número de experimentos independientes = 3. La Figura 2C representa el porcentaje de inhibición del crecimiento de *G. lamblia* después de 24 h de cultivo en sobrenadante de un cultivo de LjLa1 en medio KM-FCS filtrado a través de una membrana de corte de MW de 10 kDa, 30 kDa, o 50 kDa (de izquierda a derecha). El KM-FCS acidificado solo se procesó de manera similar. Las fracciones por encima y por debajo de los respectivos umbrales se analizaron para determinar la inhibición del crecimiento de *Giardia* en presencia de bilis (0.5 g/l). Los valores de inhibición (%) se normalizaron según los controles de KM-FCS. Número de experimentos independientes = 3.

Figuras 3A a 3C: impacto del sobrenadante de LjLa1 en la composición de la bilis bovina, como se muestra mediante cromatogramas de iones totales detectados mediante LC-MS de las muestras tratadas con SPE correspondientes a una incubación de la bilis durante 24 h a 37°C con medio KM solo (figura 3A), sobrenadante de LjLa1 (figura 3B), o sobrenadante de LjLa1 tratado con calor (figura 3C). Se establecieron perfiles metabólicos, a partir de los cuales se identificaron los componentes principales utilizando bases de datos, Metlin (Smith et al., 2006) o LMSD (Sud et al., 2007), o de su patrón de fragmentación MS/MS. TC: taurocolato, GC glicocolato, TCDC: tauroquenodesoxicolato, TDC: taurodesoxicolato, GDC: glicoquenodesoxicolato, GDC: glicodesoxicolato, C: colato, CDC: quenodesoxicolato, DC: desoxicolato.

Figuras 4A y 4B: aumento del contenido de sales no conjugadas de colato y desoxicolato después del tratamiento de la bilis con sobrenadante de LjLa1. Las figuras 4A y 4B representan un diagrama de caja que muestra la intensidad relativa de colato (C) y desoxicolato (DC) para la bilis incubada en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de sobrenadante de LjLa1.

Figuras 5A a 5C: la actividad inhibidora del crecimiento de *G. lamblia* y la actividad de BSH coeluyen en las mismas fracciones después de la separación del sobrenadante de LjLa1 mediante cromatografía de filtración en gel. Figura 5A: perfil de cromatografía. Figura 5B: actividad de BSH medida después de 24 h de incubación de GDC (2.4 g/l) con la fracción de filtración en gel recogida. Figura 5C: actividad inhibidora del crecimiento de *G. lamblia* después de 24 h de incubación con fracciones de cromatografía de filtración en gel en presencia de GDC (0.2 g/l).

Figura 6: inhibición del crecimiento de *Giardia lamblia* mediante BSH de *C. perfringens* enzimáticamente activa en presencia de sales biliares conjugadas con glicina (GDC, GCDC) o taurina (TDC, TCDC). BSH de *C. perfringens* comercial, enzimáticamente activa (barras oscuras) o inactivada (barras claras) mediante tratamiento por calor (100°C, 5 min), se añadió a medio de crecimiento de *G. lamblia*. GDC: glicodesoxicolato, GCDC: glicoquenodesoxicolato, TDC: taurodesoxicolato, TCDC: tauroquenodesoxicolato.

Figuras 7A a 7D: medida de la inhibición de *G. lamblia* por citometría de flujo.

Figura 8: porcentaje de parásitos vivos de *G. lamblia* cuando se cultivan en presencia de diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Figura 9: actividad enzimática de BSH-47 recombinante producida en *E. coli*. *E. coli* tipo salvaje o *E. coli* que segrega BSH-47 se incubaron en presencia de ácido taurodesoxicólico al 0,3% (paneles superiores) o en presencia de ácido glicodesoxicólico al 0,3% (paneles inferiores).

Figura 10: histograma que representa el número de parásitos vivos de *Giardia* (en células por ml) después de la incubación con (de izquierda a derecha) medio, medio y bilis, BSH de *C. perfringens* (1U), *C. perfringens* y bilis, BSH-47 recombinante, BSH-47 recombinante y bilis.

Figuras 11A y 11B: inhibición del crecimiento de *Giardia lamblia* mediante BSH recombinante enzimáticamente activa procedente de LjLa1 en presencia de bilis bovina (0,6 g/l) después de 20 h de incubación. La figura 11A representa la inhibición del crecimiento de *G. lamblia* mediante BSH-47 recombinante. La figura 11B representa la inhibición del crecimiento de *G. lamblia* por BSH-56 recombinante.

Figuras 12A y 12B: recuentos de quistes o trofozoítos de *G. lamblia* después de la administración a animales. Los ratones neonatos recibieron PBS, LjLa1 o *L. gasser* CNCM 1-4884 por sonda intragástrica (5×10^8 CFU/ratones) diariamente desde el día 5 antes de la inoculación con los trofozoítos de *G. lamblia* WB clon C6 (10^5 trofozoítos por animal). El sondaje nasogástrico se realizó hasta el día 15 ($n = 8$ a 12/grupo). Figura 12A: recuento de trofozoítos de *Giardia* en el intestino delgado. Los valores son la media $\pm$ SEM; $p < 0.05$. Figura 12B: recuentos de quistes de *Giardia* en el intestino grueso de ratones que pertenecen a diferentes grupos. Los valores son la media $\pm$ SEM; $p < 0.05$.

Figura 13: recuento de trofozoítos de *G. lamblia* en el intestino delgado. Los ratones se expusieron a los trofozoítos de *G. lamblia* WB clon C6 (10^5 trofozoítos por animal) el día 10. Los animales se trataron con PBS o BSH-47 a 1 μ g/ml (0.5 μ g por ratones), 10 μ g/ml (5 μ g por ratones) o 100 μ g/ml (50 μ g/ratones) mediante sonda intragástrica diaria hasta el día 15 ($n = 10$ a 11/grupo). Los valores son la media $\pm$ SEM; $p < 0.05$.

Ejemplos

Ejemplo 1: material y métodos

Productos y preparación de disoluciones madre.

Se prepararon disoluciones de bilis bovina (Sigma y Difco) a 100 mg/ml de disolución madre en agua destilada, se filtraron a 0.2 μ m, y se almacenaron a -20°C. Sales biliares puras (Sigma): glicocolato (GC), taurocolato (TC), glicodesoxicolato (GDC), taurodesoxicolato (TDC), glicoquenodesoxicolato (GCDC) y tauroquenodesoxicolato (TCDC), mezcla de sales biliares (Sigma) o sales biliares puras correspondientes (Sigma): colato (C), desoxicolato (DC) y quenodesoxicolato (CDC), y ácido fusídico (Sigma) se disolvieron en agua destilada hasta 12 mg/ml de disolución madre, se filtraron a 0.2 μ m, y se mantuvieron a -20°C. Hidrolasa de ácido biliar de coloilglicina (o hidrolasa de sales biliares, BSH, EC 3.5.1.24) de *Clostridium perfringens* (Sigma) se preparó a 10 U/ml en agua destilada (grado milli-Q), y se almacenó a -20°C. Se preparó ácido yodoacético (Sigma) como una disolución madre 0.5 M en agua destilada, y se congeló a -20°C. El suero fetal de ternera procedía de PAA Laboratories, GE Healthcare. El kit NEFA-C utilizado para la determinación cuantitativa de ácidos grasos no esterificados (NEFA) procedía de Biolabo (WAKO Diagnostics).

Cultivo celular de *Giardia lamblia*

Trofozoítos de cepas de *G. lamblia* WB (clon C6, ATCC30957) y HP1 (Portland-1, obSECuio de J. Tackezy) se cultivaron como se describió previamente en medio de Keiser TYI-S-33 (KM) con algunas modificaciones. TYI-S-33 se ajustó a pH 6.0, se suplementó con suero fetal de ternera inactivado por calor al 10% (Paget et al., 2004) y 0.6 mg/ml de bilis bovina (Carnaby et al., 1994). Se subcultivaron regularmente a una densidad de 5×10^4 células por tubo (12 ml) de parásitos en fase logarítmica enfriadas en hielo durante 10 min y centrifugadas a 700 x g, 5 min.

Cultivo de *Lactobacillus johnsonii* y producción de sobrenadante bacteriano

L. johnsonii La1 (LjLa1), CNRZ 1897, NCC533, fue proporcionado amablemente por Pascal Quénee (INRA Jouy en Josas, Equipe Atalis) y se ha aislado del producto LC1 en 1996 (Chambourcy, Francia). Los cultivos madre de LjLa1 se mantuvieron congelados en medio MRS Broth con glicerol al 15%. Las bacterias se subcultivaron en medio MRS Broth (Sigma) o medio TYI-S-33 modificado (MTYI) (Perez et al. 2001), y se incubaron anaeróbicamente durante 12-18 h a 37°C. Las bacterias se cultivaron posteriormente en medio MTYI o KM suplementado o no con suero fetal de ternera inactivado por calor al 10% durante 12-16 h en presencia o ausencia de 0.6 mg/ml de bilis bovina. Después de centrifugar (3,000 x g, 10 min) y de la filtración a 0,2 μ m, el pH del sobrenadante bacteriano se ajustó a 6.0, 6.2, 6.7, 6.9, o 7.2 con NaOH 5 N. Los controles apropiados se prepararon como sigue: el ácido láctico producido durante el crecimiento se cuantificó a partir de alícuotas de sobrenadantes (kit Enzytec™, R-Biopharm), y se añadió una cantidad equivalente de ácido láctico al medio reciente antes del ajuste del pH.

Ensayo de inhibición del crecimiento de *G. lamblia* in vitro

Un mililitro de suspensión de trofozoítos (1×10^5 parásitos/ml en KM suplementado con suero fetal de ternera al 10% pero sin bilis bovina) se mezcló con 500 μ l de sobrenadante bacteriano o hidrolasa de sales biliares de *C. perfringens* (BSH, 0.2, 1 o 2 U) o controles apropiados en KM o MTYI, en presencia de diferentes concentraciones de bilis bovina (0 a 0.6 mg/ml), sales biliares mixtas (0 a 0.2 mg/ml), sales biliares conjugadas (0 a 0.2 mg/ml), o sales biliares no conjugadas (0 a 0.2 mg/ml). Las muestras se incubaron durante 24 h a 37°C, y después se enfriaron en hielo durante 10 min para descargar los trofozoítos de la pared del tubo. Los trofozoítos vivos

(parásitos con forma de pera que muestran signos de movilidad de flagelos) se contaron usando una cámara de células Malassez y/o usando un hemocitómetro. Se calculó el factor de multiplicación (es decir, número de trofozoítos totales al final del experimento/número de trofozoítos en el tiempo cero), la tasa de supervivencia (es decir, (número de células vivas/número total de trofozoítos) x 100), y el porcentaje de inhibición (es decir, 100-(el número de células vivas en presencia de los compuestos ensayados/número de células vivas en el control)x100).

Purificación parcial de fracciones activas de sobrenadantes bacterianos mediante filtración en gel

Los sobrenadantes de cultivos de LjLa1 en MTYI o KM, ajustados a pH 6.0, se concentraron hasta 30 veces mediante ultrafiltración usando una unidad de filtro centrífugo Centriprep de 10 kDa (Millipore). Después de una filtración de 0.2 µm, los sobrenadantes concentrados se colocaron en una columna Sephacryl S300 16/100 (GE Healthcare) previamente equilibrada con sulfato de amonio 20 mM, pH 6.0, en una cámara fría, y se eluyeron con el mismo amortiguador a un caudal de 1.8 a 2.0 ml/min. Se obtuvieron doce fracciones de efluente de 12 ml, se concentraron 4 veces por ultrafiltración en un Centriprep de 10 kDa como se describió anteriormente, y se analizaron para determinar la inhibición *Giardia* mediante ensayos clásicos de inhibición del crecimiento *in vitro* en presencia de bilis bovina o sales biliares. Como controles, se usaron las fracciones obtenidas mediante un procesamiento similar de amortiguador de elución solo y medio de control que contenía ácido láctico (véase más arriba). La calibración de la columna se llevó a cabo con ribonucleasa A (13,700 Da) y seroalbúmina bovina (67,000 Da).

Caracterización de la o las moléculas activas en el sobrenadante de LjLa1

El tamaño molecular de la o las moléculas activas presentes en el sobrenadante bacteriano se evaluó mediante ultrafiltración usando unidades de filtro centrífugo Centriprep de 10 kDa, 30 kDa y 50 kDa. La estabilidad térmica se evaluó calentando el sobrenadante bacteriano a 90°C durante 10 minutos. La conservación de la actividad del sobrenadante de LjLa1 tras la diálisis se verificó dializando dos veces (durante 2 h y 15 h a 4°C, respectivamente) el sobrenadante contra 100 volúmenes de medio KM suplementado con FCS al 10% o contra disolución de GKN (Pérez et al., 2001) (NaCl, 8 g/l; KCl, 0.4 g/l; glucosa, 2 g/l; Na₂HPO₄, H₂O, 0.69 g/l; Na₂HPO₄, 1.57 g/l; pH 7.2 a 7.4) utilizando una membrana de diálisis Spectra-Por de MWCO de 3.5 kDa. El sobrenadante dializado se esterilizó entonces mediante filtración a través de una membrana de 0.2 µm, y se mantuvo congelado a -80°C antes de los ensayos de inhibición de *G. lamblia*.

Finalmente, la naturaleza bioquímica de las moléculas activas se determinó preincubando el sobrenadante bacteriano concentrado 5 veces obtenido por ultrafiltración (>10 kDa) con diferentes proteasas acopladas a perlas. Brevemente, se acoplaron proteinasa K (Invitrogen) y pronasa (Merck) a Sepharose™ 4B (GE Healthcare) activada con CNBr siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron cinco mililitros de sobrenadante bacteriano concentrado 5 veces o medio de control reciente concentrado 5 veces durante 6 h a temperatura ambiente en presencia de 100 µl de perlas empaquetadas acopladas previamente con 1 mg de cada proteasa. Antes de los ensayos de inhibición del crecimiento, las perlas se eliminaron mediante centrifugación (4,000 x g 5 min). Para evaluar la capacidad de las proteasas para digerir proteínas del sobrenadante bacteriano, se estimó el contenido de proteínas antes y después de la incubación con proteasas mediante SDS-PAGE después de la precipitación con ácido tricloroacético (TCA).

Medida de ácidos grasos libres

Para evaluar la presencia de ácidos grasos libres en el medio complejo que induce inhibición del crecimiento de *Giardia*, se analizaron FCS, bilis y sobrenadante de LjLa1 (LjLa1sn) para determinar el contenido de ácidos grasos no esterificados (NEFA), ya sea solos (FCS, LjLa1sn, bilis) o en combinación (FCS-bilis, FCS-LjLa1sn, bilis-LjLa1sn, FCS-bilis-LjLa1sn). La concentración de cada componente fue la del ensayo de inhibición. Se prepararon muestras (0.5 ml), y se mantuvieron en hielo antes de incubarlos durante 24 h a 37°C en presencia de 4.8×10^4 trofozoítos o sin células. Al final del período de incubación, los tubos se enfriaron en hielo, se centrifugaron a 700 x g, 10 min a temperatura ambiente, después se tomó el sobrenadante, y se congeló a -80°C antes de la medida de los NEFA. Se determinó el número de trofozoítos vivos y muertos utilizando una cámara de células Malassez. Los NEFA se cuantificaron utilizando el kit NEFA-C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usó ácido oleico como patrón, y los NEFA se expresaron como equivalentes de ácido oleico (Eq).

Ensayos de actividad de hidrolasa de sales biliares

Después de la filtración en gel, las fracciones eluidas se concentraron 10 veces por diálisis contra amortiguador de acetato de amonio 20 mM que contenía sacarosa 2 M, pH 6.0, usando una membrana de MWCO de 3.5 kDa (Spectrum Laboratories). Se utilizó glicodesoxicolato (GDC) para realizar ensayos de inhibición del crecimiento y ensayos enzimáticos. La actividad de BSH se monitorizó midiendo la liberación de glicina de la sal biliar conjugada, siguiendo el protocolo descrito por Grill et al., (2000). Brevemente, se mezclaron 100 µl de fracciones efluentes, o 1 unidad de BSH, o amortiguador de elución, con 100 µl de 2.4 g/l de GDC, y se incubó 24 h a 37°C. Los controles se realizaron en ausencia de sal biliar o preincubando fracciones de efluente con ácido yodoacético 2 mM o 30 min a 37°C. Para detener la reacción enzimática, se añadió un volumen igual de TCA al 15% (200 µl), y las proteínas

se precipitaron mediante centrifugación a 20,000 g durante 15 minutos. Se añadieron 680 µl de amortiguador de borato 0.3 M, SDS al 1%, pH 9.5, y 80 µl de disolución de ácido picrilsulfónico al 0.3% (Sigma) a 80 µl de sobrenadantes. Las mezclas se incubaron durante 30 min en la oscuridad, y se añadieron 800 µl de HCl 1 mM para detener la reacción. La concentración de glicina se midió a 416 nm usando un espectrofotómetro Uvikon 930 (Kontron Instruments). La curva patrón se estableció con glicina libre.

Análisis mediante LC/ESI-MS de modificaciones de componentes biliares por sobrenadantes de LjLa1

125 µl de medio de cultivo que contiene bilis de *G. lamblia* (KM, pH 6.0, con 2 g/l de bilis bovina) y 125 µl de sobrenadantes de LjLa1 preparados a partir de un cultivo bacteriano en medio KM suplementado con suero bovino fetal al 10%, ajustado a pH 6.0, se mezclaron y se incubaron durante la noche a 37°C. Se ensayaron dos lotes de bilis diferentes (B1 y B2) y dos sobrenadantes bacterianos diferentes (S1 y S2). Las muestras se diluyeron 4 veces en agua Milli-Q, y se sometieron a extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Oasis® HLB (30 mg de fase sólida). Después de acondicionar con 3 ml de metanol y 3 ml de agua Milli-Q, los cartuchos se cargaron con 1 ml de muestra diluida 4 veces, se lavaron con 2 ml de agua Milli-Q, y se eluyeron con 2 ml de metanol. Las fracciones eluidas se secaron a vacío y se resuspendieron en 500 µl de agua Milli-Q/acetonitrilo 90:10 (v/v). Cinco µl de cada muestra resuspendida se analizaron mediante LC/ESI-MS en un sistema cromatográfico Ultimate U3000 (Thermo) conectado a un espectrómetro de masas Q-STAR Pulsar Qq-TOF equipado con una fuente de pulverización de iones (AB Sciex). La separación por LC se logró en una microcolumna Interchrom Strategy C18-2 (5 µm, 150 x 1 mm, 100 Å, Interchim). El gradiente de elución fue 10% de fase móvil B (acetonitrilo) hasta 70% de B frente a la fase móvil A (formiato de amonio/ácido fórmico 5 mM, pH 6) durante 45 min, a un caudal de 40 µl/min. Los datos de MS se adquirieron en modo negativo, en el intervalo *m/z* 250-1200. Cada experimento de LC/ESI-MS se realizó dos veces. Asimismo se realizaron en cada muestra experimentos de LC/ESI-MS/MS dependientes de datos, alternando MS de barrido completo de 1 segundo seguido de dos disociaciones inducidas por colisión de iones de producto (CID) de 2 segundos de los iones principales detectados en la primera etapa, utilizando un voltaje de colisión de -50 V.

