



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 343 499**

② Número de solicitud: 200703427

⑤ Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **24.12.2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2010**

Fecha de la concesión: **31.05.2011**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **10.06.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**10.06.2011**

⑦ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, nº 117  
28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Sánchez Sánchez, Ester;  
Palma, Giada de;  
Nalda Giménez, Inmaculada;  
Medina, Marcela Susana y  
Sanz Herranz, Yolanda**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

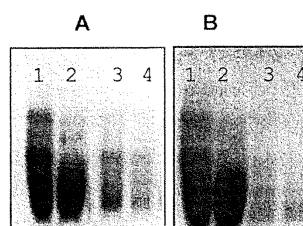
⑤ Título: **Microorganismos para mejorar el estado de salud de individuos con desórdenes relacionados con la ingesta de gluten.**

⑦ Resumen:

Microorganismos para mejorar el estado de salud de individuos con desórdenes relacionados con la ingesta de gluten.

La presente invención aporta una nueva cepa del género *Bifidobacterium*, sus componentes celulares, moléculas secretadas y compuestos metabólicos y las combinaciones de éstos entre sí y con otras bifidobacterias y bacterias lácticas en forma de diversos preparados (alimentos funcionales y nuevos alimentos, probióticos, simbióticos, suplementos, nutracéuticos, y formulaciones farmacéuticas) destinados a la reducción de riesgos y mejora del estado de salud de los pacientes que sufren enfermedad celíaca y otros desórdenes asociados a la ingesta de gluten. Sus mecanismos de acción incluyen: (i) la regulación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa; (ii) la reducción de la concentración de epitopos tóxicos en la luz intestinal; (iii) el fortalecimiento de la función barrera defensiva frente a bacterias perjudiciales, y (iv) el aporte de actividades enzimáticas que favorecen la digestión.

FIGURA 1



ES 2 343 499 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Microorganismos para mejorar el estado de salud de individuos con desórdenes relacionados con la ingesta de gluten.

## Sector de la técnica

La presente invención pertenece al sector de la Industria Alimentaria y Farmacéutica. Más concretamente, esta invención se enmarca dentro del campo de los probióticos y productos derivados en forma de alimentos funcionales y nuevos alimentos, probióticos, simbióticos, nutracéuticos o suplementos alimentarios y formulaciones farmacéuticas con aplicaciones clínicas.

## Estado de la técnica

La enfermedad celíaca es una enteropatía, afección del intestino, de carácter autoinmune causada por la intolerancia permanente a las proteínas del gluten de los cereales, que padecen los individuos genéticamente predispuestos. El espectro clínico de la enfermedad es amplio e incluye formas típicas, atípicas, silentes y potenciales. Las formas típicas se presentan con mayor frecuencia durante los primeros años de vida (6-24 meses) y cursan con sintomatología principalmente intestinal y alteraciones asociadas (malabsorción, diarrea crónica, pérdida de peso, distensión abdominal, retraso en el crecimiento, etc.). Actualmente es la enfermedad crónica más común, con una prevalencia del 0,7 al 2,0% en la población general y del 15 al 20% en familiares de primer grado (Book *et al.* 2003. Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families. *Am J Gastroenterol.* 98:377-81; Fasano y Catassi. 2005. Coeliac disease in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 19: 467-78). Además, la ingesta de gluten y la enfermedad celíaca está asociada al desarrollo de otros desórdenes como por ejemplo el síndrome de Down, la diabetes mellitus tipo 1, la dermatitis herpetiforme, la miopatía, la esclerosis múltiple, la artritis, el autismo, la esquizofrenia, la depresión, los linfomas, y la ataxia (Hernández y Green. 2006. Extraintestinal manifestations of celiac disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 8:383-9). La relación entre la ingesta de gluten y las alteraciones psiquiátricas, neurológicas y del comportamiento se considera fruto de la generación de péptidos bioactivos, como por ejemplo las exorfinas que poseen actividad opioide (De Santis 1997. Schizophrenic symptoms and SPECT abnormalities in a coeliac patient: regression after a gluten-free diet. *J Intern Med.* 242: 421-3).