Cada uno de los datos sin procesar de LC/ESI-MS se convirtió en Network Commun Data Form (NetCDF) utilizando la herramienta de traducción proporcionada por AB Sciex. Los datos se procesaron con XCMS (Smith et al. 2006), un software implementado en el entorno R disponible gratuitamente (www.r-project.org), que permite la alineación automática del tiempo de retención, la filtración adaptada, la detección de picos, y la coincidencia de picos.

Precipitación de proteínas

Se añadieron 0.1% de lauroil sarcosinato de sodio (NLS, Sigma) a los sobrenadantes bacterianos. Después de mezclar, se añadió TCA (ácido tricloroacético) hasta una concentración final de 7.5%, y la disolución se precipitó en hielo durante la noche. El precipitado mixto de proteína-detergente se recogió mediante centrifugación (10,000 x g, 10 min, 4°C). El sobrenadante se eliminó cuidadosamente, y el pelete se lavó dos veces con 2 ml de tetrahidrofurano preenfriado (Sigma). Finalmente, el pelete se disolvió en 0.4 ml de disolución de extracción (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4%, Tris(carboxietil)fosfina 5 mM) (Rabilloud et al., 2009).

Análisis proteómico del sobrenadante de LjLa1

El sobrenadante de LjLa1 precipitado con TCA se resuspendió en urea 8 M en TEAB (bicarbonato de trietilamonio) 20 mM, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente (RT) con DTT (ditiotreitól) 20 mM, después con IAA (iodoacetamida) 50 mM, y se incubó durante otra hora a RT en la oscuridad. La muestra se incubó con 0.05 UA de endoproteinasa Lys-C (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japón) durante 18 h a RT. La digestión con tripsina (Promega) se realizó con 2 µg de enzima durante 4 h a RT, y se terminó con TFA (ácido trifluoroacético), concentración final de 0.5%. La muestra se hizo pasar secuencialmente a través de dos microcolumnas caseras Poros Oligo-R3 (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA) empaquetadas (+1 cm) en puntas p200 sobre un tapón de material C18 de 3MM. La resina cargada se lavó con 100 µl de TFA al 0.1%, y los péptidos se eluyeron con 100 µl de acetonitrilo al 70% (ACN)/TFA al 0.1%, después con 20 µl de ACN al 100%. La muestra se desaló, se secó, se resuspendió en 50% de ACN, y se recogió el 10% para análisis de aminoácidos utilizando un analizador de aminoácidos Biochrom 30 (Biochrom, Cambridge, U.K.), después se secó y se almacenó a -80°C nuevamente hasta el análisis.

Las muestras (3 µg por ciclo) se analizaron mediante un sistema EASY-nano LC (Proxeon Biosystems, Odense, Dinamarca) acoplado en línea a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Waltham, USA). Los péptidos se cargaron en un emisor de sílice fundida de 18 cm (75 µm de diámetro interno) empaquetados en nuestras instalaciones con una columna capilar de fase inversa ReproSil-Pur C18-AQ de resina de 3 µm (Dr. Maisch GmbH, Alemania), y se eluyeron usando un gradiente desde 100% de fase A (ácido fórmico al 0.1%) hasta 35% de fase B (ácido fórmico al 0.1%, acetonitrilo al 95%) durante 180 min, 35% hasta 100% de fase B durante 5 min, y 100% de fase B durante 8 min (un total de 23 min a 250 nl/min). Después de cada experimento, la columna se lavó con 90% de fase B, y se reequilibró con fase A. Los espectros de masas se adquirieron en modo positivo aplicando adquisición de espectros de masas en tándem (MS/MS) y barrido de MS exploratorio automático dependiente de datos. Cada barrido de MS en el Orbitrap (intervalo de masas de *m/z* de 400-1800 y resolución de

100,000) fue seguido de MS/MS de los quince iones más intensos en el LTQ. La fragmentación en el LTQ se realizó mediante disociación inducida por colisión, y los iones secuenciados seleccionados se excluyeron dinámicamente durante 25 s. Los datos sin procesar se visualizaron en Xcalibur v.2.1 (Thermo Scientific, Waltham, USA), y el procesamiento de datos se realizó utilizando Proteome Discoverer v.1.3 (Thermo Scientific, Waltham, USA). Los archivos sin procesar generados se sometieron a búsqueda utilizando Proteome Discoverer con un algoritmo interno Mascot v.2.3 frente a la base de datos de proteínas predichas a partir de los aislados NCC533 y FI9785 de *L. johnsonii* y el profago Lj965 de *L. johnsonii*. Las proteínas contaminantes (varios tipos de queratinas humanas, BSA, y tripsina porcina) asimismo se añadieron a la base de datos, y todas las proteínas contaminantes identificadas se eliminaron manualmente de las listas de resultados. Las búsquedas se realizaron con los siguientes parámetros: precisión de MS 10 ppm, precisión de MS/MS 0.6 Da, digestión con tripsina con una escisión perdida permitida, modificación de carbamidometilo fija de cisteína y modificación variable de metionina oxidada y acetilación de proteína N-terminal. El número de proteínas, grupos de proteínas y el número de péptidos se filtraron para tasas de descubrimiento falso (FDR) menores que 1%, y solo se aceptaron para la identificación los péptidos con rango 1 y un mínimo de 2 péptidos por proteína utilizando Proteome Discoverer (Charneau *et al.*, 2007); Queiroz *et al.* 2013).

Ejemplo 2: el efecto inhibitor del sobrenadante de *L. johnsonii* La1 depende de la bilis bovina, y más específicamente de las sales biliares

La mayoría de los medios descritos anteriormente para apoyar el crecimiento de *G. lamblia* contienen normalmente bilis como suministro para los requisitos de colesterol y ácidos grasos del parásito (Farthing *et al.*, 1985, Gillin *et al.*, 1986, Halliday *et al.*, 1995).

En nuestras manos, el crecimiento de trofozoítos de *G. lamblia* se puede observar en un medio habitual (KM-FCS) en ausencia de bilis bovina. Además, las concentraciones de bilis recomendadas (0.75 mg/ml, Perez *et al.*, 2001) parecieron afectar el crecimiento de los trofozoítos cuando se añadieron al KM-FCS habitual (Figura 1A). Curiosamente, el efecto inhibitor de LjLa1 se observó solo en presencia de bilis. No se pudo observar ningún efecto inhibitor por el sobrenadante en ausencia de bilis bovina, incluso después de 24 h de cultivo (Figura 1A). En presencia de 0.75 g/l de bilis bovina (Perez *et al.*, 2001), el crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* se vio ligeramente afectado por el sobrenadante bacteriano después de 10 horas de contacto, pero se vio afectado en gran medida después de 24 horas de contacto ($9 \cdot 10^4$ y $1 \cdot 10^4$ trofozoítos/ml, respectivamente, Figura 1A). De este modo, el período de tiempo de incubación de 24 h se mantuvo para todos los ensayos de inhibición del crecimiento posteriores.

Los efectos inhibidores máximos del sobrenadante de LjLa1 sobre el crecimiento del parásito se observaron en presencia de 0.6 g/l de bilis bovina completa o en presencia de 0.032 g/l de sales biliares (96.3% y 75% de inhibición, respectivamente, en comparación con controles que contenían cantidad similar de ácido láctico y bilis o sales biliares, Figura 1B). Se observaron efectos similares utilizando dos aislados de *G. lamblia* (WB y HP1), dos orígenes comerciales diferentes de bilis bovina, y dos medios diferentes compatibles con el crecimiento de bacterias y parásitos: MTY1 (Perez *et al.*, 2001) y KM-10% de FCS (datos no mostrados). De este modo, los ensayos de inhibición *in vitro* posteriores se llevaron a cabo utilizando 0.6 g/l de bilis bovina.

Ejemplo 3: caracterización de la actividad inhibitora

Para caracterizar bioquímicamente los compuestos inhibidores presentes en el sobrenadante de LjLa1, este sobrenadante se trató con enzimas inmovilizadas antes de entrar en contacto con los parásitos. La inhibición del crecimiento de parásitos fue abolida por los tratamientos del sobrenadante con proteinasa K y pronasa, lo que sugiere la participación de factor o factores inhibidores de naturaleza peptídica (Figura 2A). El tratamiento térmico asimismo condujo a la inactivación de las propiedades inhibitoras del sobrenadante bacteriano (Figura 2A). Además, en un intervalo de pH similar al experimentado por *G. lamblia in vivo* (Biagini *et al.*, 2001), se notó una fuerte influencia del pH en la reacción inhibitora, produciéndose la inhibición más alta a pH 6.2 (Figura 2B).

Además, como Pridmore *et al.* (2004) demostraron que la actividad anti-*Salmonella* LjLa1 está mediada por la molécula tóxica de peróxido de hidrógeno H_2O_2 y puede ser abolida por un pretratamiento con catalasa, verificamos si el tratamiento del sobrenadante de LjLa1 con catalasa podría prevenir su efecto anti-*Giardia*. Como se puede ver en la figura 2A, el pretratamiento con catalasa solo afectó ligeramente la actividad inhibitora del sobrenadante de LjLa1 en *G. lamblia* (Figura 2A), invalidando el papel de H_2O_2 en la inhibición del crecimiento de *Giardia*.

Ejemplo 4: la inhibición del crecimiento de *Giardia* por el sobrenadante de LjLa1 no se debe a los ácidos grasos libres

Para evaluar si la inhibición del crecimiento de *G. lamblia* por el sobrenadante de LjLa1 podría deberse a ácidos grasos libres tóxicos como se demostró en informes anteriores (Rohrer *et al.* 1986), se analizaron FCS, bilis y sobrenadante de LjLa1 para determinar el contenido de ácidos grasos no esterificados (NEFA), ya sea solos o en combinación, utilizando la metodología NEFA-C (WAKO Diagnostics). Las diferentes muestras se incubaron durante 24 h a 37°C con o sin trofozoítos de *G. lamblia*, y los sobrenadantes celulares se analizaron para determinar

los NEFA. Se determinó la supervivencia y el crecimiento de los parásitos en esas diferentes condiciones.

La siguiente tabla 1 representa el análisis de la participación de ácidos grasos no esterificados en la inhibición de *Giardia*. Los diferentes componentes del medio de cultivo de *Giardia* (FCS al 10% y/o bilis 0.5 g/l), así como LjLa1sn, se analizaron solos o en combinación para determinar el contenido de NEFA después de 24 h de incubación a 37°C. La incubación se realizó con o sin trofozoítos de *G. lamblia* ($9.6 \times 10^4/\text{ml}$). Se determinaron la supervivencia y la multiplicación de *G. lamblia* después de 24 h en esos diferentes medios. La multiplicación de parásitos se expresó como el número de trofozoítos totales después de 24 h de incubación/número de trofozoítos en el tiempo cero de incubación (es decir, factor de multiplicación). La tasa de supervivencia de los trofozoítos después de 24 h de incubación se expresó como (número de células vivas/número total de células) $\times 100$. $\pm$ SD (triplicado).

Los sobrenadantes con FCS, LjLa1sn o bilis sola mostraron concentraciones de NEFA de 40.9, 36.3 y 4.5 μM , respectivamente (tabla 1).

Tabla 1

Medio de incubación	NEFA (μM Eq)	Factor de multiplicación	Tasa de supervivencia (%)
KM	0	1.1	14.3
KM + FCS	40.9	3.3	89.8
KM + bilis	4.5	0.7	0
KM + LjLa1sn	36.4	1.2	71.6
KM + FCS + bilis	95.4	2.3	93.8
KM + FCS + LjLa1sn	68.2	2.1	87.5
KM + bilis + LjLa1sn	50.0	0.8	0
KM + FCS + bilis + LjLa1sn	140.9	0.8	0

La cantidad de los NEFA se duplicó (95.4 μM) mediante la co-incubación de la bilis con suero, lo que sugiere la liberación enzimática de los NEFA. Sin embargo, se encontraron cantidades iguales en el tiempo cero y en el tiempo 24 h de la co-incubación (no representado), lo que indica que los ácidos grasos no se liberaron de una manera dependiente del tiempo. Se planteó la hipótesis de que la gran cantidad de los NEFA podría resultar de una acción similar a la de un detergente de la bilis sobre los lípidos séricos, posiblemente mejorando la accesibilidad de los NEFA a los reactivos del kit NEFA-C. La mayor cantidad de los NEFA (140.9 μM) se midió tras la co-incubación de FCS con bilis y LjLa1sn, como podría esperarse sumando sus respectivos contenidos de NEFA. La incubación con *G. lamblia* no tuvo un efecto notable sobre el contenido de los NEFA de las diversas muestras (datos no mostrados).

Se observó crecimiento normal de *G. lamblia* (factor de multiplicación: 3.34, tabla 1) en presencia de FCS al 10% solo. Los trofozoítos no sobrevivieron en medio KM que contenía solo bilis, mientras que la mayoría de ellos (~70%) todavía estaban vivos aunque no se desarrollaron cuando se incubaron en KM con sobrenadante de LjLa1, muy probablemente debido a la baja concentración de FCS en el sobrenadante de LjLa1. Sorprendentemente, la supervivencia de los trofozoítos se abolió tras la adición de bilis a LjLa1sn, aunque está presente la misma concentración de FCS, lo que indica la presencia de elementos inhibidores. Al comparar los contenidos de NEFA de los diferentes medios, parecía que los NEFA difícilmente podrían ser responsables de la muerte de los parásitos. De hecho, se encontraron más NEFA en los medios KM + FCS + bilis o KM + FCS + LjLa1sn (95.4 y 68.2 μM de los NEFA respectivamente), que permitieron la supervivencia de los parásitos, que en el medio KM + bilis + LjLa1sn (50.0 μM de los NEFA), que indujo la muerte de todos los parásitos. Esto indicó que la adición concomitante de bilis y sobrenadante bacteriano en lugar de un alto nivel de NEFA es letal para *Giardia*, y es responsable del efecto letal observado en presencia de FCS, bilis y sobrenadante de LjLa1.

Ejemplo 5: caracterización de la actividad inhibidora del sobrenadante de LjLa1

La actividad inhibidora del sobrenadante de LjLa1 se debe a un factor o factores de masa molar de ~ 30 kDa

Los experimentos de fraccionamiento indicaron que la actividad inhibidora en el sobrenadante de LjLa1 se debió a molécula o moléculas mayores de 10 kDa, ya que la fracción >10 mostró una alta actividad inhibidora de *G. lamblia* en comparación con la fracción <10 kDa (Figura 2C). Al realizar un fraccionamiento umbral de 30 kDa, encontramos que la actividad inhibidora se concentraba principalmente en la fracción >30 kDa (que induce el 66% de inhibición del crecimiento de *Giardia*, Figura 2C); sin embargo, asimismo se observó un efecto inhibidor moderado (~ 40%) con la fracción <30 kDa, lo que nos llevó a proponer que la o las masas molares de la o las moléculas activas están cerca de este umbral. De acuerdo con esto, el fraccionamiento umbral de 50 kDa del LjLa1sn no pudo segregar la actividad inhibidora, es decir, el 50% y el 48% de la inhibición del crecimiento de *Giardia* fueron inducidos por las fracciones <50 kDa y >50 kDa, respectivamente (Figura 2C), lo que indica que la masa molar de la proteína o proteínas inhibidoras es menor que 50 kDa.

Los compuestos pequeños no están involucrados principalmente en la actividad inhibitoria de LjLa1sn

Se ha dado a conocer que la o las moléculas menores que 1 kDa (Perez et al., 2001) estarían involucradas en la actividad giardiacida del sobrenadante de LjLa1, en contradicción con nuestros hallazgos de una molécula o moléculas ≥ 30 kDa. Se ha comprobado la posibilidad de que la diálisis contra el amortiguador GKN, como se usa en el informe de Perez, puede inhibir de alguna manera la actividad. Se comprobaron varios puntos. Al principio, debido a que el pH del amortiguador GKN es 7.4 y la actividad inhibitoria de LjLa1sn se inactiva a un pH superior a 7.0 (figura 2B), se comprobó el pH del medio KM después de la suplementación con FCS al 10% y GKN al 25%. Se encontró que el pH aumentó a 6.5, por lo que no se esperaba que inactivara el sobrenadante de LjLa1 (figura 2B). En segundo lugar, para evaluar si el o los componentes pequeños podrían estar implicados en el efecto inhibitor, se dializó el sobrenadante bacteriano utilizando una membrana de corte de peso molecular de 3.5 kDa tanto frente a KM con 10% de FCS como a amortiguador GKN. Como puede verse en la siguiente tabla 2, la actividad de eliminación de parásitos del sobrenadante de LjLa1 en presencia de bilis se recuperó completamente después de la diálisis, cualquiera que sea la disolución de diálisis. La tabla 2 representa que la diálisis a través de una membrana de corte de bajo MW no inactiva la actividad inhibitoria del sobrenadante de LjLa1 (LjLa1sn). Medio KM-FCS, bilis (0.5 g/l) y LjLa1sn, ya sea solos o en combinación, se dializaron frente a amortiguador GKN o KM-FCS, y después se analizaron para determinar el crecimiento de trofozoítos de *G. lamblia*. Los valores son la media de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 2

	KM + FCS	KM + FCS + GKN	KM + FCS + LjLa1sn	KM + FCS + LjLa1sn dializado contra KM-FCS	KM + FCS + LjLa1sn dializado contra GKN
Factor de multiplicación	3.82	2.60	3.24	3.68	2.44
Tasa de supervivencia (%)	93.7	92.3	88.3	90.2	89.3
		KM + FCS + bilis	KM + FCS + bilis + LjLa1sn	KM + FCS + bilis + LjLa1sn dializado contra KM-FCS	KM + FCS + bilis + LjLa1sn dializado contra GKN
Factor de multiplicación		2.28	1.16	1.46	0.8
Tasa de supervivencia (%)		92.9	0	0	0

Esto indica, por un lado, que con la diálisis no se pierde ningún elemento crucial para la actividad, y por otro lado, que el amortiguador GKN no inhibe la actividad del sobrenadante de LjLa1. Además, se puede observar en la tabla 2 que la adición de amortiguador de GKN al 25% a KM-FCS no afecta la supervivencia de los parásitos, pero ralentiza su desarrollo (tasa de multiplicación de 2.60 en presencia de GKN frente a 3.82 en ausencia de GKN).