Las proteínas del gluten (gliadinas y prolaminas análogas y gluteninas) constituyen el principal factor ambiental desencadenante de la enfermedad celíaca y otros desórdenes asociados. Estas proteínas contienen secuencias peptídicas ricas en prolina y glutamina, que las hace más resistentes a las enzimas digestivas que otras proteínas de la dieta, pudiendo persistir en la luz intestinal. En individuos susceptibles, estos péptidos son responsables de una reacción anómala que implica tanto a la inmunidad innata como adaptativa y que, globalmente, origina inflamación crónica de la mucosa intestinal, aumento de los linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de las criptas, y un deterioro progresivo de las vellosidades intestinales e incluso su desaparición total. Los péptidos tóxicos generados tras la ingestión del gluten atraviesan el epitelio intestinal y son reconocidos por las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 de las células presentadoras de antígenos, preferentemente tras su desamidación por acción de la transglutaminasa tisular. Así son presentados a los receptores de las células T produciendo su activación. Esto supone la expresión del antígeno CD4, llamado también helper (Th), y su diferenciación en subpoblaciones, implicando así a la inmunidad adquirida. La subpoblación Th2 interactúa con las células B que se diferencian en células plasmáticas y producen anticuerpos anti-gliadina, anti-endomisio y anti-transglutaminasa tisular. La subpoblación Th1 es la responsable de un aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (principalmente IFN- $\gamma$ ) y de la relación IFN- $\gamma$ /IL-10 (Salvati *et al.* 2005. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in *ex vivo* cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut.* 54:46-53). Los péptidos del gluten también pueden desencadenar una respuesta en el epitelio intestinal mediada por la citoquina IL-15, involucrando a la inmunidad innata (Green y Jabri 2006. Celiac disease. *Annu Rev Med.* 57:207-21). Las gliadinas ingeridas estimulan la producción de IL-15 en las células epiteliales, lo que favorece la expansión clonal de los linfocitos T CD8 intraepiteliales citotóxicos y la expresión de IFN- $\gamma$  (Jabri *et al.* 2000. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology.* 118:867-79; Mention *et al.*, 2003. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology.* 125:730-45; Forsberg *et al.* 2007. Concomitant increase of IL-10 and pro-inflammatory cytokines in intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Int Immunol.* 2007;19, 993-1001). La composición de la microbiota intestinal de pacientes celíacos también presenta un desequilibrio en relación a la de controles sanos, caracterizado por un predominio de bacterias potencialmente pro-inflamatorias y alteraciones en la composición en especies de bacterias acidolácticas y bifidobacterias (Sanz *et al.*, 2007. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 51(3):562-8. Nadal *et al.*, 2007. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol.* DOI 10.1099/jmm.0.47410-0). En la luz y epitelio intestinal, la combinación del gluten con un aumento de bacterias perjudiciales puede actuar como desencadenante o bien favorecer el proceso patológico y las reacciones pro-inflamatorias en casos de enfermedad celíaca activa, así como en otros trastornos asociados. Asimismo, la presencia o ausencia de determinadas especies bacterianas puede favorecer o proteger frente a la toxicidad del gluten.

La enfermedad celíaca presenta una elevada incidencia y severidad; sin embargo, actualmente no existe ninguna terapia para estos pacientes. La única alternativa es el mantenimiento de por vida de una dieta estricta exenta de gluten. Su seguimiento es difícil, los enfermos siguen sufriendo sintomatología gastrointestinal, deficiencias nutritivas

y mayores riesgos de salud (enfermedades autoinmunes, osteoporosis, infertilidad, cáncer, etc.) y el equilibrio de su ecosistema intestinal no se restablece totalmente (Nadal *et al.*, 2007. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol*. DOI 10.1099/jmm.0.47410-0). Además, los individuos que presentan enfermedad celiaca refractaria (5-10%) no responden a esta pauta dietética.

5

Las alternativas terapéuticas o coadyuvantes que actualmente se encuentran en fase de investigación para el tratamiento de la enfermedad celiaca incluyen la administración oral de enzimas proteolíticas obtenidas a partir de plantas o microorganismos para acelerar la digestión gastrointestinal de los péptidos del gluten (Shan *et al.* 2005. Enzyme treatment of foodstuffs for Celiac Sprue. 20050249719/A1; Marti *et al.* 2006. Prolyl endopeptidase mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten. 20060286601/A1; Stepniak y Koning. 2006. Enzymatic gluten detoxification: the proof of the pudding is in the eating! *Trends Biotechnol.* 24:433-4; Gass *et al.* 2007. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology.* 133:472-80). Su efectividad se ha demostrado en sistemas modelo utilizando preparaciones de proteínas y péptidos o sus equivalentes recombinantes, pero aún se requiere la realización de estudios que demuestren su efectividad *in vivo* en individuos que ingieren gluten tal y como está presente en los alimentos. Pese a las posibles bondades de esta terapia como adyuvante a la dieta exenta de gluten, sus efectos serán altamente dependientes del momento de la ingesta del preparado enzimático. Otra propuesta similar es la administración por vía oral de lactobacilos con actividad proteolítica frente a los péptidos del gluten (Bronstad *et al.*, 2004. Composition for lowering the concentration of intestinal pathogenic peptides. US 20040247581 ó PCT/NO02/00354). Sin embargo, la eficacia de esta estrategia sólo se basa en la reducción de la concentración de éstos péptidos sin abordar ningún otro aspecto como los posibles efectos inmunológicos. Como demuestran los últimos trabajos científicos, en individuos de riesgo se debe demostrar la ausencia de reacciones inmunes adversas derivadas del uso de lactobacilos (Ezendam y van Loveren. 2007. Lactobacillus casei Shirota administered during lactation increases the duration of autoimmunity in rats and enhances lung inflammation in mice. *Br J Nutr.* 31-8). Otras alternativas propuestas incluyen el desarrollo de compuestos inhibidores de la transglutaminasa tisular (Khosla *et al.*, 2006. Transglutaminase inhibitors and methods of use thereof WO2007025247), anticuerpos capaces de capturar los péptidos de las gliadinas (Fox, 2007. Antibody therapy for treatment of diseases associated with gluten intolerance. 20070184049/A1), compuestos que bloqueen los sitios de unión de los péptidos del gluten a las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 (Sollid *et al.* 2007. Drug therapy for Celiac Sprue. 20070161572/A1); Peakman y Chicz. 2007. Peptide epitopes recognized by disease promoting CD4+ T lymphocytes. 20070142622/A1), antagonistas de citoquinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  (Maroun *et al.*, 2007. Interferon antagonists useful for the treatment of interferon related diseases. 20070160609/A1), la administración de citoquinas reguladoras recombinantes (Salvati *et al.*, 2005. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in *ex vivo* cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut.* 2005; 54:46-53), inhibidores de moléculas de adhesión implicadas en las reacciones inflamatorias, y antagonistas de la zonulina responsable de los aumentos en la permeabilidad paracelular (Paterson y Ginski. 2007. Formulations for a tight junction effector US20070196501/A1; Sollid y Khosla. 2005. Future therapeutic options for celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2:140-7; Paterson *et al.* 2007. The safety, tolerance, pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of single doses of AT-1001 in coeliac disease subjects: a proof of concept study. *Aliment Pharmacol Ther.* 26:757-66). Estas estrategias suponen la modificación de moléculas implicadas en múltiples procesos biológicos por lo que su manipulación puede dar lugar a efectos secundarios no deseados. En el campo agroalimentario se están desarrollando estrategias para evitar la presencia de epitopos tóxicos en los alimentos que ingerimos mediante la manipulación genética de determinadas variedades de trigo y la utilización de enzimas y bacterias lácticas dotadas de actividad proteolítica durante los procesos de fermentación de cereales que degraden los epitopos tóxicos. De este modo, se pretende introducir mejoras en la dieta de los pacientes celíacos y proporcionarles una mayor variedad de productos pero sin prevenir o tratar la enfermedad (Rizzello *et al.* 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol.* 73:4499-507).