Ejemplo 6: impacto del sobrenadante de LjLa1 en la composición de la bilis

Dado que la adición concomitante de bilis y LjLa1sn al medio de cultivo conduce a la inhibición del crecimiento de *G. lamblia*, evaluamos si la composición de la bilis podría ser modificada por el sobrenadante de LjLa1. La composición de la bilis después de 24 h de incubación con LjLa1sn se investigó mediante espectrometría de masas (Figuras 3^a-B). Las moléculas impactadas se identificaron por su patrón de fragmentación MS/MS. La comparación de los perfiles de sales biliares mostró una disminución de las sales conjugadas (GC, TC, GDC, TDC, GCDC, TCDC) a favor de las sales no conjugadas. El colato y el desoxicolato fueron las sales no conjugadas principalmente mejoradas estadísticamente cuando la bilis se incubó con sobrenadante de LjLa1 (figura 4), y en una proporción menor, quenodesoxicolato. Estas modificaciones no se observaron en presencia de sobrenadante bacteriano tratado térmicamente (figura 3C).

Ejemplo 7: impacto de las sales biliares desconjugadas en el crecimiento de trofozoítos de *G. lamblia*

Los efectos inhibitorios con respecto al crecimiento de *G. lamblia* de sales biliares puras (colato, desoxicolato y quenodesoxicolato) conjugadas con glicina o taurina, o sus contrapartes desconjugadas, se investigaron en presencia o ausencia de sobrenadante de LjLa1 (tabla 3, figura 5). En ausencia de LjLa1sn, las sales conjugadas con glicilo o taurilo, así como el colato desconjugado, no mostraron toxicidad aparente a las concentraciones evaluadas (valores de $IC_{50} > 500$ μ M). Por el contrario, las sales desconjugadas DC y CDC exhibieron efectos inhibitorios sobre el crecimiento de trofozoítos con valores de IC_{50} de 132 μ M (DC) y 147 μ M (CDC) respectivamente. Curiosamente, en presencia de sobrenadante de LjLa1, los valores de IC_{50} de las sales biliares conjugadas cayeron hasta un intervalo de valores similar a los medidos para sus contrapartes desconjugadas puras, es decir, 104 μ M (GDC), 79 μ M (TDC), 110 μ M (GCDC), y 115 μ M (TCDC) (tabla 3 y figura 5).

La siguiente tabla 3 muestra que las sales biliares conjugadas en asociación con el sobrenadante de LjLa1

(LjLa1sn), así como las sales biliares desconjugadas previenen el crecimiento de *G. lamblia*. Diversas concentraciones de sales biliares C, DC y CDC conjugadas con taurina y glicina y no conjugadas se analizaron para determinar la inhibición del crecimiento de trofozoitos de *G. lamblia* en KM-FCS en presencia o ausencia de LjLa1sn (medio de cultivo bacteriano agotado). Los valores de IC₅₀ se determinaron a partir de curvas de respuesta al fármaco, y se expresaron como media $\pm$ SD de por lo menos tres experimentos independientes.

Tabla 3

			Con medio de cultivo solamente	Con medio de cultivo bacteriano gastado
			IC ₅₀ $\pm$ SD (μ M)	IC ₅₀ $\pm$ SD (μ M)
C y derivados	C	Colato	>400	>400
	GC	Glicocolato	>400	>400
	TC	Taurocolato	>400	>400
DC y derivados	DC	Desoxicolato	132 $\pm$ 12,7	117 $\pm$ 12,7
	GDC	Glicodesoxicolato	>400	104 $\pm$ 12,7
	TDC	Taurodesoxicolato	>400	79 $\pm$ 17,3
CDC y derivados	CDC	Quenodesoxicolato	147 $\pm$ 14,5	118 $\pm$ 21,7
	GCDC	Glicoquenodesoxicolato	>400	110 $\pm$ 10,6
	TCDC	Tauroquenodesoxicolato	>400	115 $\pm$ 7,7
	FA	Ácido fusídico	26 $\pm$ 3,7	nd

Estos resultados sugirieron que un proceso de desconjugación mediado por componente o componentes de LjLa1sn y que produce sales biliares desconjugadas podría ser el responsable del efecto inhibitorio de la asociación de bilis y LjLa1sn. Tal hipótesis está en línea con la observación anterior de que el ácido fusídico, un antibiótico con una estructura química similar a una sal biliar, es tóxico para *Giardia* (ver la tabla 3, valor de IC₅₀ = 26 μ M), a menos que esté conjugado con taurina o glicina (Farthing et al., 1986).

Ejemplo 8: participación potencial de hidrolasa o hidrolasas de sales biliares de *L. Johnsonii* La1 en la inhibición de *Giardia* mediada por bilis, y coelución de la actividad de tipo a BSH y la actividad inhibitoria de *Giardia* en cromatografía de fraccionamiento por tamaños del sobrenadante de LjLa1

Es conocido que el proceso de desconjugación de sales biliares está mediado por 3-alfa, 7-alfa, 12-alfa-trihidroxi-5-beta-colan-24-oilglicina/taurina amidohidrolasas (EC 3.5.1.24), asimismo denominadas coloilglicina/taurina hidrolasas o hidrolasas de ácidos biliares conjugados (CBAH) o hidrolasas de sales biliares (BSH). Estas enzimas actúan sobre enlaces carbono-nitrógeno distintos de los enlaces peptídicos, específicamente en amidas lineales, liberando glicina y taurina de las sales biliares conjugadas. En el genoma de *L. johnsonii*, se han predicho tres genes que codifican enzimas similares a BSH (genes LJ0056 (BSH-56), LJ1147 (BSH-47) y LJ1412 (BSH-12)). Asimismo se predicen como proteínas segregadas por SecretomeP, con tamaños completos teóricos de 34.9 kDa, 36.3 kDa y 36.6 kDa, y tamaños segregados de 29.8 kDa, 31.0 kDa y 31.3 kDa (datos no representados).

Para evaluar la hipótesis de la participación de la o las BSH bacterianas en la actividad inhibitoria del crecimiento de *G. lamblia* por LjLa1sn, el sobrenadante bacteriano se fraccionó mediante cromatografía de filtración en gel en columna Sephacryl S300 16/100, y las fracciones eluidas se ensayaron para determinar la inhibición de parásitos y la actividad desconjugante de sales biliares.

En la figura 5A se muestra un perfil de elución típico. Se ensayaron doce fracciones eluidas (figura 5A) para determinar la inhibición del crecimiento de *G. lamblia* (figura 5C), y las más activas se analizaron adicionalmente para determinar la actividad de tipo BSH (figura 5B). La mayor actividad inhibitoria se recuperó de las fracciones que contenían proteínas con un peso molecular entre 13.7 kDa y 67 kDa (Figura 5A). Esas fracciones exhibieron actividad similar a BSH (Figura 5C), según se mide por la liberación de glicina de GDCA. En nuestras condiciones experimentales, 1 unidad de la BSH de *Clostridium perfringens* comercial indujo la liberación de glicina 0.76 mM a partir de GDC 2.5 mM en 24 horas. Se observó la elución concomitante de las actividades inhibitoria y de BSH dentro de un intervalo de peso molecular similar con sobrenadantes de LjLa1 de diferentes lotes de cultivo. Nuestros intentos de purificar aún más los elementos responsables de la actividad inhibitoria y/o actividad de tipo BSH mediante la combinación de etapas de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatoenfoco no tuvieron éxito, con una rápida pérdida de las actividades.

Ejemplo 9: la desconjugación de tauril- y glicil-DC y -CDC por BSH de *Clostridium perfringens* es tóxica para *G. lamblia*

Para evaluar la capacidad de las enzimas BSH para promover el efecto anti-*Giardia* mediado por bilis, se estudió BSH procedente de las bacterias *C. perfringens* para determinar la inhibición del crecimiento de *G. lamblia* en presencia de bilis o sales biliares conjugadas puras. Como se señaló anteriormente (tabla 3), las sales biliares conjugadas con glicina o taurina, TDC, TCDC, GDC y GCDC, no tienen actividad inhibitoria sobre el crecimiento

de *G. lamblia* en medio de cultivo KM-FCS. Por el contrario, la adición de 2 unidades de BSH de *C. perfringens* al cultivo en presencia de esas sales biliares condujo a una notable inhibición del crecimiento de parásitos dentro de las 24 h del ensayo, con intervalos de inhibición de 95 a 100%, dependiendo de la sal biliar conjugada ensayada (figura 6). La inactivación por calor de BSH bacteriana (100°C, 5 min) antes de su adición al cultivo de parásitos llevó a una caída drástica de su actividad anti-*Giardia* (menos del 10% de inhibición del crecimiento dependiendo de las sales biliares conjugadas ensayadas, figura 6), lo que indica que la actividad inhibidora de BSH depende de su actividad enzimática.

Ejemplo 10: identificación espectrométrica de masas de dos enzimas similares a BSH en LjLa1sn.

Después se investigó si las enzimas similares a BSH anotadas del genoma de *L. johnsonii* La1, y que SecretomeP predice que se segregan, se liberan de hecho en el medio extracelular. Se realizó un análisis proteómico basado en espectrometría de masas de alta resolución de las proteínas extracelulares de LjLa1. 3 µg de proteínas de sobrenadantes de LjLa1 de dos réplicas de cultivos independientes permitieron la identificación de más de un centenar de grupos de proteínas segregadas (datos no mostrados). Entre ellas, dos de las tres BSH predichas se identificaron claramente en ambas réplicas: LJ1412 (gi|41583570) y LJ1147 (gi|41583360). La siguiente tabla 4 muestra la identificación de dos hidrolasas de sales biliares conjugadas de *Lactobacillus johnsonii* NCC533 por fragmentación de péptidos MS/MS usando búsqueda rigurosa MASCOT.

Tabla 4

Número de acceso ^a	Puntuación ^b	Cov. (%) ^c	péptidos únicos	péptidos totales	PSM	Secuencia de iones peptídicos ^d (con por lo menos una puntuación de iones peptídicos >50)	carga ^e	ion peptídico (m/z)	Masa teór. (kDa) ^f	pI teór. ^g
réplica experimental 1										
gi 41583570	162	12,58	2	2	5	NLANYSNIAPAQPK AHSPPQGNNELSSVTNTYFHILHSVEQPK	2 4	750,9 759,1	36,6	5,2
gi 41583360	39	12,92	3	3	3	GLGIAGLNFTGPGK DLPVTTLHWLMGDK NTLVPNADINLYSR	2 2 2	651,4 813,4 795,4	36,3	4,9
réplica experimental 2										
gi 41583570	83	12,58	2	2	3	NLANYSNIAPAQPK AHSPPQGNNELSSVTNTYFHILHSVEQPK	2 4	750,9 759,1	36,6	5,2
gi 41583360	77	8,62	2	2	3	GLGIAGLNFTGPGK NTLVPNADINLYSR	2 2	651,4 795,4	36,3	4,9

^a Número de acceso en la base de datos de proteínas del NCBI. Todos los números de acceso se refieren a secuencias de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533;

^b Puntuación Mowse basada en probabilidades del software MASCOT que evalúa si los péptidos sometidos a la búsqueda son los mismos que los encontrados en la base de datos originada por la digestión *in silico* de una proteína conocida;

^c La cobertura es el porcentaje de secuencia de proteína predicha cubierta por péptidos emparejados a través de MASCOT;

^d Secuencias peptídicas identificadas mediante MASCOT siguiendo las masas de péptidos experimentales después de la fragmentación de iones parentales. Se requería que por lo menos un espectro se correspondiera con una puntuación de 50 o mejor para considerar el acierto.

^e Se analizaron los iones cargados de dos a cinco veces de péptidos seleccionados.

^f Masas moleculares teóricas de proteínas calculadas a partir de secuencias de aminoácidos;

^g Puntos isoelectrónicos teóricos de proteínas calculados a partir de secuencias de aminoácidos;

Ejemplo 11: medida de la inhibición de *G. lamblia* por citometría de flujo

El efecto inhibidor de *L. johnsonii* sobre *G. lamblia* se midió mediante citometría de flujo, como se muestra en las figuras 7A a 7E. Se usó yoduro de propidio, un agente intercalante que fluoresce cuando se excita a 540 nm, para evaluar la viabilidad celular de *Giardia* para confirmar los resultados del hemocitómetro. Estos resultados mostraron que, analizados por separado, ni *LjLa1sn* ni la bilis bovina (0,6 g/l) tienen actividad de lisis celular. Sin embargo, en presencia tanto de *LjLa1sn* como de bilis bovina hay un cambio de fluorescencia (figura 7E) que evidencia que la bilis tiene un efecto citotóxico sobre los trofozoítos de *Giardia* (figura 7D; figura 7E). La citometría de flujo nos permitió analizar una mayor cantidad de células, y puede usarse de forma rutinaria como un método de medida de la inhibición de *G. lamblia*. Además, esta técnica se ha utilizado para otros sobrenadantes de lactobacilos (datos no mostrados).

Ejemplo 12: identificación de cepas de lactobacilos anti-Giardiasis

Se identificó el efecto inhibidor sobre el crecimiento de *G. lamblia* de diferentes cepas de lactobacilos (ver la tabla 5). El sobrenadante bacteriano se incubó conjuntamente durante 24 h a 37°C con cultivos de trofozoítos de *Giardia* (triplicados), con o sin bilis bovina (0,6 g/l). Se identificaron diferentes especies de lactobacilos como potentes inhibidores del crecimiento de *Giardia lamblia*, tales como *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*. Las 14 cepas de lactobacilos mostraron efectos inhibidores significativos (pruebas estadísticas de ANOVA) en presencia de bilis (figura 8). Ninguno de los sobrenadantes tuvo efecto inhibidor sin bilis bovina, lo que confirma que el efecto giardiasis es dependiente de la bilis. La tabla 5 indica las correspondientes referencias internas y oficiales de las cepas bacterianas, y referencias bibliográficas.

Tabla 5

Cepa bacteriana	Referencia oficial				Publicación
	ATCC	CIP (*)	LMG (*)	CNCM (*)	
<i>L. johnsonii</i>				I-4885	Fujisawa et al., 1992
<i>L. gasseri</i>	33323	102991	9203 T		Lauer y Kandler, 1980
<i>L. johnsonii</i>		103614			Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii</i>		103786			Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii</i>	33200	103620	9436 T		Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii</i>	332	103652	11468		Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii</i>	11506	103653	9437		Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii</i>		103654			Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii</i>		103781			Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii</i>		103782			Fujisawa et al., 1992
<i>L. johnsonii La1</i>				NCC533	Pridmore et al. (2004)
<i>L. gasseri</i>			11413		
<i>L. gasseri</i>	29601		11414	1-4884	
<i>L. acidophilus</i> N FM	700396				

(*) CIP: Colección de l'Institut Pasteur, Francia
 LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universidad de Gante, Bélgica
 CNCM: Collection Nationale de Microorganismes, Institut Pasteur, Francia
 ATCC: American Type Tissue Collection, USA

Ejemplo 13: expresión heteróloga de BSH de *LjLa1* en *E. coli*

Para estudiar las propiedades de las BSH de *LjLa1*, clonamos los genes de BSH en un vector pStaby (StabyExpress, Delphigenetics) para purificar las BSH mediante el sistema His-Tag. Las células de expresión de *E. coli* (*E. coli* SE, Delphigenetics) se transformaron entonces. La proteína BSH-47 recombinante se produjo en células de *E. coli* SE, y se purificó utilizando un sistema His-Tag (columna Sephadex Ni-NTA, GE Healthcare). La actividad de la BSH-47 recombinante se evaluó utilizando agar LB taurodesoxicólico (0.3%) y glicodesoxicólico (0.3%) (Chae et al 2013). Después de 48 h de incubación a 37°C, observamos que la BSH-47 recombinante es tauroespecífica (figura 9). Además, el efecto de BSH-47 recombinante de *LjLa1* se ha estudiado en cultivos de trofozoítos de *Giardia*, en presencia o no de bilis bovina (0,06 g/l). Los resultados muestran que la BSH-47 recombinante (0,96 U, designando "U" unidades enzimáticas) exhibe un efecto inhibidor, el nivel de este efecto inhibidor es equivalente al efecto inhibidor de BSH de *C. perfringens* (1U) (figura 10).

Ejemplo 14: caracterización de la actividad inhibidora de BSH-47 y BSH-56 de *LjLa1* in vitro

Los efectos de BSH-47 y BSH-56 recombinantes de *LjLa1* se estudiaron en cultivos de trofozoítos de *G. lamblia* en presencia o ausencia de bilis bovina (0,06 g/l). BSH-56 recombinante se produjo según el procedimiento descrito para la producción de BSH-47, tal como se describe en el ejemplo 13. Se ensayaron varias concentraciones de

BSH en el intervalo de 0,0001 µg/ml a 10 µg/ml. Curiosamente, tanto BSH-47 (figura 11A) como BSH-56 (figura 11B) exhiben fuertes efectos inhibidores. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos con BSH de *C. perfringens* comercial (ejemplo 8) (figura 10). Como era de esperar, no se observó ningún efecto inhibidor sin bilis bovina.

Actividades específicas:

Experimentos anteriores nos permitieron determinar la especificidad por el sustrato de BSH-47 y BSH-56 recién purificadas, y se habían determinado sus actividades específicas. BSH-47 es capaz de desconjugar sales biliares tauroespecíficas, mientras que BSH-56 es capaz de desconjugar sales biliares tanto tauroespecíficas como glicoespecíficas.

Tabla 6

	Actividad específica (µmol de glicina/5 min a 37°C/mg de proteína)	Actividad específica (µmol de taurina/5 min a 37°C/mg de proteína)
<i>C. perfringens</i> BSH	0,690	0,150
BSH-47	0,066	0,717
BSH-56	0,536	2,604

Ejemplo 15: efecto *in vivo* de *L. gasseri* CNCM 1-4884 contra *G. lamblia*

Las cepas de *L. johnsonii* La1 y *L. gasseri* CNCM 1-4884 (*L. gasseri* CNCM 1-4884 asimismo se denomina como *L. gasseri* ATCC29601 en la figura 8 y en la tabla 5) se administraron diariamente por sonda intragástrica (5×10^8 CFU) a ratones neonatos desde el día 5 hasta el día 15 (día del sacrificio). Los ratones se expusieron a trofozoítos el día 10 mediante sonda intragástrica (1×10^5 trofozoítos), y entonces se sacrificaron el día 15. Los experimentos preliminares nos permiten determinar que hay un pico en la tasa de infección por *Giardia* 5 días después de la inoculación (datos no mostrados). La presencia de trofozoítos vivos en el intestino delgado es un marcador de infección por *Giardia*. Los ratones se dividieron en tres grupos, con un mínimo de 8 animales por grupo. Observamos una reducción significativa ($p < 0,05$) en la carga parasitaria en el intestino delgado en grupos tratados con *L. gasseri* CNCM 1-4884 comparado con animales de control a los que se les administró PBS (figura 12A). Curiosamente, *L. gasseri* CNCM 1-4884 fue más eficiente reduciendo el número de trofozoítos que *L. johnsonii* La1. De acuerdo con estas observaciones, el recuento de quistes en el intestino grueso mostró una reducción significativa ($p < 0,05$) en grupos tratados con *L. gasseri* CNCM 1-4884 en comparación con los controles, mientras que no se observó una reducción significativa en el grupo tratado con *L. johnsonii* La1 (figura 12B).

Ejemplo 16: efecto *in vivo* de BSH-47 contra *G. lamblia*

Se descongelaron disoluciones de BSH-47 recombinante (1 µg/ml, 10 µg/ml y 100 µg/ml diluidas en NaHCO₃ al 16,4%), y se administraron diariamente mediante sonda intragástrica a ratones neonatos (las dosis fueron respectivamente 0,05 µg, 0,5 µg y 5 µg por ratón) desde el día 10 al día 15 (día del sacrificio). Los animales de control recibieron PBS en lugar de BSH. Todos los grupos tratados con BSH-47 mostraron una reducción en la carga de trofozoítos en el intestino delgado en comparación con el control (figura 13). Sin embargo, solo el grupo tratado con 100 µg/ml de BSH-47 mostró una reducción significativa en la carga de parásitos.

Referencias bibliográficas

Ali, S. A. y D. R. Hill (2003), *Giardia intestinalis*. Curr Opin Infect Dis, 16, 453-60.

Benyacoub, J., P. F. Perez, F. Rochat, K. Y. Saudan, G. Reuteler, N. Antille, M. Humen, G. L. De Antoni, C. Cavadini, S. Blum y E. J. Schiffrin (2005) J Nutr, 135, 1171-6.

Biagini, G. A., Park, J. H., Lloyd, D., y Edwards, M. R. (2001), 3359-3365.

Brassard D y Schiffrin EJ., 1997. Trends Food Sci. Technol. 8:321-326.

Carnaby, S., Katelaris, P. H., Naeem, A., y Farthing, M. J. G. (1994). DNA Fingerprinting, 62(5).

Charneau S, Junqueira M, Costa CM, Pires DL, Fernandes ES, Bussacos AC, et al. Int J Mass Spectrom 2007;268:265-76. Farthing, M. J. (1997) J Pediatr Gastroenterol Nutr, 24, 79-88.

Farthing et al., (1986), MJ 1986 J Antimicrob Chemother 17:165-171.

Fujisawa *et al.* (1992) Taxonomic Study of the *Lactobacillus acidophilus* Group, with Recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and Synonymy of with the Type Strain of *Lactobacillus*

- amylovorus, (July), 487-491. Gillin, F. D. (1987). Giardia The Role of Conjugated and Unconjugated in Killing by Human Milk, 83, 74-83.
- 5 Grill JP, Cayuela C, Antoine JM, y Schneider F (2000) J Appl Microbiol 89(4):553-563.
- Halliday et al., (1995) Int. J. for Parasitology, vol. 25(9), pp 1089-1097.
- 10 Humen, M. A., G. L. De Antoni, J. Benyacoub, M. E. Costas, M. I. Cardozo, L. Kozubsky, K. Y. Saudan, A. Boenzli-Bruand, S. Blum, E. J. Schiffrin y P. F. Perez (2005) Infect Immun, 73, 1265-9.
- Lauer y Kandler (1980) Journal O Zentralbl Bakteriell Hyg Abt I Orig 1, 75-78, 1980.
- Mons, C., A. Dumetre, S. Gosselin, C. Galliot y L. Moulin (2009) Water Res, 43, 211-7.
- 15 Morrison, H. G., A. G. McArthur, F. D. Gillin, S. B. Aley, R. D. Adam, G. J. Olsen, A. A. Best, W. Z. Cande, F. Chen, M. J. Cipriano, B. J. Davids, S. C. Dawson, H. G. Elmendorf, A. B. Hehl, M. E. Holder, S. M. Huse, U. U. Kim, E. Lasek-Nesselquist, G. Manning, A. Nigam, J. E. Nixon, D. Palm, N. E. Passamaneck, A. Prabhu, C. I. Reich, D. S. Reiner, J. Samuelson, S. G. Svard y M. L. Sogin (2007) Science, 317, 1921-6.
- 20 Paget, T., Maroulis, S., Mitchell, A., Edwards, M. R., Jarroll, E. L., Lloyd, D., y Lloyd, D. (2004). Printed in Great Britain, 1231-1236. doi:10.1099/mic.0.26836-0
- Perez, P. F., J. Minnaard, M. Rouvet, C. Knabenhans, D. Brassart, G. L. De Antoni y E. J. Schiffrin (2001) Appl Environ Microbiol, 67, 5037-42.
- 25 Pridmore, R. D., B. Berger, F. Desiere, D. Vilanova, C. Barretto, A. C. Pittet, M. C. Zwahlen, M. Rouvet, E. Altermann, R. Barrangou, B. Mollet, A. Mercenier, T. Klaenhammer, F. Arigoni y M. A. Schell (2004) Proc Natl Acad Sci USA, 101, 2512-7.
- 30 Queiroz, R. M., Charneau, S., Motta, F. N., Santana, J. M., Roepstorff, P., y Ricart, C. A. (2013) J Proteome Res 12, 3255-3263
- Rabilloud, T (2009) Membrane Proteomics Methods in Molecular Biology Volume 528, 2009, pp 259-267
- 35 Rohrer, L., Winterhalter, K. H., Eckert, J., & Kohler, P. (1986). Killing of Giardia lamblia by Human Milk Is Mediated by Unsaturated Fatty Acids, 30(2). doi: 10.1128/AAC.30.2.254.Updated
- Singer, S. M. y T. E. Nash (2000) J Infect Dis, 181, 1510-2.
- 40 Smith, C. A., E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan y G. Siuzdak (2006) Anal. Chem., 78, 779-87.
- Sud, M., E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E. A. Dennis, C. K. Glass, A. H. Merrill, Jr., R. C. Murphy, C. R. Raetz, D. W. Russell y S. Subramaniam (2007) Nucleic Acids Res., 35, D527-32.
- 45 Tancrede, C. (1992) Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 11, 1012-5.
- Upcroft, P. y J. A. Upcroft (2001) Clin Microbiol Rev, 14, 150-64.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE MUSEO AGRONOMIQUE NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
 <120> COMPOSICIONES PARA LA INHIBICIÓN DE GIARDIA LAMBLIA
 <130> B368241D33847
 10 <150> EP14306265.1
 <151> 2015-08-08
 <160> 11
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 326
 <212> PRT
 20 <213> Lactobacillus johnsonii BSH-12
 <400> 1
 Met Cys Thr Ser Ile Val Tyr Ser Ser Asn Asn His His Tyr Phe Gly
 1 5 10 15
 Arg Asn Leu Asp Leu Glu Ile Ser Phe Gly Glu His Pro Val Ile Thr
 20 25 30
 Pro Arg Asn Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Lys Leu Pro Ser Lys Lys Ala
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Met Val Gly Met Ala Ile Val Glu Asn Asn Tyr Pro Leu
 50 55 60
 Tyr Phe Asp Ala Ala Asn Glu Glu Gly Leu Gly Ile Ala Gly Leu Asn
 65 70 75 80
 Phe Asp Gly Pro Cys His Tyr Phe Pro Glu Asn Ala Glu Lys Asn Asn
 85 90 95
 Val Thr Pro Phe Glu Leu Ile Pro Tyr Leu Leu Ser Gln Cys Thr Thr
 100 105 110
 Val Ala Glu Val Lys Asp Ala Leu Lys Asp Val Ser Leu Val Asn Ile
 115 120 125
 Asn Phe Ser Glu Lys Leu Pro Leu Ser Pro Leu His Trp Leu Met Ala
 130 135 140
 Asp Lys Thr Gly Glu Ser Ile Val Val Glu Ser Thr Leu Ser Gly Leu
 145 150 155 160

ES 2 885 830 T3

His Val Tyr Asp Asn Pro Val His Val Leu Thr Asn Asn Pro Glu Phe
165 170 175

Pro Gly Gln Leu Arg Asn Leu Ala Asn Tyr Ser Asn Ile Ala Pro Ala
180 185 190

Gln Pro Lys Asn Thr Leu Val Pro Gly Val Asp Leu Asn Leu Tyr Ser
195 200 205

Arg Gly Leu Gly Thr His Phe Leu Pro Gly Gly Met Asp Ser Ala Ser
210 215 220

Arg Phe Val Lys Ile Ala Phe Val Arg Ala His Ser Pro Gln Gly Asn
225 230 235 240

Asn Glu Leu Ser Ser Val Thr Asn Tyr Phe His Ile Leu His Ser Val
245 250 255

Glu Gln Pro Lys Gly Thr Asp Glu Val Gly Pro Asn Ser Tyr Glu Tyr
260 265 270

Thr Ile Tyr Ser Asp Gly Thr Asn Leu Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Tyr
275 280 285

Thr Asn Tyr Glu Asn Asn Gln Ile Asn Ala Ile Glu Leu Asn Lys Glu
290 295 300

Asn Leu Asn Gly Asp Glu Leu Thr Asp Tyr Lys Leu Ile Glu Lys Gln
305 310 315 320

Thr Ile Asn Tyr Gln Asn
325

<210> 2

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Lactobacillus johnsonii BSH-47

<400> 2

Met Cys Thr Ser Ile Leu Tyr Ser Pro Lys Asp Asn Tyr Phe Gly Arg
1 5 10 15

Asn Leu Asp Tyr Glu Ile Ala Tyr Gly Gln Lys Val Val Ile Thr Pro
20 25 30

Arg Asn Tyr Gln Leu Asn Tyr Arg His Leu Pro Thr Gln Asp Thr His
35 40 45

ES 2 885 830 T3

Tyr Ala Met Ile Gly Val Ser Val Val Ala Asn Asp Tyr Pro Leu Tyr
 50 55 60
 Cys Asp Ala Ile Asn Glu Lys Gly Leu Gly Ile Ala Gly Leu Asn Phe
 65 70 75 80
 Thr Gly Pro Gly Lys Tyr Phe Ser Val Asp Glu Ser Lys Lys Asn Val
 85 90 95
 Thr Ser Phe Glu Leu Ile Pro Tyr Leu Leu Ser Asn Cys Glu Thr Ile
 100 105 110
 Glu Asp Val Lys Lys Leu Leu Ser Glu Thr Asn Ile Thr Asp Glu Ser
 115 120 125
 Phe Ser Lys Asp Leu Pro Val Thr Thr Leu His Trp Leu Met Gly Asp
 130 135 140
 Lys Ser Gly Lys Ser Ile Val Ile Glu Ser Thr Glu Thr Gly Leu His
 145 150 155 160
 Val Tyr Asp Asn Pro Val Asn Thr Leu Thr Asn Asn Pro Val Phe Pro
 165 170 175
 Ala Gln Val Glu Thr Leu Ala Asn Phe Ala Ser Val Ser Pro Ala Gln
 180 185 190
 Pro Lys Asn Thr Leu Val Pro Asn Ala Asp Ile Asn Leu Tyr Ser Arg
 195 200 205
 Gly Leu Gly Thr His His Leu Pro Gly Gly Thr Asp Ser Asn Ser Arg
 210 215 220
 Phe Ile Lys Ala Ser Phe Val Leu Ala His Ser Pro Lys Gly Asn Asp
 225 230 235 240
 Glu Val Glu Asn Val Thr Asn Phe Phe His Val Leu His Ser Val Glu
 245 250 255
 Gln Ala Lys Gly Thr Asp Glu Val Glu Asp Asn Val Phe Glu Phe Thr
 260 265 270
 Met Tyr Ser Asp Cys Met Asn Leu Asp Lys Gly Ile Leu Tyr Phe Thr
 275 280 285
 Thr Tyr Asp Asn Asn Gln Ile Asn Ala Val Asp Met Asn Asn Glu Asp
 290 295 300
 Leu Gly Thr Ser Asp Leu Ile Thr Tyr Glu Leu Phe Lys Asp Gln Ala
 305 310 315 320
 Ile Lys Phe Glu Asn
 325

<210> 3

<211> 316

<212> PRT

<213> Lactobacillus johnsonii BSH-56

ES 2 885 830 T3

<400> 3

Met Cys Thr Gly Leu Arg Phe Thr Asp Asp Gln Gly Asn Leu Tyr Phe
1 5 10 15

Gly Arg Asn Leu Asp Val Gly Gln Asp Tyr Gly Glu Gly Val Ile Ile
20 25 30

Thr Pro Arg Asn Tyr Pro Leu Pro Tyr Lys Phe Leu Asp Asn Thr Thr
35 40 45

Thr Lys Lys Ala Val Ile Gly Met Gly Ile Val Val Asp Gly Tyr Pro
50 55 60

Ser Tyr Phe Asp Cys Tyr Asn Glu Asp Gly Leu Gly Ile Ala Gly Leu
65 70 75 80

Asn Phe Pro His Phe Ala Lys Phe Ser Asp Gly Pro Ile Asp Gly Lys
85 90 95

Ile Asn Leu Ala Ser Tyr Glu Ile Met Leu Trp Val Thr Gln Asn Phe
100 105 110

Thr His Val Ser Glu Val Lys Glu Ala Leu Lys Asn Val Asn Leu Val
115 120 125

Asn Glu Ala Ile Asn Thr Ser Phe Ala Val Ala Pro Leu His Trp Ile
130 135 140

Ile Ser Asp Ser Asp Glu Ala Ile Ile Val Glu Val Ser Lys Gln Tyr
145 150 155 160

Gly Met Lys Val Phe Asp Asp Lys Val Gly Val Leu Thr Asn Ser Pro
165 170 175

Asp Phe Asn Trp His Leu Thr Asn Leu Gly Asn Tyr Thr Gly Leu Asn
180 185 190

ES 2 885 830 T3

Pro His Asp Ala Thr Ala Gln Ser Trp Asn Gly Gln Lys Val Ala Pro
195 200 205

Trp Gly Val Gly Thr Gly Ser Leu Gly Leu Pro Gly Asp Ser Ile Pro
210 215 220

Ala Asp Arg Phe Val Lys Ala Ala Tyr Leu Asn Val Asn Tyr Pro Thr
225 230 235 240

Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Ala Lys Phe Phe Asn Ile Leu Lys
245 250 255

Ser Val Ala Met Ile Lys Gly Ser Val Val Asn Asp Gln Gly Lys Asp
260 265 270

Glu Tyr Thr Val Tyr Thr Ala Cys Tyr Ser Ser Gly Ser Lys Thr Tyr
275 280 285

Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Asp Phe Glu Leu Lys Thr Tyr Lys Leu Asp
290 295 300

Asp His Thr Met Asn Ser Thr Ser Leu Val Thr Tyr
305 310 315

<210> 4

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Lactobacillus gasseri BSH-A

<400> 4

Met Cys Thr Ser Ile Leu Tyr Ser Pro Lys Asp His Tyr Phe Gly Arg
1 5 10 15

Asn Leu Asp Tyr Glu Ile Ala Tyr Gly Gln Lys Val Val Ile Thr Pro
20 25 30

Arg Asn Tyr Glu Phe Glu Phe Thr Asp Leu Pro Val Glu Lys Ser His
35 40 45

Tyr Ala Met Ile Gly Val Ala Ala Val Ala Asp Asn Thr Pro Leu Tyr
50 55 60

Cys Asp Ala Ile Asn Glu Lys Gly Leu Gly Val Ala Gly Leu Ser Phe
65 70 75 80

Ala Gly Gln Gly Lys Tyr Phe Pro Asn Ala Val Asn Lys Lys Asn Ile
85 90 95

ES 2 885 830 T3

Ala Ser Phe Glu Phe Ile Ser Tyr Leu Leu Ala Thr Tyr Glu Thr Val
100 105 110

Asp Gln Val Lys Glu Ser Leu Thr Asn Ala Asn Ile Ser Asn Val Ser
115 120 125

Phe Ala Lys Asn Thr Pro Ala Ser Glu Leu His Trp Leu Val Gly Asp
130 135 140

Lys Thr Gly Lys Ser Ile Val Val Glu Ser Asp Glu Lys Gly Leu His
145 150 155 160

Val Tyr Asn Asn Pro Val Asn Ala Leu Thr Asn Ala Pro Leu Phe Pro
165 170 175

Glu Gln Leu Thr Asn Leu Val Asn Phe Ala Ser Val Val Pro Gly Glu
180 185 190

Pro Asp Asn Asn Phe Leu Pro Gly Val Asn Leu Lys Leu Tyr Ser Arg
195 200 205

Ser Leu Gly Thr His His Leu Pro Gly Gly Met Asp Ser Glu Ser Arg
210 215 220

Phe Val Lys Val Cys Phe Ala Leu Asn His Ala Pro Lys Asp Ser Asp
225 230 235 240

Glu Val Glu Asn Val Thr Asn Phe Phe His Ile Leu Glu Ser Val Glu
245 250 255

Gln Ala Lys Gly Met Asp Gln Val Gly Pro Asn Ser Phe Glu Tyr Thr
260 265 270

Met Tyr Thr Ser Cys Met Asn Leu Glu Lys Gly Ile Leu Tyr Phe Asn
275 280 285

Cys Tyr Asp Asp Ser Arg Ile Ser Ala Val Asp Met Asn Lys Glu Asp
290 295 300

Leu Asp Ser Ser Asp Leu Val Val Tyr Asp Leu Phe Lys Lys Gln Asp
305 310 315 320

Ile Ser Phe Ile Asn
325

<210> 5

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Lactobacillus gasseri BSH-B

<400> 5

ES 2 885 830 T3

Met	Cys	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Ser	Pro	Lys	Asp	His	Tyr	Phe	Gly	Arg	1	5	10	15
Asn	Leu	Asp	Tyr	Glu	Ile	Ala	Tyr	Gly	Gln	Lys	Val	Val	Ile	Thr	Pro	20	25	30	
Lys	Asn	Tyr	Glu	Phe	Glu	Phe	Thr	Asp	Leu	Pro	Ala	Glu	Lys	Ser	His	35	40	45	
Tyr	Ala	Met	Ile	Gly	Val	Ala	Ala	Val	Ala	Asp	Asn	Thr	Pro	Leu	Tyr	50	55	60	
Cys	Asp	Ala	Ile	Asn	Glu	Lys	Gly	Leu	Gly	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Phe	65	70	75	80
Ala	Gly	Gln	Gly	Lys	Tyr	Phe	Pro	Asn	Ala	Ala	Asp	Lys	Lys	Asn	Ile	85	90	95	
Ala	Ser	Phe	Glu	Phe	Ile	Ser	Tyr	Leu	Leu	Ala	Thr	Tyr	Glu	Thr	Val	100	105	110	
Asp	Gln	Val	Lys	Glu	Ser	Leu	Thr	Asn	Ala	Asn	Ile	Ser	Asn	Val	Ser	115	120	125	
Phe	Ala	Lys	Asn	Thr	Pro	Ala	Ser	Glu	Leu	His	Trp	Leu	Val	Gly	Asp	130	135	140	
Lys	Thr	Gly	Lys	Ser	Ile	Val	Val	Glu	Ser	Asp	Glu	Lys	Gly	Leu	His	145	150	155	160
Val	Tyr	Asn	Asn	Pro	Val	Asn	Ala	Leu	Thr	Asn	Ala	Pro	Leu	Phe	Pro	165	170	175	
Glu	Gln	Leu	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Glu	180	185	190	
Pro	Asp	Asn	Asn	Phe	Leu	Pro	Gly	Val	Asn	Leu	Lys	Leu	Tyr	Ser	Arg	195	200	205	
Ser	Leu	Gly	Thr	His	His	Leu	Pro	Gly	Gly	Met	Asp	Ser	Glu	Ser	Arg	210	215	220	
Phe	Val	Lys	Val	Cys	Phe	Ala	Leu	Asn	His	Ala	Pro	Lys	Asp	Ser	Asp				