50

El uso de cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* como probióticos o preparados farmacéuticos para el tratamiento y prevención de la enfermedad celiaca y los desórdenes asociados no se han propuesto con anterioridad y es la base de la presente invención. Las ventajas de bifidobacterias específicamente seleccionadas para este fin son múltiples. Las bifidobacterias tienen una capacidad especial para colonizar el tracto intestinal de los recién nacidos, contribuyendo de forma significativa al desarrollo de sus defensas (inmunológicas y de otra naturaleza) y a la tolerancia oral a los antígenos de la dieta. Este grupo bacteriano es uno de los constituyentes mayoritarios de la microbiota intestinal en los primeros años de vida, especialmente en niños que reciben lactancia materna (representando hasta el 91%; (Harmsen, *et al.* 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-feed and formula-feed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: 61-67; Biavati, *et al.* 2001. The family Bifidobacteriaceae. In: Dworkin, *et al.* (eds.), *The Prokaryotes*. pp. 1-70. Springer, Nueva York). A su vez, la lactancia materna parece ejercer un efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad celiaca en la infancia que puede estar asociado con la protección ejercida por las bifidobacterias intestinales. Los integrantes de este género poseen una maquinaria enzimática especialmente adaptada para co-existir en intestino aportando nutrientes esenciales al hospedador (Klijin *et al.* 2005. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 29:491-509). Asimismo, las cepas del género *Bifidobacterium* se consideran globalmente inductoras de respuestas inmunológicas reguladoras, con un carácter menos pro-inflamatorio que los lactobacilos (Zeuthen *et al.* 2006. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 13(3):365-75). La estrategia propuesta, basada en una selección específica de bifidobacterias para elaborar formulaciones destinadas a mejorar el estado de salud y riesgos de individuos con enfermedad celíaca y otros desórdenes asociados a la ingesta de gluten, es por tanto una alternativa idónea a las propuestas con anterioridad.

65

## Descripción de la invención

### Descripción breve de la invención

5 La presente invención aporta una nueva cepa del género *Bifidobacterium* (IATA-ES1), sus componentes celulares, moléculas secretadas y compuestos resultantes de su metabolismo y las combinaciones de éstos entre sí y con otros microorganismos, en forma de preparados destinados a la reducción de riesgos y mejora de la salud y calidad de vida de individuos celíacos y con otros desórdenes asociados a la ingesta de gluten (alergia, autismo, ataxia, diabetes, esclerosis múltiple, etc.).

10 La bifidobacteria objeto de la invención, *Bifidobacterium* IATA-ES1, fue aislada a partir de heces de lactantes sanos e identificadas por secuenciación del gen del ARNr 16S. La nueva cepa posee propiedades inmunomoduladoras deseables para regular las respuestas pro-inflamatorias de tipo Th1 características de la enfermedad celíaca y enfermedades asociadas (esclerosis múltiple, diabetes, ataxia, etc.), así como de las reacciones alérgicas de tipo Th2 que pueden originarse como consecuencia de la ingesta de proteínas de trigo y otros cereales. La cepa se caracterizan por inducir baja producción de la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  y de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 y alta producción de las citoquinas reguladoras IL10 y TGF- $\beta$  en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). El perfil de citoquinas inducido por esta cepa no es una característica común a todas las bifidobacterias y bacterias lácticas intestinales humanas y la hace especialmente idónea para modular la anómala respuesta inmune que originan las proteínas del gluten en individuos susceptibles. Su combinación con otros microorganismos como por ejemplo la cepa *B. longum* ATCC15707 puede potenciar la síntesis de la citoquina reguladora IL-10 beneficiosa para controlar el proceso de inflamación característico de estas patologías. Las bacterias no viables (inactivadas por diversos procedimientos como calor, congelación-descongelación, radiación, etc.) mantienen las características inmunomoduladoras.

25 Esta cepa es capaz de transportar e hidrolizar los péptidos del gluten responsables de estos desórdenes reduciendo la concentración de los epitopos tóxicos y su poder patogénico. La bifidobacteria objeto de la patente posee peptidasas específicas para hidrolizar sustratos que contienen prolina comunes en las proteínas del gluten. La combinación de cepas de bifidobacterias que poseen peptidasas de distinta especificidad permite que se complemente su acción, favoreciendo la degradación de epitopos tóxicos. Las combinaciones de bifidobacterias con otros microorganismos como *Lactococcus lactis* NCD0712, que posee una proteinasa anclada a la superpie celular, también potencia los efectos hidrolíticos debidos exclusivamente a la acción de las bifidobacterias.

35 La cepa objeto de la invención es capaz de modular la respuesta inmune provocada por los péptidos del gluten mediante: (i) la inducción de la síntesis de citoquinas reguladoras (IL-10), (ii) la reducción de la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-8 e IL-15 derivadas de la respuesta inmune innata y adaptativa y (iii) la inhibición de vía pro-inflamatoria mediada por el factor nuclear  $\kappa$ B (Ejemplo 3, Tabla 3).

40 La cepa objeto de la invención y los compuestos derivados de esta son capaces de inhibir bacterias patógenas asiladas de la microbiota intestinal de celíacos, con potencial pro-inflamatorio y factores de virulencia favoreciendo el restablecimiento del equilibrio intestinal (Ejemplo 4, Tablas 4 y 5). Estas cepas además son capaces de inhibir la respuesta pro-inflamatoria de las bacterias intestinales de paciente celíacos activos y con dieta exenta de gluten, reduciendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  y activando la de citoquinas reguladoras (IL-10).

45 Las bifidobacterias objeto de la invención poseen actividades metabólicas (por ejemplo: fosfatasa, esterasa, lipasa, galactosidasa, glucosidasa y N-acetil-glucosaminidasa) que favorecen la digestión de nutrientes y mejoran el síndrome de malabsorción y desnutrición propio de pacientes celíacos.

50 La cepa objeto de la presente invención poseen capacidad de adhesión a mucina (1-4%) y es estable en las condiciones de estrés gastrointestinal (pH ácido y alta concentración de bilis; Ejemplo 5, Tabla 6 y Tabla 7) y en las condiciones de los procesos tecnológicos de conservación y elaboración de alimentos (refrigeración, liofilización, fermentación, etc.). *In vivo* es capaz de sobrevivir el tránsito intestinal en humanos tras su administración por vía oral. Todas estas propiedades garantizan su persistencia y efectividad prolongada en el intestino y su uso como probióticos y simbióticos (combinaciones de pro y pre-bióticos). También garantizan su uso en forma de alimentos funcionales, alimentos nuevos, suplementos, nutracéuticos, y fármacos para la reducción de riesgos y mejora del estado de salud y calidad de vida de los sujetos con enfermedad celíaca así como el de otros trastornos asociados a la ingesta de gluten.

### 60 Descripción detallada de la invención

El objeto de la presente invención es un microorganismo útil para la producción de formulaciones que reduzcan los riesgos y mejoren el estado de salud de sujetos que padecen o son susceptibles de padecer desórdenes relacionados con la ingesta de gluten mediante diversos mecanismos de acción, caracterizado por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado y seleccionado de la flora intestinal natural de individuos sanos por sus propiedades antiinflamatorias y reguladoras, en adelante microorganismo objeto de la presente invención.

Sus múltiples mecanismos de acción incluyen por ejemplo, y sin que limite el alcance de la invención: (i) la regulación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa ocasionada por los péptidos tóxicos e inmunogénicos del gluten; (ii) la reducción de la concentración de epitopos tóxicos en la luz intestinal mediante el transporte e hidrólisis de los péptidos del gluten; (iii) el fortalecimiento de la función barrera defensiva frente a bacterias pro-inflamatorias y con factores de virulencia aisladas del tracto gastrointestinal de los pacientes celíacos, y (iv) el aporte de actividades enzimáticas, adicionales a las peptidasas, que favorecen la digestión y aporte de nutrientes en síndromes de malabsorción típicos de estos pacientes. Este microorganismo podría ejercer efectos beneficiosos adicionales a los mencionados, de manera ilustrativa y sin que limite el alcance de la invención, reduciendo el estrés oxidativo asociado a la inflamación, regulando la permeabilidad intestinal, favoreciendo la colonización de bacterias beneficiosas Gram-positivas con funciones protectoras, regulando la función de células presentadoras de antígenos, inhibiendo la interacción de los péptidos tóxicos con las células epiteliales e inmunocompetentes del hospedador, interaccionando con las metaloproteasas, regulando el ciclo celular y la apoptosis, regulando el crecimiento y la diferenciación celular y regulando las funciones neuroendocrinas. (De Stefano *et al.*, 2007. Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. *Eur J Pharmacol.* 2;566 (1-3):192-9; Silano *et al.*, 2007. A decapeptide from durum wheat prevents celiac peripheral blood lymphocytes from activation by gliadin peptides. *Pediatr Res.* 61(1):67-71; Gross *et al.* 2007. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 3(7):918-32).