ES 2 885 830 T3

225 230 235 240

Glu Val Glu Asn Val Thr Asn Phe Phe His Ile Leu Glu Ser Val Glu
245 250 255

Gln Ala Lys Gly Met Asp Gln Ile Gly Pro Asn Ser Phe Glu Tyr Thr
260 265 270

Met Tyr Thr Ser Cys Met Asn Leu Glu Lys Gly Ile Leu Tyr Phe Asn
275 280 285

Cys Tyr Asp Asp Ser Arg Ile Ser Ala Val Asp Met Asn Lys Glu Asp
290 295 300

Leu Asp Ser Ser Asp Leu Val Val Tyr Asp Leu Phe Lys Lys Gln Asp
305 310 315 320

Ile Ser Phe Ile Asn
325

<210> 6

<211> 325

<212> PRT

5 <213> Lactobacillus johnsonii DPC6026 (F4AEI5)

<400> 6

Met Cys Thr Ser Ile Leu Tyr Ser Pro Lys Asp Asn Tyr Phe Gly Arg
1 5 10 15

Asn Leu Asp Tyr Glu Ile Ala Tyr Gly Gln Lys Val Val Ile Thr Pro
20 25 30

Arg Asn Tyr Gln Leu Asp Tyr Arg His Leu Pro Thr Gln Asp Thr His
35 40 45

Tyr Ala Met Ile Gly Val Ser Val Val Ala Asn Asp Tyr Pro Leu Tyr
50 55 60

Cys Asp Ala Ile Asn Glu Lys Gly Leu Gly Ile Ala Gly Leu Asn Phe
65 70 75 80

Thr Gly Pro Gly Lys Tyr Phe Ala Val Asp Glu Ser Lys Lys Asn Val
85 90 95

Thr Ser Phe Glu Leu Ile Pro Tyr Leu Leu Ser Ser Cys Glu Thr Ile
100 105 110

Glu Asp Val Lys Lys Leu Leu Ser Glu Thr Asn Ile Thr Asp Glu Ser

ES 2 885 830 T3

115	120	125
Phe Ser Lys Asp Leu Pro Val Thr Thr Leu His Trp Leu Met Gly Asp		
130	135	140
Lys Ser Gly Lys Ser Ile Val Ile Glu Ser Thr Glu Thr Gly Leu His		
145	150	155
Val Tyr Asp Asn Pro Val Asn Thr Leu Thr Asn Asn Pro Val Phe Pro		
165	170	175
Ala Gln Val Glu Thr Leu Ala Asn Phe Ala Ser Val Ser Pro Ala Gln		
180	185	190
Pro Lys Asn Thr Leu Val Pro Asn Ala Asp Ile Asn Leu Tyr Ser Arg		
195	200	205
Gly Leu Gly Thr His His Leu Pro Gly Gly Thr Asp Ser Asn Ser Arg		
210	215	220
Phe Ile Lys Ala Ser Phe Val Leu Ala His Ser Pro Lys Gly Asn Asp		
225	230	235
Glu Val Glu Asn Val Thr Asn Phe Phe His Ile Leu His Ser Val Glu		
245	250	255
Gln Ala Lys Gly Thr Asp Glu Val Glu Asp Asn Val Phe Glu Phe Thr		
260	265	270
Met Tyr Ser Asp Cys Met Asn Leu Asp Lys Gly Ile Leu Tyr Phe Thr		
275	280	285
Thr Tyr Asp Asn Asn Gln Ile Asn Ala Val Asp Met Asn Asn Glu Asp		
290	295	300
Leu Asp Thr Ser Asp Leu Ile Thr Tyr Glu Leu Phe Lys Asp Gln Ala		
305	310	315
Ile Lys Phe Glu Asn		
325		

<210> 7

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Lactobacillus johnsonii DPC6026 (F4ACA3)

<400> 7

Met Cys Thr Ser Ile Val Tyr Ser Ser Asn Asn His His Tyr Phe Gly

ES 2 885 830 T3

1	5	10	15
Arg Asn Leu Asp Leu Glu Ile Ser Phe Gly Glu His Pro Val Ile Thr	20	25	30
Pro Arg Asn Tyr Glu Phe Gln Tyr Arg Lys Leu Pro Ser Lys Lys Ala	35	40	45
Lys Tyr Ala Met Val Gly Met Ala Ile Val Glu Asn Asn Tyr Pro Leu	50	55	60
Tyr Phe Asp Ala Ala Asn Glu Glu Gly Leu Gly Ile Ala Gly Leu Asn	65	70	75
Phe Asp Gly Pro Cys His Tyr Phe Pro Glu Asn Ala Glu Lys Asn Asn	85	90	95
Val Thr Pro Phe Glu Leu Ile Pro Tyr Leu Leu Ser Gln Cys Thr Thr	100	105	110
Val Ala Glu Val Lys Asp Ala Leu Lys Asp Val Ser Leu Val Asn Ile	115	120	125
Asn Phe Ser Glu Lys Leu Pro Leu Ser Pro Leu His Trp Leu Met Ala	130	135	140
Asp Lys Thr Gly Glu Ser Ile Val Val Glu Ser Thr Leu Ser Gly Leu	145	150	155
His Val Tyr Asp Asn Pro Val His Val Leu Thr Asn Asn Pro Glu Phe	165	170	175
Pro Gly Gln Leu Arg Asn Leu Ala Asn Tyr Ser Asn Ile Ala Pro Ala	180	185	190
Gln Pro Lys Asn Thr Leu Val Pro Gly Val Asp Leu Asn Leu Tyr Ser	195	200	205
Arg Gly Leu Gly Thr His Phe Leu Pro Gly Gly Met Asp Ser Ala Ser	210	215	220
Arg Phe Val Lys Val Ala Phe Val Arg Ala His Ser Pro Gln Gly Asn	225	230	235
Asn Glu Leu Ser Ser Val Thr Asn Tyr Phe His Ile Leu His Ser Val	245	250	255

ES 2 885 830 T3

Glu Gln Pro Lys Gly Thr Asp Glu Val Gly Pro Asn Ser Tyr Glu Tyr
260 265 270

Thr Ile Tyr Ser Asp Gly Thr Asn Leu Glu Thr Gly Thr Phe Tyr Tyr
275 280 285

Thr Asn Tyr Glu Asn Asn Gln Ile Asn Ala Ile Glu Leu Asn Lys Glu
290 295 300

Asn Leu Asn Gly Asp Glu Leu Ile Asp Tyr Lys Leu Ile Glu Lys Gln
305 310 315 320

Thr Ile Asn Tyr Gln Asn
325

<210> 8

<211> 316

<212> PRT

5 <213> Lactobacillus johnsonii DPC6026 (F4ADE7)

<400> 8

Met Cys Thr Gly Leu Arg Phe Thr Asp Asp Gln Gly Asn Leu Tyr Phe
1 5 10 15

Gly Arg Asn Leu Asp Val Gly Gln Asp Tyr Gly Glu Gly Val Ile Ile
20 25 30

Thr Pro Arg Asn Tyr Pro Leu Pro Tyr Lys Phe Leu Asp Asn Thr Thr
35 40 45

Thr Lys Lys Ala Val Ile Gly Met Gly Ile Val Val Asp Gly Tyr Pro
50 55 60

Ser Tyr Phe Asp Cys Tyr Asn Glu Asp Gly Leu Gly Ile Ala Gly Leu
65 70 75 80

Asn Phe Pro His Phe Ala Lys Phe Ser Asp Gly Pro Ile Asp Gly Lys
85 90 95

Ile Asn Leu Ala Ser Tyr Glu Ile Met Leu Trp Val Thr Gln Asn Phe
100 105 110

Thr His Val Ser Glu Val Lys Glu Ala Leu Lys Asn Val Asn Leu Val
115 120 125

Asn Glu Ala Ile Asn Thr Ser Phe Ala Val Ala Pro Leu His Trp Ile
130 135 140

ES 2 885 830 T3

Ile Ser Asp Ser Asp Glu Ala Ile Ile Val Glu Val Ser Lys Gln Tyr
145 150 155 160

Gly Met Lys Val Phe Asp Asp Lys Val Gly Val Leu Thr Asn Ser Pro
165 170 175

Asp Phe Asn Trp His Leu Thr Asn Leu Gly Asn Tyr Thr Gly Leu Asn
180 185 190

Pro His Asp Ala Thr Ala Gln Ser Trp Asn Gly Gln Lys Val Ala Pro
195 200 205

Trp Gly Val Gly Thr Gly Ser Leu Gly Leu Pro Gly Asp Ser Ile Pro
210 215 220

Ala Asp Arg Phe Val Lys Ala Ala Tyr Leu Asn Val Asn Tyr Pro Thr
225 230 235 240

Ala Lys Gly Glu Lys Ala Asn Val Ala Lys Phe Phe Asn Ile Leu Lys
245 250 255

Ser Val Ala Met Ile Lys Gly Ser Val Val Asn Asp Gln Gly Lys Asp
260 265 270

Glu Tyr Thr Val Tyr Thr Ala Cys Tyr Ser Ser Gly Ser Lys Thr Tyr
275 280 285

Tyr Cys Asn Phe Glu Asp Asp Phe Glu Leu Lys Thr Tyr Lys Leu Asp
290 295 300

Asp His Thr Met Asn Ser Thr Ser Leu Val Thr Tyr
305 310 315

<210> 9

<211> 981

<212> ADN

<213> Lactobacillus johnsonii La1 BSH-12

<400> 9

ctaattttga taattaattg tttgcttttc aatcaacttg taatctgtta actcatcacc 60

atttaagtgt tctttattta attcaatggc gtttaattga ttattttcat aattggtata 120

ataaaacgtg cctgtctcca agttagttcc atcagagtaa attgtgtact cataagaatt 180

tggtccgact tcatctgttc cctttggctg ttcaaccgaa tgtaaaatat ggaaataatt 240

tgttacacta cttaattcat tatttccttg aggggaatgt gccgaacaa aagctatatt 300

cacaaaaaga ctggccgaat ccattcctcc tggcaaaaaa tgagtccta accgcgact 360

atataaatta aggtcaacac ctggaacaag agtattttta ggctgtgcag gtgctatatt 420

ES 2 885 830 T3

actataatta gctaagttac gtaactggcc tggaaattca ggattattgg ttaaaacatg 480
aactggatta tcataaacgt gtaatccact taaagtcgat tctacaacga tgcactcacc 540
agtcttatca gccattaacc agtgaagtgg agaaagtggg agtttttctg aaaagtttat 600
atttactaag ctaacatctt tcaatgcac ttttacttca gcaaccgtag tacattgact 660
tagcaaataa ggaattaatt caaatggtgt aacattatct ttctccgcat tttctggaaa 720
ataatgacac ggaccatcaa aattaaggcc agcaattcct agcccttctt catttgctgc 780
atcaaaatat agtggataat tttttctac aatcgccatc ccaaccatgg catatcttgc 840
ctttttactt ggtaatttac gatattgaaa ctcataattc cttggtgtaa ttacaggatg 900
ttcaccaaaa gaaatttcca agtctagatt tcggccaaaa taatgatgat tatttgaact 960
ataaacaatt gaggtacaca t 981

<210> 10
<211> 978
<212> ADN
<213> Lactobacillus johnsonii La1 BSH-47

<400> 10
atgtgtacat caatcttata tagtccaaaa gataattatt ttggtagaaa tttagattat 60
gaaattgcct atgggtcagaa agtggtaatt actcctagaa attatcaact taattaccga 120
catttaccaa cacaagatac tcattatgca atgatcggtg tttcagtagt cgccaatgac 180
tatccattat attgtgatgc tatcaatgaa aagggactag ggatagccgg attaaatttc 240
actggtcctg gtaaataattt ttctgtagat gaaagtaaaa agaattgtac ttcttttgaa 300
ctgatcccat atttactaag taattgcgaa actatcgaa agtaaaagaa attattatct 360
gaaactaata ttactgatga aagtttctct aaagatttac cagttactac tcttcattgg 420
ttaatgggtg ataaaagtgg taagagtata gtcattgaat caacagaaac tggcttacac 480
gtttatgaca acccagttaa tactttaaca aataatcctg tctttccagc tcaagttgaa 540
accttggtta actttgcttc agtttctcca gctcaacctc agaataccct tgtacctaat 600
gcagatatta atctgtatag ccgtggatta gggacccatc atttaccagg cggaacagat 660
tcaaattctc gctttattaa ggcattcttt gtattagctc attctccaaa aggtaatgat 720
gaagtcgaaa atgtaactaa tttcttccat gtcttacatt cagttgaaca agcaaagggt 780
acagatgaag ttgaagataa tgtatttgaa tttaccatgt attcagactg tatgaatttg 840
gataaaggaa ttttatactt tactacttac gataataacc aaattaatgc tgtggatatg 900
aataatgaag atttaggtac ttctgacttg atcacttatg aattatttaa ggatcaagcc 960
attaaatttg aaaattaa 978

<210> 11
<211> 951
<212> ADN
<213> Lactobacillus johnsonii La1 BSH-56

<400> 11

ES 2 885 830 T3

ctagtaagtc acaagactgg ttgaattcat cgtgtgatca tctagtttat aggtctttaa	60
ttcaaaatca tcttcaaaat tacagtagta agtcttgctt ccagaagagt agcatgcagt	120
ataaacagta tattcgctcct tgccttgatc gttgactaca ctgcctttga tcatggcaac	180
agactttaag atgttaaaga atttagcgac gtttgctttt tcacctttag cagttggata	240
gtttacgttt aagtaagcag ctttaacaaa acgatcggct ggaatactgt caccgggcag	300
acctaagcta ccagttccta cgccccaagg agcaactttt tgcccgttcc agctttgggc	360
tgtagcgtca tgtgggttta aaccggtgta gttaccaagg ttagtaaggt gccagttaa	420
gtcagggcta ttagttaaaa cgccaacttt gtcacaaag actttcattc catattgttt	480
tgaaacctca acaataatgg cttcgtcact atcactaatg atccagtga gaggggcaac	540
cgcaaatgat gtgttaatag cttcattcac taagttaaca ttctttaag cttcctttac	600
ttcactaaca tgagtaaagt tttgagtaac ccagagcata atttcgtaag aagctaagtt	660
gattttaccg tcaataggac catcactaaa tttagcaaaa tgtgggaagt ttaaacctgc	720
aataccta atccatcttctg tatagcagtc aaagtatgat ggatagccat caaccacaat	780
tcccattcca ataacagcct ttttagtagt ggtgttatct aagaacttat atggaagagg	840
ataattacgc ggcgtaataa taacgccttc gccataatcc tgtccaacat ctagattacg	900
gccaaagtat aaatttcctt gatcatctgt gaatcttaaa ccagtaacaca t	951

REIVINDICACIONES

1. Composición que presenta una actividad de hidrolasa de sales biliares en presencia de bilis o sales biliares para una utilización para el tratamiento o la prevención de la giardiasis, en la que dicha composición se selecciona en el grupo que consiste en:

- una composición que comprende por lo menos una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), siendo dicha enzima seleccionada de entre BSH procariota, y preferentemente de entre BSH de bacterias de ácido láctico,
- una composición que comprende una bacteria del ácido láctico que segrega por lo menos una enzima BSH, con la excepción de *Lactobacillus johnsonii* La1, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*,
- una composición que comprende una célula hospedadora recombinante que segrega por lo menos una enzima BSH heteróloga, y
- una combinación de las mismas,

en la que dicha actividad de hidrolasa de sales biliares se determina mediante la detección de la presencia de glicina o taurina liberada de sales biliares conjugadas, de ácido cólico, de ácido desoxicólico, y/o de ácido quenodesoxicólico.

2. Composición para una utilización según la reivindicación 1, en la que dicha actividad de hidrolasa de sales biliares está asociada con la presencia de por lo menos una enzima hidrolasa de sales biliares (BSH).

3. Composición para una utilización según la reivindicación 2, en la que dicha enzima BSH se selecciona de entre BSH de las bacterias de ácido láctico seleccionadas de entre *Lactobacillus*, con la excepción de las cepas bacterianas *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533, CNCM 1-1225) y de *Lactobacillus acidophilus* (NCC90, CNCM 1-2332).

4. Composición para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha enzima BSH comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada en el grupo que consiste en:

- *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-12 (SEC ID N° 1), *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-47 (SEC ID N° 2), *Lactobacillus johnsonii* La1 BSH-56 (SEC ID N° 3),
- *Lactobacillus gasseri* BSH-A (SEC ID N° 4), *Lactobacillus gasseri* BSH-B (SEC ID N° 5),
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH (SEC ID N° 6),
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH (SEC ID N° 7), y
- *Lactobacillus johnsonii* DPC 6026 BSH (SEC ID N° 8),

o una variante natural que presenta una identidad de por lo menos 80%, por lo menos 85%, preferentemente 90%, por lo menos 90%, más preferentemente 95%, por lo menos 95%, y todavía más preferentemente 98%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% con una secuencia seleccionada en el grupo que consiste en SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8.

5. Composición para una utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo dicha composición una bacteria de ácido láctico que segrega una BSH, en la que dicha bacteria se selecciona de entre:

- *Lactobacillus*, con la excepción de *Lactobacillus johnsonii* La1 y de *Lactobacillus acidophilus*,
- *Bifidobacterium*, con la excepción de *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium infantis*.