El microorganismo objeto de la presente invención consiste esencialmente en cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium*. Las ventajas de las bifidobacterias específicamente seleccionadas para la formulación de alimentos, alimentos nuevos, probióticos, simbióticos, suplementos, nutracéuticos, y formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de la enfermedad celíaca y los desórdenes asociados son múltiples. Las bifidobacterias tienen una habilidad especial para colonizar el tracto intestinal de los recién nacidos, contribuyendo de forma significativa al desarrollo de sus defensas (inmunológicas y de otra naturaleza) y a la tolerancia oral a los antígenos de la dieta tal y como se ha puesto de manifiesto en estudios realizados por ejemplo con *Bifidobacterium breve* UCC2003 (Fujii *et al.*, 2006. *Bifidobacterium breve* enhances transforming growth factor beta1 signalling by regulating Smad7 expression in preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Jul;43(1):83-8), con *Bifidobacterium longum* BB536 (Iwabuchi *et al.*, 2007. *In vitro* Th1 cytokine-independent Th2 suppressive effects of bifidobacteria. *Microbiol Immunol.* 2007;51 (7):649-60); así como con otras especies y distintas cepas de la misma especie de este género (Young *et al.* 2004. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11(4):686-90).

Este grupo bacteriano es uno de los constituyentes mayoritarios de la microbiota intestinal en los primeros años de vida favorecido por la lactancia materna (representando hasta el 91%; (Harmsen, *et al.* 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-feed and formula-feed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30: 61-67; Biavati, *et al.* 2001. The family Bifidobacteriaceae. In: Dworakin, *et al.* (eds.), *The Prokaryotes*. pp. 1-70. Springer, Nueva York). A su vez, la lactancia materna ejerce un efecto protector frente al desarrollo de la enfermedad celíaca en la infancia que puede estar asociado con la protección ejercida por las bifidobacterias intestinales frente al desarrollo de otras enfermedades de base inmunológica; como por ejemplo las enfermedades atópicas, cuya incidencia se ha asociado a una reducción en la población de bifidobacterias (Kalliomäki *et al.*, 2001. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol.* 107:129-34). Los integrantes de este género poseen una maquinaria enzimática especialmente adaptada para co-existir en intestino aportando nutrientes esenciales al hospedador (Klijn *et al.* 2005. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 29:491-509). Asimismo, las cepas del género *Bifidobacterium* se consideran globalmente inductoras de respuestas inmunológicas reguladoras, con un carácter menos pro-inflamatorio que los lactobacilos y otras bacterias comensales (Zeuthen *et al.* 2006. Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 13 (3):365-75.). La administración de bifidobacterias también regula la permeabilidad del epitelio intestinal reduciendo las posibilidades de acceso de patógenos y antígenos de la dieta, según se ha visto en trabajos realizados por ejemplo con niños prematuros alimentados con fórmulas infantiles suplementadas con *Bifidobacterium lactis*: la incorporación de esta bifidobacteria contribuyó a reducir significativamente la permeabilidad intestinal (Stratiki *et al.*, 2007. The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. *Early Hum Dev.* 83(9):575-9).

Las evidencias anteriormente expuestas, ponen de manifiesto la importancia del género *Bifidobacterium* para el adecuado funcionamiento de la fisiología intestinal incluyendo los procesos digestivos y defensivos (inmunológicos y no inmunológicos) involucrados en la tolerancia (ausencia de respuesta patológica) a las proteínas del gluten, o lo que es lo mismo, cómo estas bacterias pueden evitar el desarrollo de trastornos asociados a la ingesta de gluten, cuestión que resulta generalizable a las diferentes especies y cepas del género *Bifidobacterium*.

Un objeto particular de la presente invención consiste en que el microorganismo pertenece a la especie *Bifidobacterium longum*. Como ejemplo, y sin que limite el alcance de la invención, la cepa ha sido aislada a partir de heces de lactantes sanos e identificadas por secuenciación del gen del ARNr 16S (Ejemplo 6). El fragmento secuenciado (1437 bases) se amplificó por PCR utilizando los cebadores 27f y 1401r y para la secuenciación se emplearon además los cebadores 530f y U-968f de acuerdo con los procedimientos descritos por otros autores (Satokari *et al.*, 2001. Bifidobacterial Diversity in Human Feces Detected by Genus-Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504-513; Favier *et al.* 2002. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial

## ES 2 343 499 B1

Communities in Human Neonates. Appl. Environ. Microbiol. 68, 219-226). Mediante el alineamiento de la secuencia obtenida con las existentes en las bases de datos (GenBank) se detectó máxima similitud con las secuencias equivalentes de 14 cepas distintas de la especie *B. longum* y entre ellas *Bifidobacterium longum* BG3 (número de acceso AY735403.1).

5

De esta manera se evidencia que *B. longum* presenta propiedades idóneas para la aplicación del objeto de la invención de manera análoga a como otras cepas de este género y especie podrían hacerlo, ejerciendo los mismos efectos beneficiosos en individuos con trastornos asociados a la ingesta de gluten.

10 En otro objeto particular de la presente invención el microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza por ser una cepa de bacteria que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* (IATA-ES1) Un cultivo de *Bifidobacterium* IATA-ES1 ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con sede en Burjassot (Valencia), el día 20 de diciembre de 2007, correspondiéndole el número de depósito CECT 7347. Esta cepa pertenece a la especie *B. longum* de acuerdo con la homología de la secuencia del gen del ARNr 16S con otras actualmente  
15 disponibles en las bases de datos (GenBank), como se describe en el ejemplo 6. Ésta constituye un ejemplo, a modo ilustrativo sin que limite el alcance de la invención, de una cepa del género *Bifidobacterium* que posee las propiedades y aplicaciones objeto de la presente invención, lo que se puede hacer extensivo a otras cepas y especies de este género.

20 Otro objeto adicional lo constituye el microorganismo de la presente invención caracterizado porque se puede combinar con otros microorganismos para mejorar sus propiedades protectoras y metabólicas mediante acciones sinérgicas o complementarias, como el aumento de la síntesis total de citoquinas reguladoras y sus tipos, el aumento de la capacidad inhibitoria frente a bacterias patógenas, y el aumento del aporte de peptidasas y otras enzimas que favorezcan la digestión incrementando su concentración total o aumentando su tipo y especificidad.

25 Otro objeto de la presente invención comprende la combinación de bifidobacterias con otros microorganismos, de forma complementaria y/o sinérgica, favoreciendo las respuestas inmunoregulatoras y la degradación de péptidos tóxicos e inmunogénicos del gluten. Como ejemplo de microorganismos, la cepa *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 puede reforzar el efecto inmunomodulador de la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1 debido a su alta capacidad para inducir la síntesis de IL-10 como se demuestra en la tabla 1 (Ejemplo 1); esta acción complementaría además la de la inducción de TGF- $\beta$  sólo producida por la segunda cepa (Tabla 1, ejemplo 1). Por otro lado, la cepa *Lactococcus lactis* NCD0712 puede complementar e intensificar la degradación de los péptidos del gluten debida a las bifidobacterias y así reducir la concentración de epitopos tóxicos del gluten y sus daños intestinales y extraintestinales debido a que posee, además de peptidasas intracelulares, actividad proteolítica extracelular. La intensificación de la actividad proteolítica se demuestra en el ejemplo 2 y en la figura 1, en la que se puede apreciar una desaparición casi total de las bandas de proteína tras la incubación conjunta de los digeridos de gliadinas con suspensiones celulares de *Bifidobacterium* IATA-ES1 y *Lactococcus lactis* NCD0712 (Figura 1, panel B, carreras 3 y 4). Esta hidrólisis fue superior a la obtenida sólo con la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1 (Figura 1, panel A carreras 3 y 4).

40 Otro objeto particular de la presente invención consiste en la utilización del microorganismo objeto de la presente invención así como de sus equivalentes no viables inactivados por distintos procedimientos (congelación, calor, radiación, etc.) con fines inmunomoduladores.

45 El microorganismo no viable inactivado por distintos procedimientos (congelación, calor, radiación, etc.) sigue pudiéndose utilizar con fines inmunomoduladores. Los efectos inmunomoduladores de las bifidobacterias son ejercidos, al menos en parte, por constituyentes estructurales (ADN, componentes de la pared celular, etc.). Esto hace posible que las bifidobacterias mantengan parte de sus propiedades inmunomoduladoras sin que mantengan necesariamente la viabilidad (Lammers *et al.*, 2003. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 38: 165-72). Así, en el  
50 ejemplo 3 y en la tabla 3, se demuestra que suspensiones celulares de la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1, inactivada mediante ciclos de congelación y descongelación, pueden modular la respuesta proinflamatoria desencadenada por las gliadinas cuando se con-incuban con células mononucleares de sangre periférica, reduciendo la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo IFN- $\gamma$ ) y aumentando la síntesis de citoquinas reguladoras (por ejemplo IL-10).

55 Además, los compuestos estructurales, resultantes del metabolismo, moléculas secretadas del microorganismo objeto de la presente invención, obtenidos por técnicas que pueden ser llevados a cabo por un experto medio del área y combinaciones de los mismos, pueden ser también utilizables. Por ejemplo técnicas físico-químicas y biotecnológicas entre las que se encuentran la centrifugación, filtración, liofilización, precipitación, sonicación, disrupción celular  
60 mecánica y química, extracción de compuestos a partir de cultivos con enzimas y/o agentes químicos, la separación por técnicas cromatográficas a partir del microorganismo objeto de la presente invención y la clonación de los genes que codifican dichos compuestos y su sobre-expresión.