6. Composición para una utilización según la reivindicación 5, en la que dicha bacteria de ácido láctico es un *Lactobacillus* seleccionado en el grupo que consiste en:

- *Lactobacillus johnsonii*, con la excepción de *Lactobacillus johnsonii* La1,
- *Lactobacillus gasseri*,
- *Lactobacillus acidophilus*, con la excepción de *Lactobacillus acidophilus* La10, y

- *Lactobacillus reuteri*.

7. Composición para una utilización según la reivindicación 5 o 6, en la que dicho *Lactobacillus* se selecciona en el grupo que consiste en las cepas bacterianas a las que se hace referencia como:

- *Lactobacillus johnsonii*: depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, con la referencia I-4885, el 7 de agosto de 2014
- *Lactobacillus gasseri*: depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, con la referencia I-4884, el 7 de agosto de 2014.

8. Célula hospedadora para una utilización en el tratamiento o la prevención de la giardiasis, comprendiendo dicha célula hospedadora un ácido nucleico heterólogo que comprende por lo menos una de las secuencias nucleotídicas siguientes:

- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-12 (SEC ID N° 9), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural presenta una secuencia nucleotídica de una identidad de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% con SEC ID N° 9,
- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-47 (SEC ID N° 10), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural presenta una secuencia nucleotídica de una identidad de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% con SEC ID N° 10,
- una secuencia nucleotídica que codifica *L. johnsonii* La1 BSH-56 (SEC ID N° 11), o una variante natural de la misma, en la que dicha variante natural presenta una secuencia nucleotídica de una identidad de por lo menos 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98%, o por lo menos 99% con SEC ID N° 11,

en la que dicha célula hospedadora segrega una enzima BSH.

9. Célula hospedadora para una utilización según la reivindicación 8, en la que dicha célula hospedadora es una bacteria de ácido láctico.

10. Composición para una utilización en el tratamiento o la prevención de la giardiasis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el tratamiento o la prevención de la giardiasis en seres humanos.

11. Composición para una utilización en el tratamiento o la prevención de la giardiasis según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para el tratamiento o la prevención de la giardiasis en animales, y en particular para cerdos y vacas.

12. Composición farmacéutica para una utilización según la reivindicación 10 u 11, en la que comprende, como un principio activo, una composición que presenta una actividad de hidrolasa de sales biliares según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador farmacéuticamente aceptable.

13. Composición alimenticia o suplemento dietético para una utilización según la reivindicación 10 u 11, en la/el que comprende como un principio activo, una composición que presenta una actividad de hidrolasa de sales biliares según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y un portador.