65 En el ejemplo 1 y tabla 1 se demuestra que los componentes estructurales que forman parte de la envoltura celular de las bifidobacterias son responsables al menos en parte de la inducción de la producción de citoquinas reguladoras (IL-10 e TGF- $\beta$ ). En el ejemplo 3 y tabla 3 en el que se han co-incubado digeridos de gliadinas y suspensiones de células no viables de la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1 se demuestra también que componentes estructurales de estas células son capaces de reducir la respuesta pro-inflamatoria ocasionada por las gliadinas y de aumentar la síntesis

de citoquinas reguladoras (IL-10). Asimismo, componentes estructurales, metabolitos y sustancias secretadas por la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1 ejercen un efecto inhibitor sobre el crecimiento de patógenos aislados de celíacos, tal y como se demuestra en el ejemplo 4 y tabla 4. En dicho ejemplo se ha evaluado el efecto inhibitor de cultivos celulares de esta cepa mediante la técnica de la doble capa en la que tanto las células como los metabolitos y productos secretados se ponen en contacto con el microorganismo patógeno, de modo que los efectos inhibidores pueden deberse a la acción sinérgica de todos estos componentes. Además, se ha evaluado el efecto inhibitor de los metabolitos y compuestos secretados por la bifidobacteria al medio de cultivo utilizando como agente inhibitor los sobrenadantes de cultivo libres de células, previamente liofilizados. Así, se ha demostrado que los compuestos liberados al medio de cultivo ejercen un efecto inhibitor frente a patógenos aislados de celíacos (Tabla 5).

En una realización particular de la presente invención, el microorganismo, sus componentes celulares, compuestos resultantes de su metabolismo, moléculas secretadas y sus combinaciones se caracterizan porque actúan sobre la regulación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa causada por los péptidos nocivos del gluten.

La cepa ES1 de la presente invención se ha seleccionado por sus propiedades inmunomoduladoras deseables para regular las respuestas pro-inflamatorias de tipo Th1 características de la enfermedad celíaca y enfermedades asociadas (el síndrome de Down, la diabetes mellitus tipo 1, la dermatitis herpetiforme, la miopatía, la esclerosis múltiple, la artritis, el autismo, la esquizofrenia, la depresión, los linfomas y la ataxia), así como de las reacciones alérgicas de tipo Th2 que pueden originarse como consecuencia de la ingesta de proteínas de trigo y otros cereales. Las cepas se caracterizan por inducir baja producción de la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  (por ejemplo <100 pm/ml) y de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 (por ejemplo <150 pm/ml) y alta producción de las citoquinas reguladoras IL10 (por ejemplo > 800 pm/ml) y TGF- $\beta$  (por ejemplo >50 pmol/m) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; Ejemplo 1, Tabla 1). El perfil de citoquinas inducido por estas bifidobacterias no es una característica común a todas las bifidobacterias y bacterias lácticas intestinales humanas (Ejemplo 1, Tabla 1) y la hace especialmente idónea para modular la anómala respuesta inmune que originan las proteínas del trigo en individuos predispuestos y pacientes con enfermedad activa. La detección de estos efectos inmunomoduladores mediante el uso de suspensiones celulares de la cepa seleccionada como estimulante en estos ensayos (Ejemplo 1 y tabla 1) indican que los componentes estructurales que forman parte de la envoltura celular de esta bifidobacteria son responsables al menos en parte de los mismos, incluyendo la inducción de la producción de citoquinas reguladoras (IL-10 e TGF- $\beta$ ) que pueden reducir los efectos tóxicos e inmunogénicos de los péptidos del gluten. Además, en el ejemplo 3 y tabla 3 se demuestra que el uso de suspensiones celulares de la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1 no viables (inactivadas por ciclos de congelación-descongelación) co-incubadas con digeridos de gliadinas son capaces de reducir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo INF- $\gamma$  e IL-15) ocasionada por las gliadinas y de aumentar la síntesis de citoquinas reguladoras (por ejemplo INF IL-10). Por tanto, se demuestra que componentes estructurales de las células de la bifidobacteria pueden regular las respuestas inmunológicas anómalas ocasionadas por el gluten, sin que sea estrictamente necesario el mantenimiento de la viabilidad de la bacteria.

El microorganismo objeto de la presente invención, sus componentes celulares, compuestos resultantes de su metabolismo, moléculas secretadas y sus combinaciones se caracterizan porque actúan sobre el fortalecimiento de la función barrera defensiva frente a bacterias perjudiciales, por ejemplo pro-inflamatorias y con factores de virulencia, aisladas del tracto gastrointestinal de los pacientes celíacos.

Las cepas seleccionadas son capaces de inhibir bacterias con potencial patógeno y tóxico aisladas del intestino de individuos celíacos (Ejemplo 4, Tablas 4 y 5). Dichos patógenos incluyen, entre otros, cepas de *Escherichia coli* que codifican factores de patogenicidad (por ejemplo fimbrias) y pertenecen a grupos filogenéticos virulentos (por ejemplo el B2), cepas de Bacteroides y de otros géneros productores de metaloproteasas que contribuyen a la lesión tisular, y cepas hemolíticas aisladas de biopsias duodenales. En el ejemplo 4 y tabla 4 se demuestra el efecto inhibitor de cultivos celulares totales de esta cepa frente a patógenos aislados de celíacos por la técnica de la doble capa, de modo que estos efectos pueden ser debidos a componentes estructurales, metabolitos y sustancias secretadas por la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1. En la tabla 5, se muestra además el efecto inhibitor de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de esta cepa que contienen sólo los metabolitos y compuestos secretados por la bifidobacteria a este medio. En ambos casos los halos de inhibición obtenidos con la cepa seleccionada son mayores a los obtenidos con otras cepas utilizadas con fines comparativos. Así, la cepa objeto de la patente puede contribuir al restablecimiento del ecosistema intestinal y reducir la carga antigénica de origen microbiano que favorecería el proceso inflamatorio y aumentaría la permeabilidad del epitelio. Asimismo, la cepa seleccionada es capaz de inhibir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) estimulada por la microbiota intestinal de individuos celíacos en células mononucleares de sangre periférica. Por ejemplo, concentraciones de IFN- $\gamma$  de 90,8 y de TNF- $\alpha$  de 1966,3 pmol/ml producidas por PBMCs bajo la estimulación de la microbiota de celíacos pueden ser reducidos a valores de 8,2 pmol/ml y 295,2, respectivamente, en presencia de *Bifidobacterium* IATA-H1. Esta cepa también es capaz de estimular la síntesis de citoquinas reguladoras (IL-10), reducida por el contrario por la microbiota intestinal de pacientes celíacos. Así, por ejemplo valores de IL-10 de 49,3 pmol/ml inducidos por la microbiota de celíacos pueden verse incrementados hasta valores de 107,5 pmol/ml por estimulación de la cepa *Bifidobacterium* IATA-H1. A través de este mecanismo inmunomodulador la cepa seleccionada pueden contribuir a restablecer el equilibrio intestinal y evitar la sobre estimulación provocada por la microbiota perjudicial que junto a la ocasionada por el gluten puede contribuir a que se desencadene un círculo vicioso, que perpetúe la inflamación.