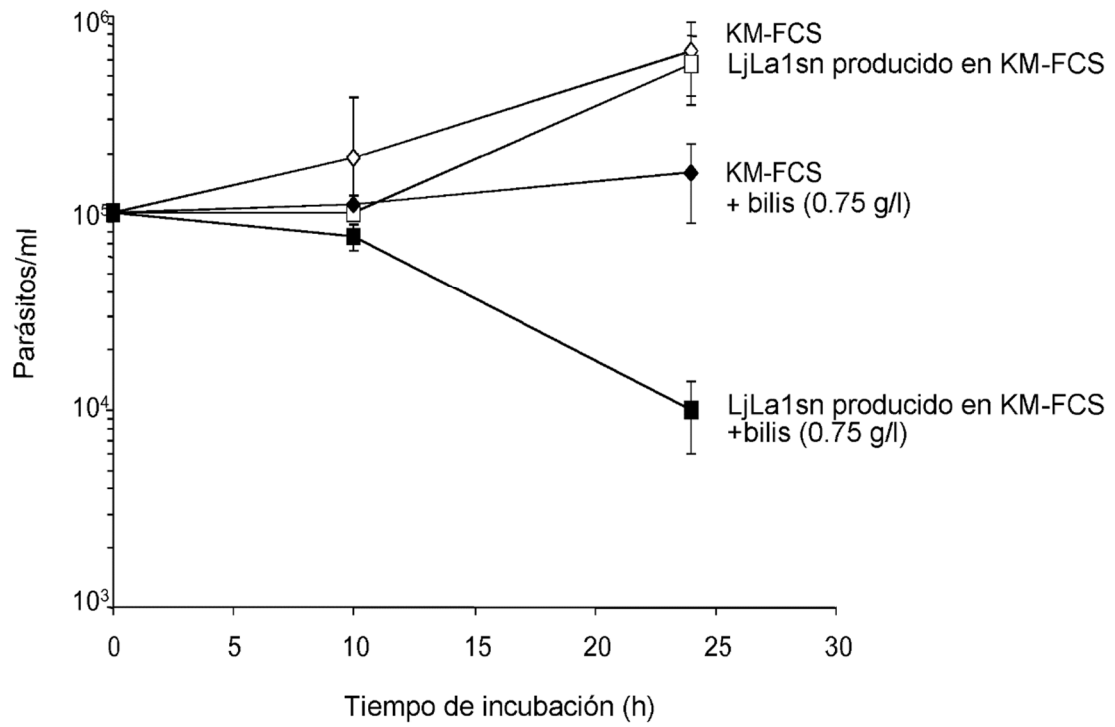


Figura 1A

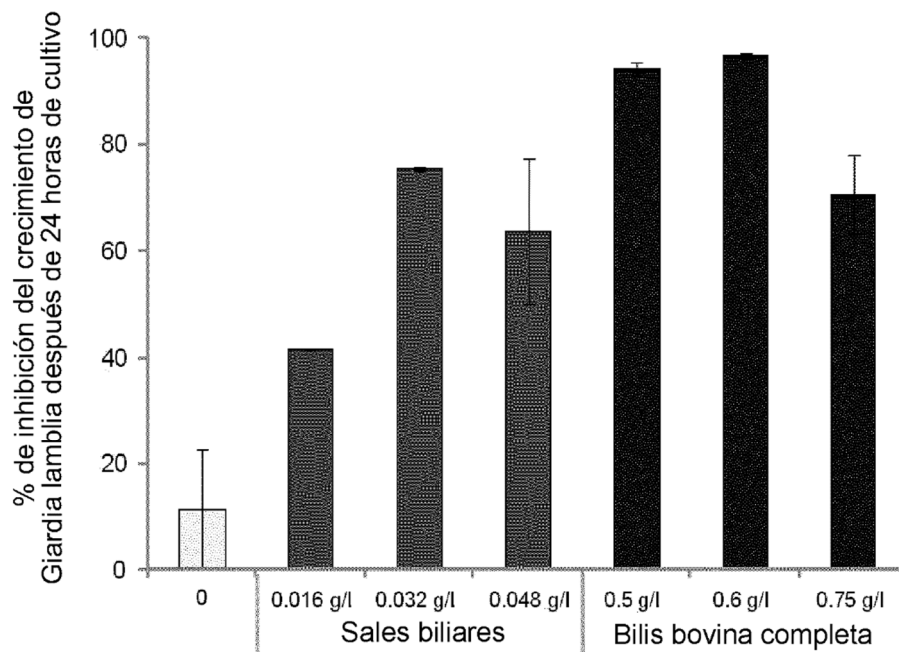


Figura 1B

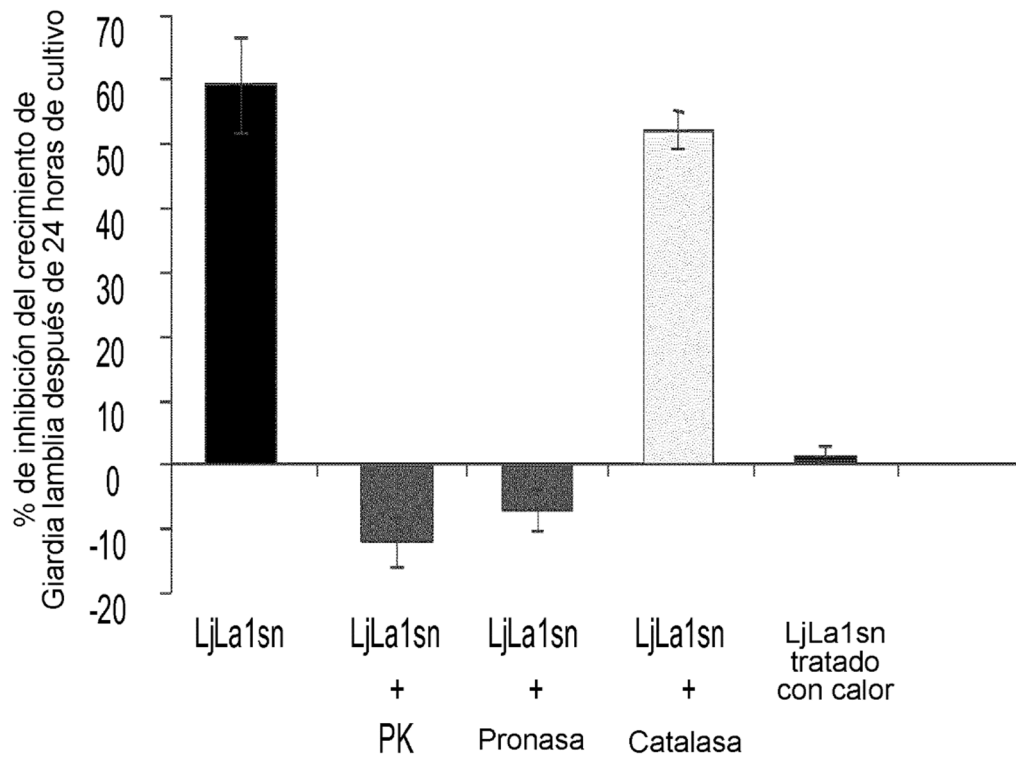


Figura 2A

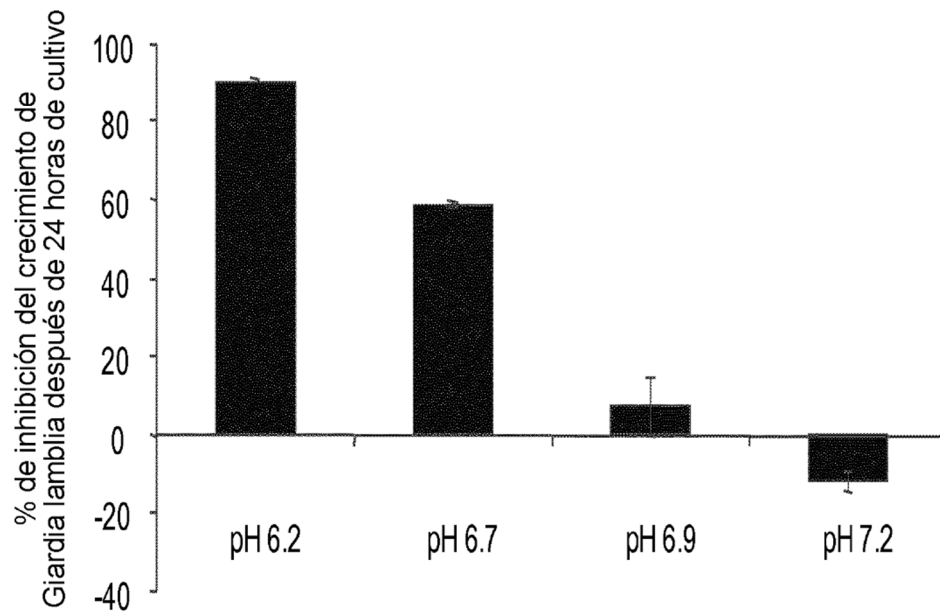


Figura 2B

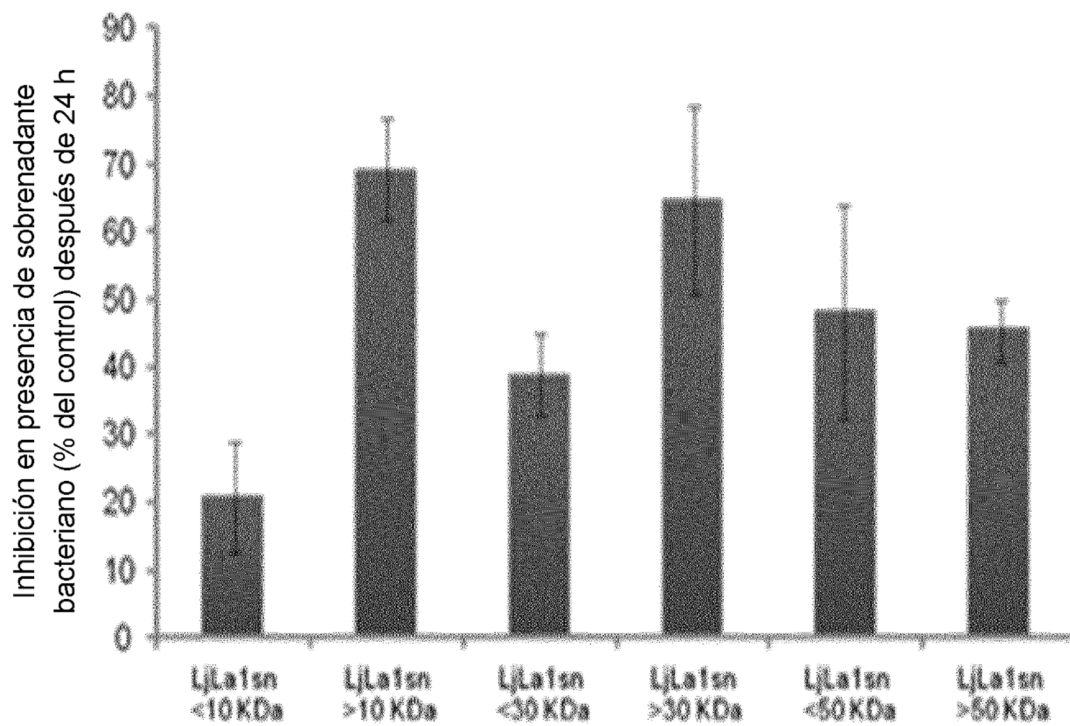


Figura 2C

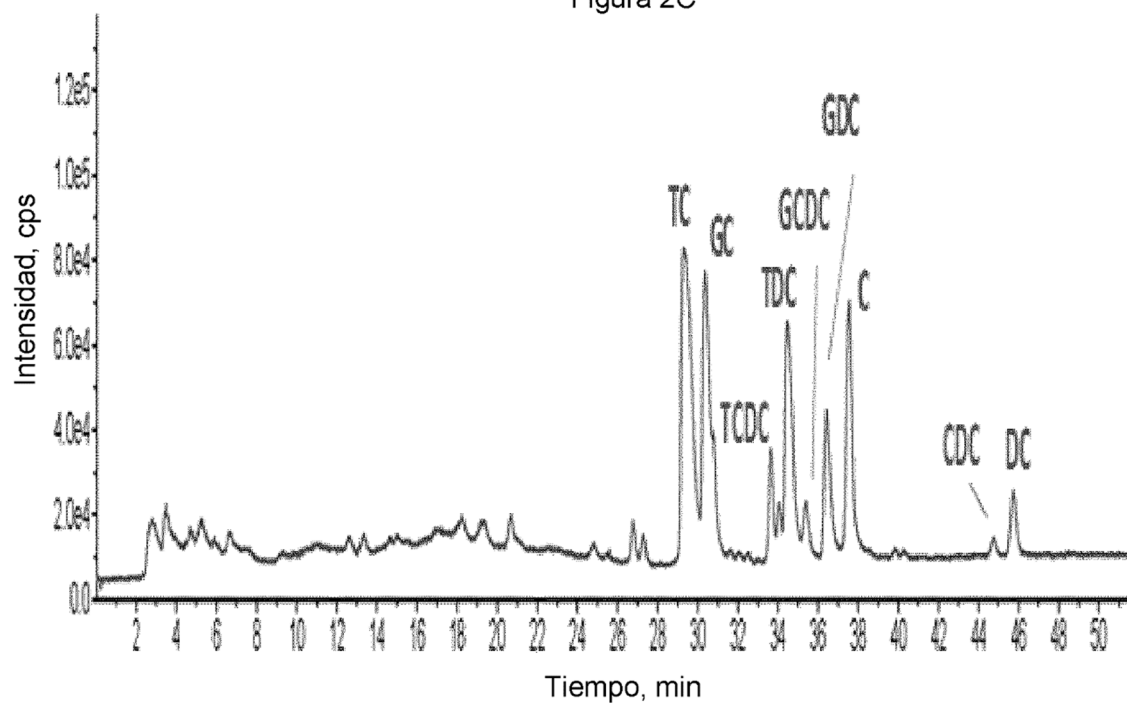


Figura 3A

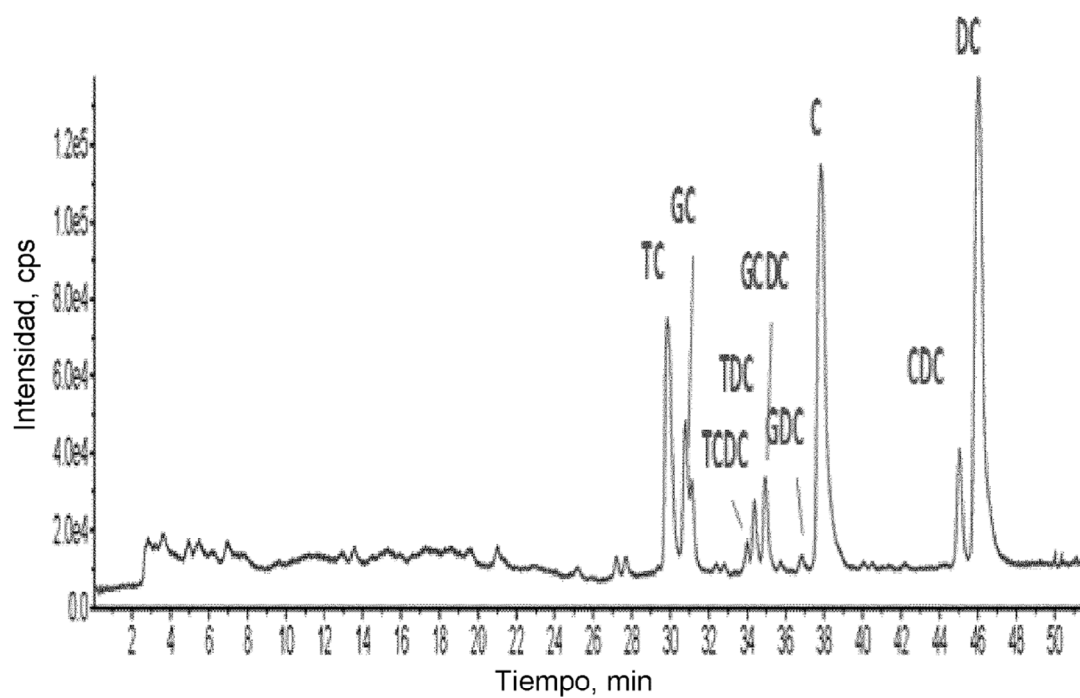


Figura 3B

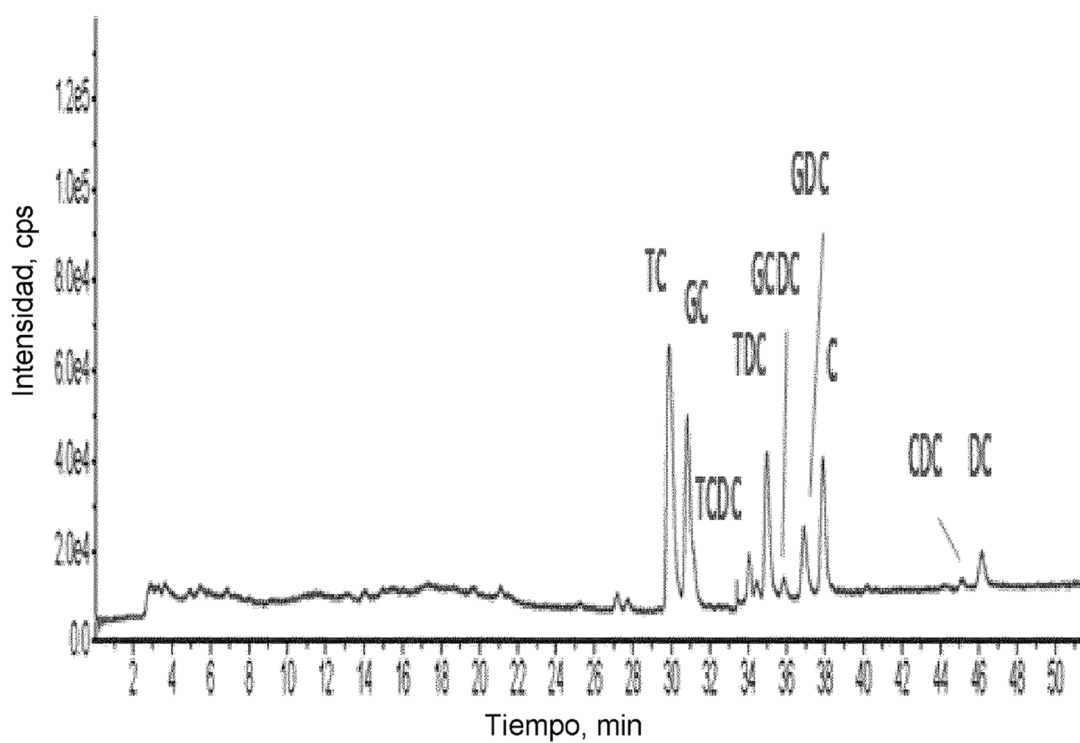


Figura 3C

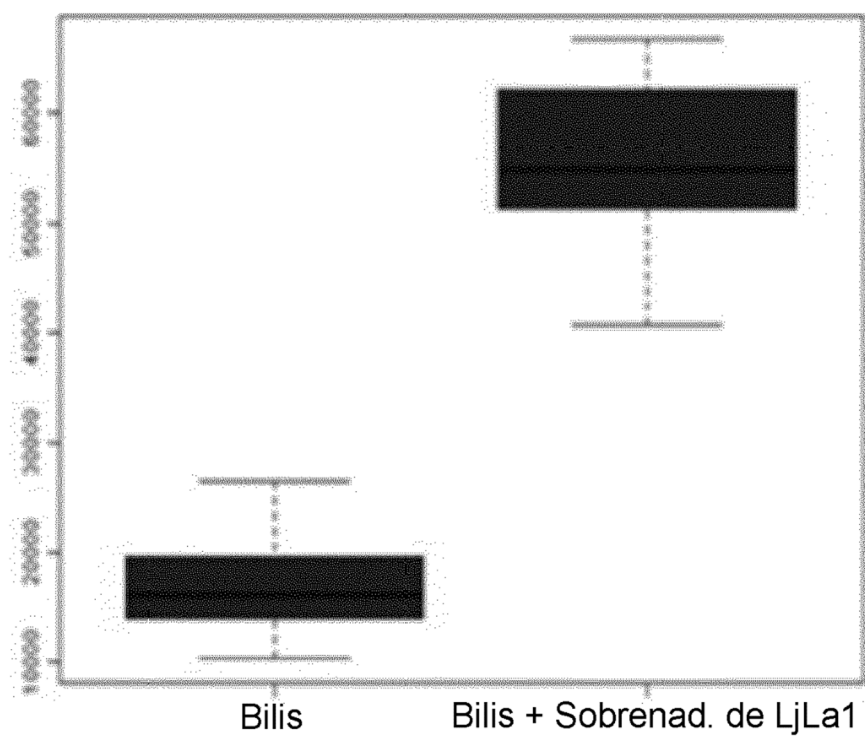


Figura 4A

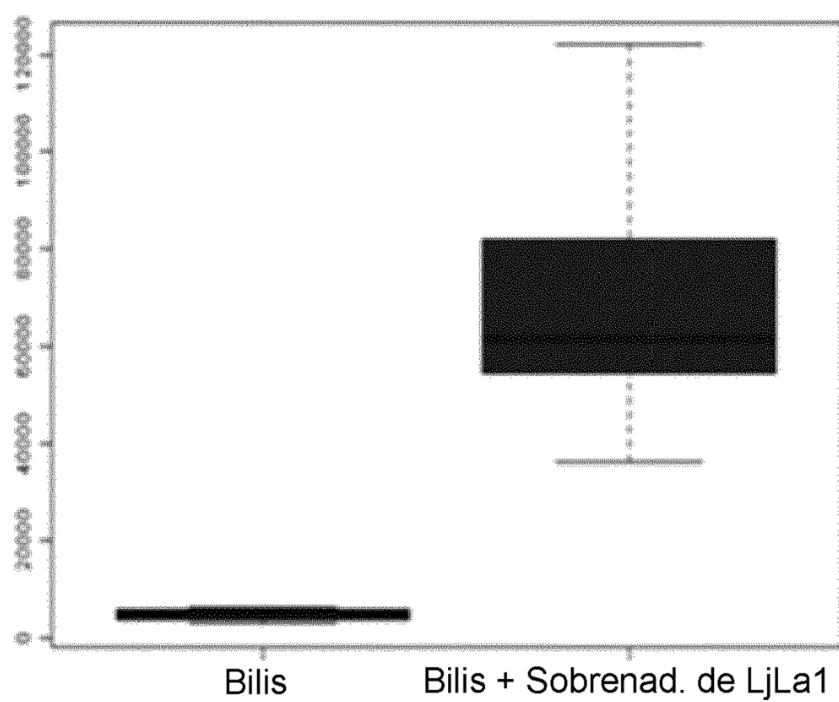


Figura 4B

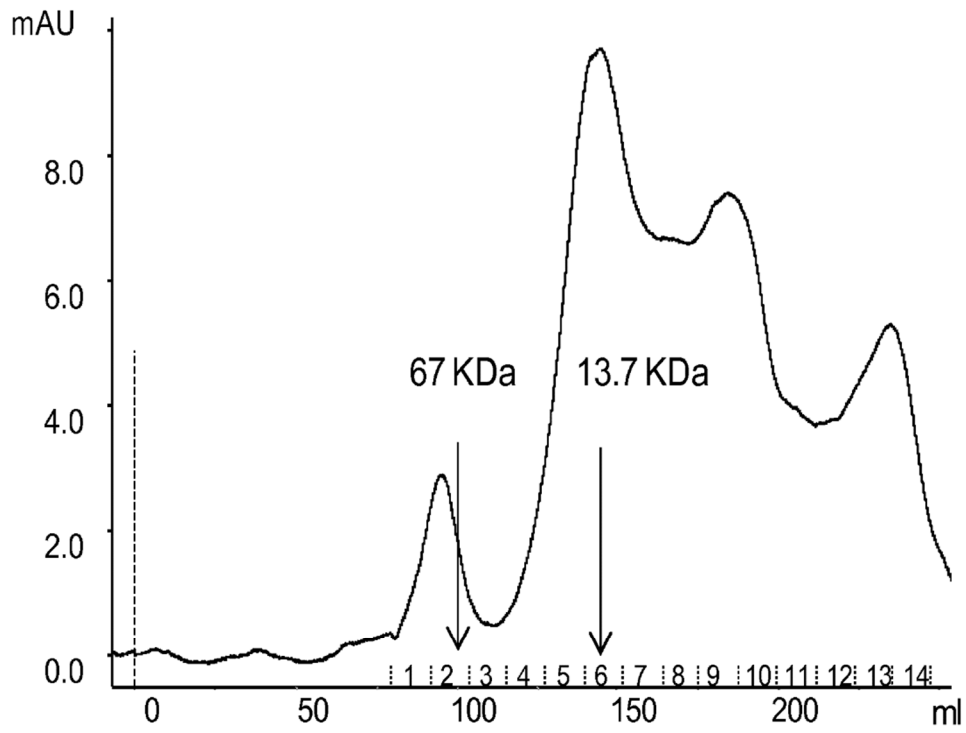


Figura 5A

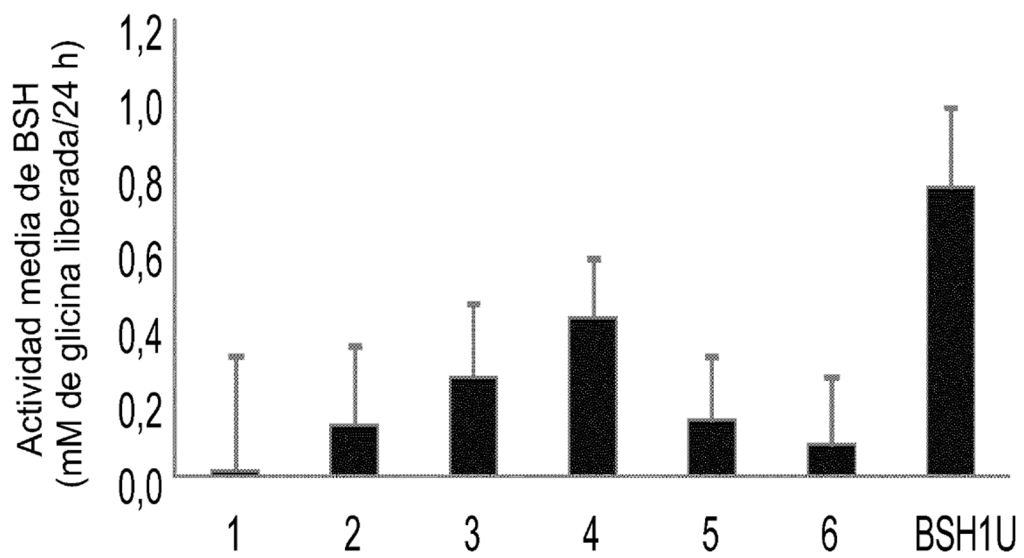
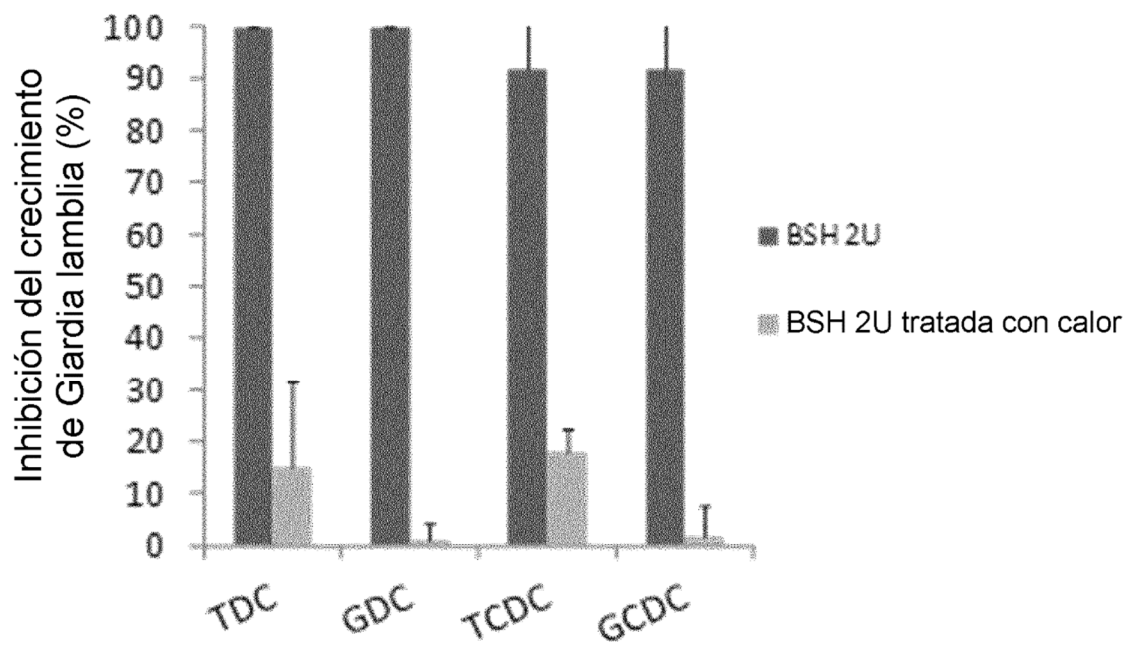
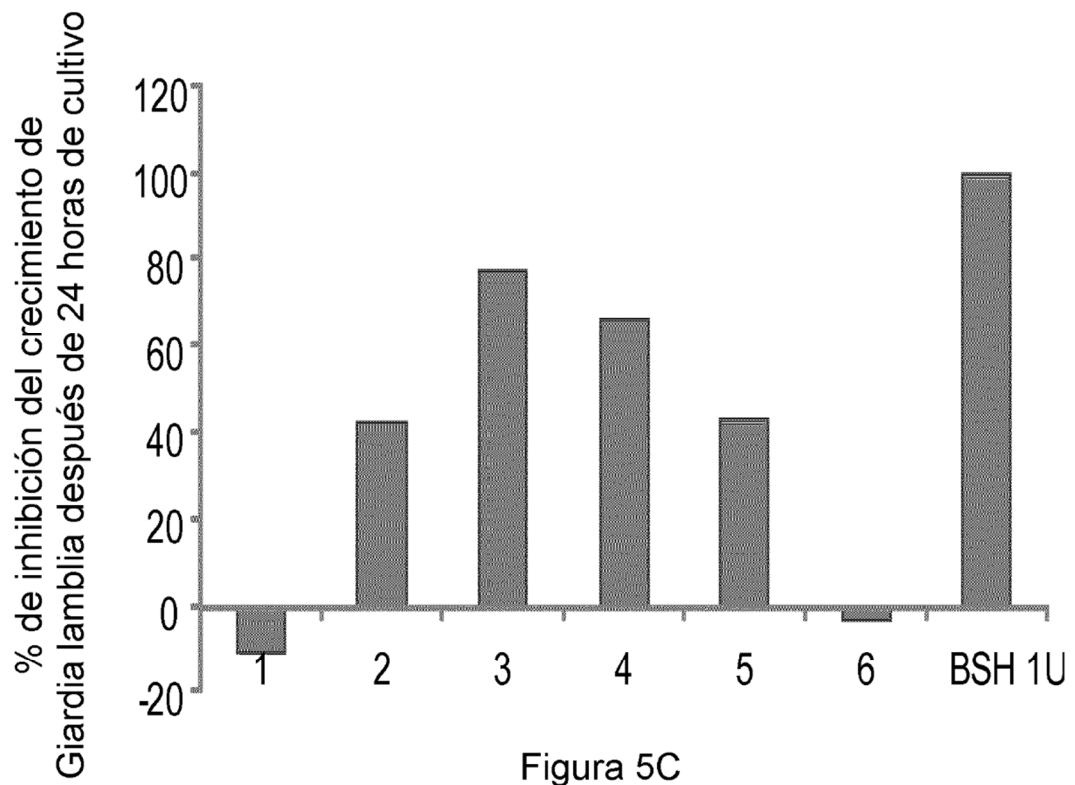


Figura 5B



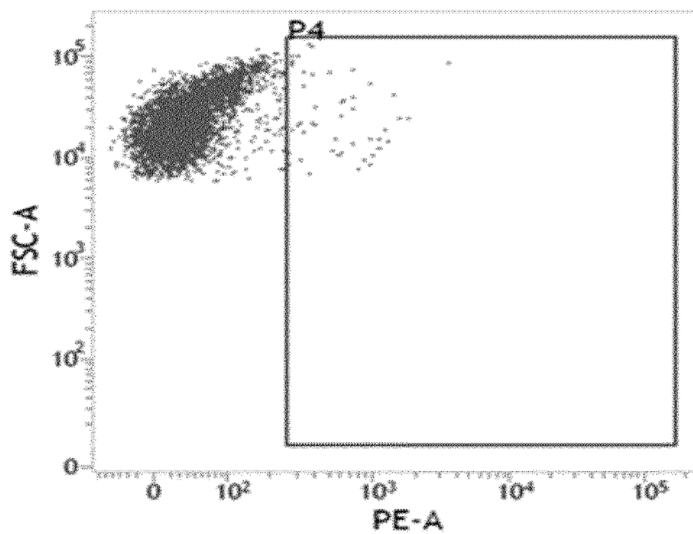


Figura 7A

a- KM (control)

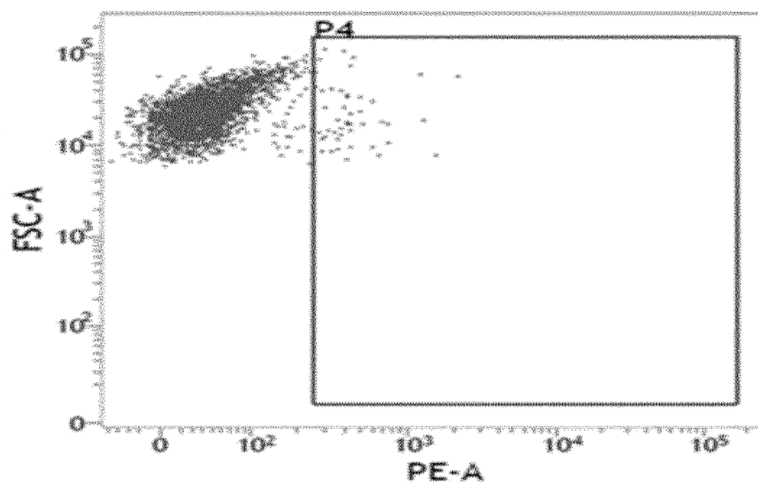


Figura 7B

b- KM + bilis

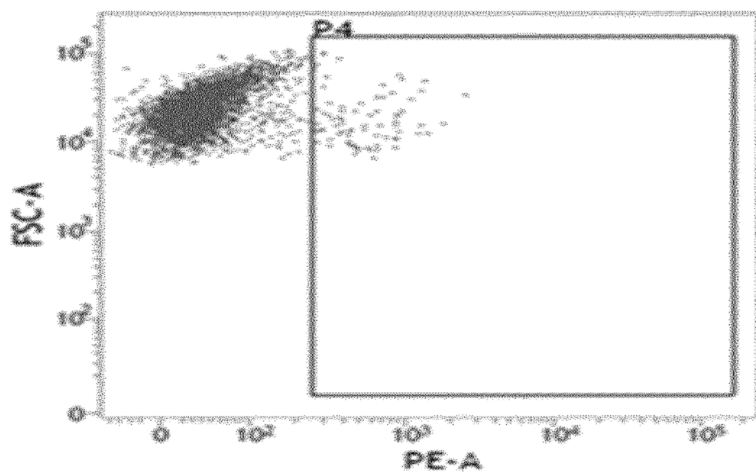


Figura 7C

c- KM + Sobrenad. de LjLa1

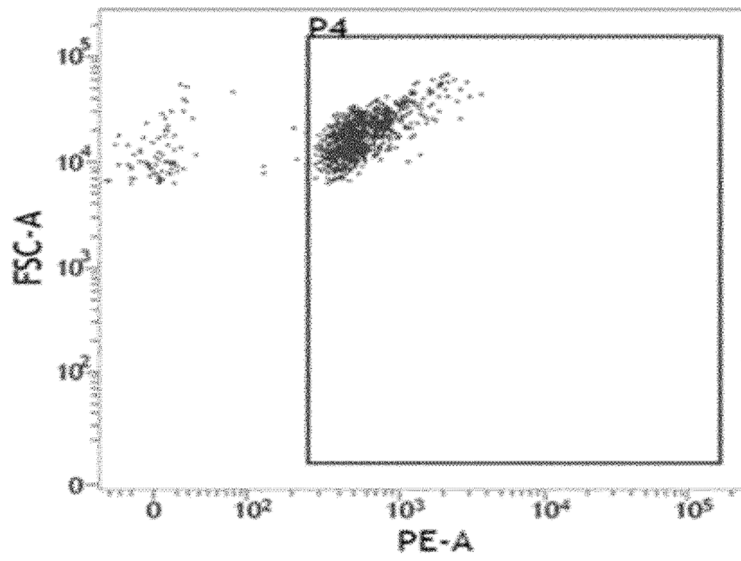


Figura 7D

d- KM + Sobrenad. de LjLa1 + bilis

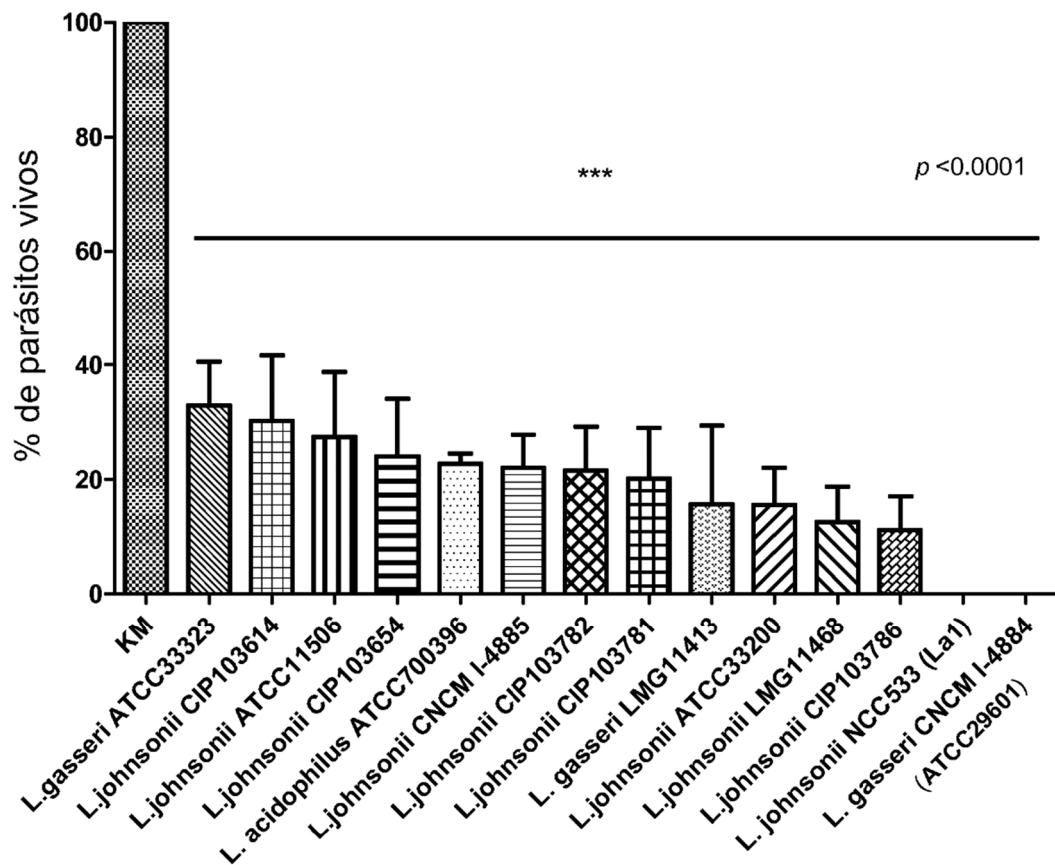


Figura 8

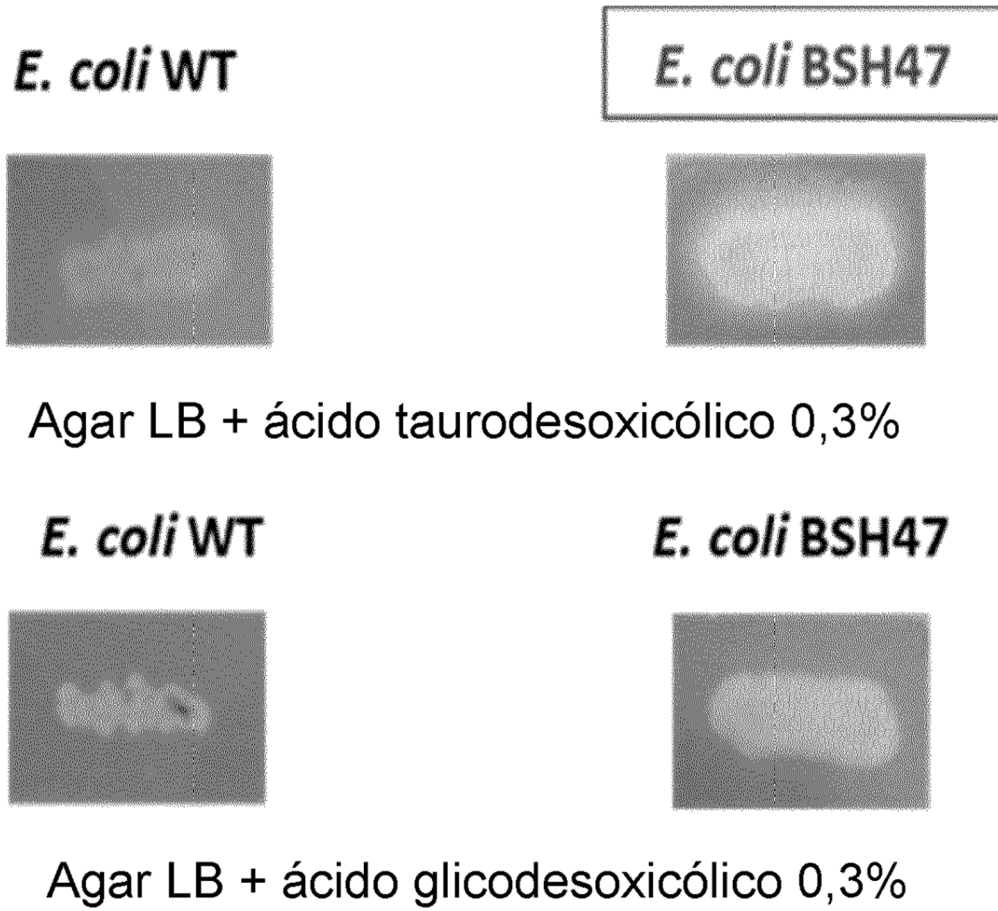


Figura 9

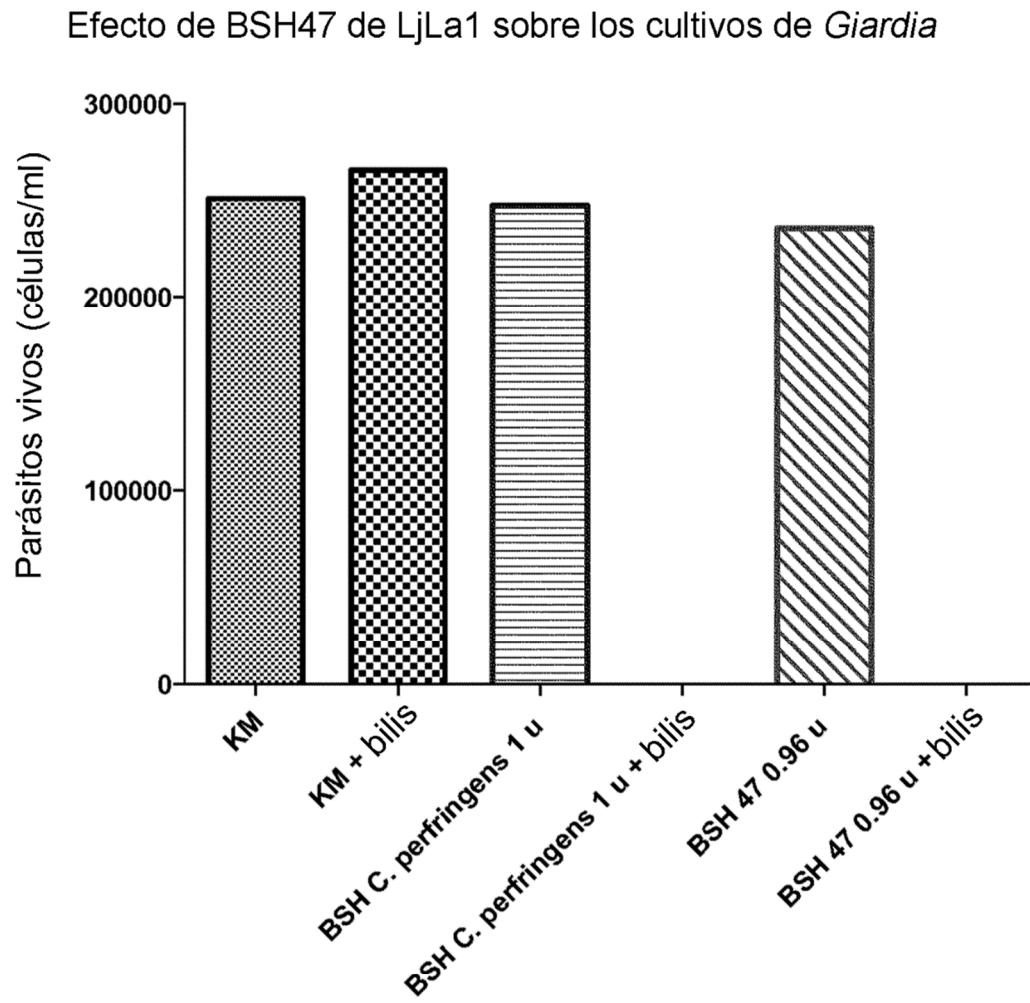


Figura 10

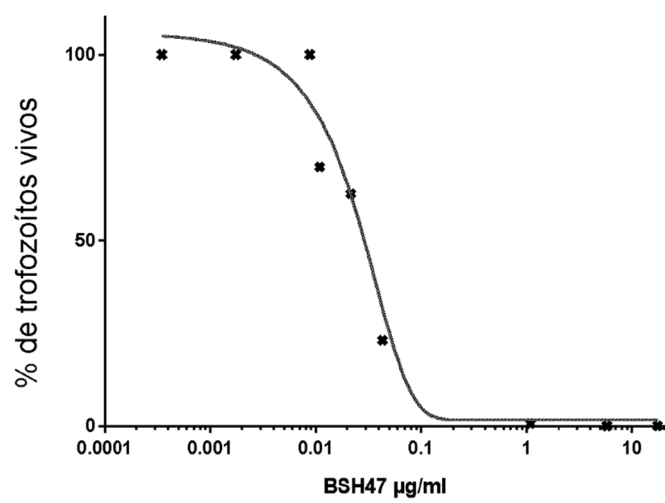


Figura 11A

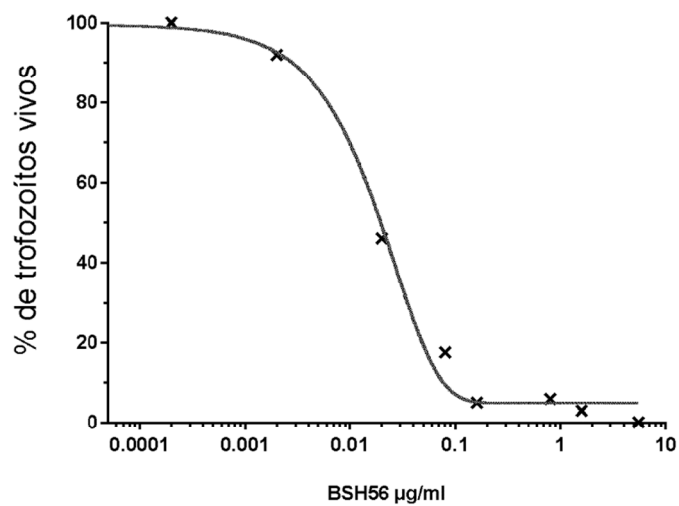


Figura 11B

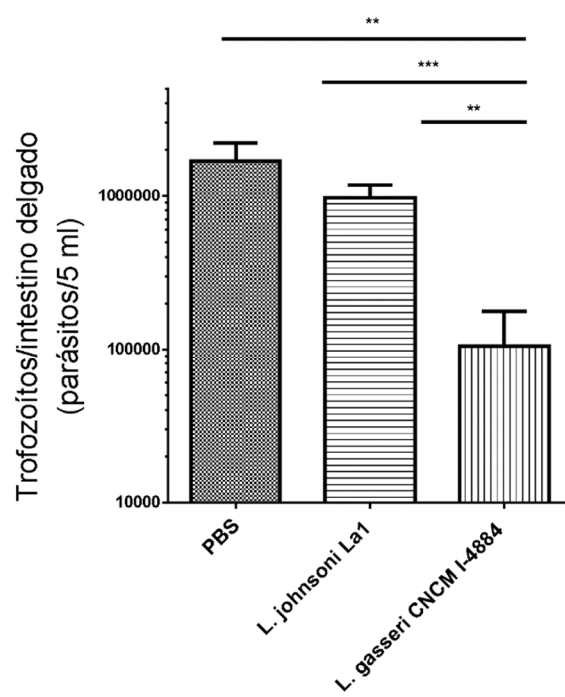


Figura 12A

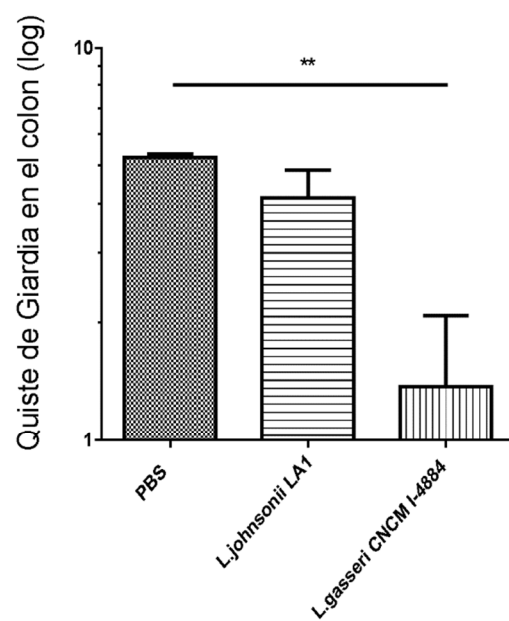


Figura 12B

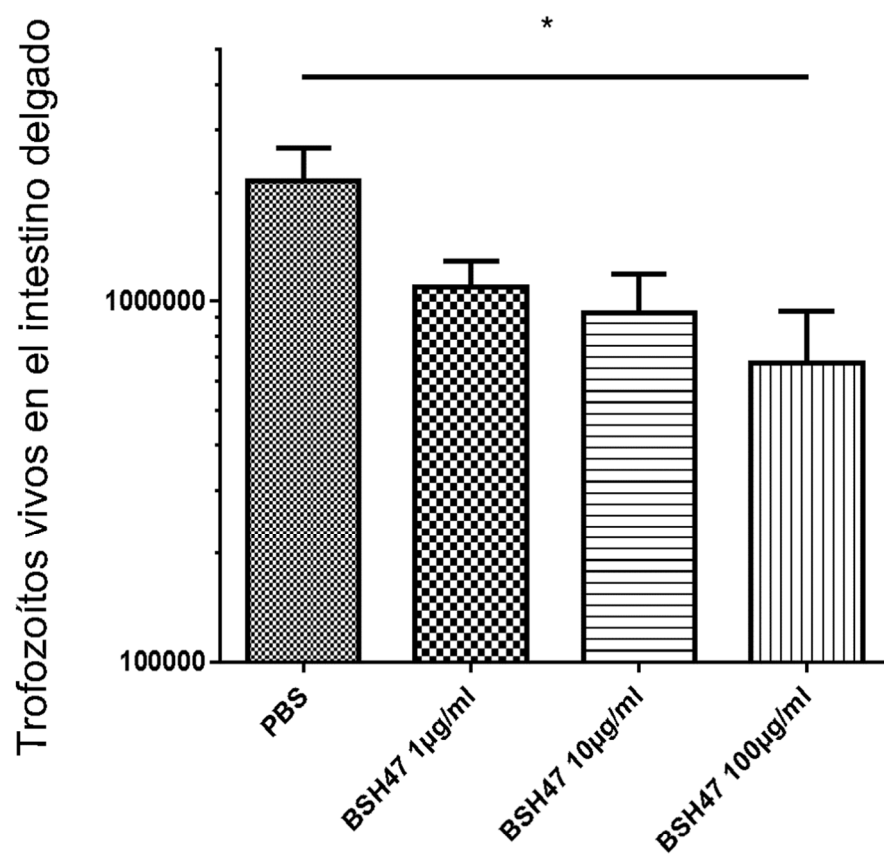


Figura 13