En otra forma particular de realización de la presente invención el microorganismo se caracteriza por ser capaz de transportar los péptidos del gluten resultantes de la digestión gastrointestinal, reduciendo la concentración de epítopos nocivos.

5 La cepa IATA-ES1 posee capacidad para captar los péptidos tóxicos derivados de la digestión gastrointestinal de las gliadinas, tanto los productos resultantes de la digestión gástrica por acción de la pepsina (P), como intestinal por acción de la tripsina (T) y pancreatina (X) (Ejemplo 2, Figura 1). La incubación de las gliadinas en presencia de bacterias viables de las cepas seleccionadas reduce su concentración y la presencia de epítopos tóxicos determinados con el anticuerpo R5 por ELISA sándwich y por tanto sus posibles efectos nocivos en el intestino y a nivel extraintestinal. Por ejemplo, la concentración de epítopos tóxicos de un digerido de gliadinas con pepsina tripsina y pancreatina (como se indica en el Ejemplo 2) de 234 9 ppm de gluten determinados por ELISA sándwich fue reducida a 169 ppm de gluten tras ser incubado con suspensiones celulares de la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1. La capacidad de las cepas seleccionadas para captar los oligopéptidos derivados de la digestión de las gliadinas se reproduce en condiciones intestinales y en presencia de sales biliares. Esta capacidad se potencia mediante la co-incubación con *Lactococcus lactis* NCD0712 que, pese a que no llega a colonizar el intestino grueso, puede actuar como coadyuvante en las primeras etapas de la hidrólisis del gluten ingerido por acción de su proteasa anclada a la pared y otras peptidasas (Ejemplo 2, figura 1). La intensificación de la actividad proteolítica por acción de *Lactococcus lactis* NCD0712 se demuestra en la figura 1 en la que se puede apreciar una desaparición casi total de las bandas de proteína tras la incubación conjunta de los digeridos de gliadinas con suspensiones celulares de *Bifidobacterium* IATA-ES1 y *Lactococcus lactis* NCD0712 (Figura 1, panel B, carreras 3 y 4). Esta hidrólisis fue superior a la obtenida sólo con la cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1 (Figura 1, panel A carreras 3 y 4). También puede potenciarse la actividad de las bifidobacterias sobre el gluten mediante su co-incubación con proteasas y peptidasas de *Lactococcus lactis* NCD0712 en forma de extractos.

25 La cepa seleccionada *Bifidobacterium* IATA-ES1 puede modular la respuesta inmunológica anormal ocasionada por la interacción de los péptidos tóxicos del gluten con las células inmunocompetentes del individuo no sólo mediante el metabolismo de los péptidos que actúan como antígenos nocivos sino también mediante mecanismos de inmunoregulación (Ejemplo 3, Tabla 3). Las suspensiones bacterianas viables o inactivadas de las cepas seleccionadas con-incubadas con PBMCs en presencia de digeridos gastrointestinales de gliadinas son capaces de contrarrestar el efecto proinflamatorio de estas proteínas en distintas fases de la digestión, por acción de la pepsina (P) gástrica y de la tripsina (T) y pancreatina (X) intestinales. Esta cepa es capaz de inducir la reducción de la producción del IFN- $\gamma$ , de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 e IL-8 IL15 y responsables de la respuesta innata, así como de aumentar la síntesis de la citoquina reguladora IL-10 (Ejemplo 3, Tabla 3). Estos efectos son debidos al menos en parte a la inhibición de las distintas subunidades del factor nuclear (NF)  $\kappa$ B, p50, p65 (RelA), c-Rel y Rel B determinadas mediante un ensayo ELISA (Trans AM NF $\kappa$ B, Active Motive, Bélgica). La inhibición de este factor transcripcional supone la inhibición de la expresión de un gran número de genes pro-inflamatorios constituyendo un punto clave de control de los procesos de inflamación y específicamente del que se produce en la enfermedad celíaca (Jelínková *et al.*, 2004. Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. FEBS Lett. 571 (1-3):81-5).

40 El microorganismo objeto de la presente invención, sus componentes celulares junto a los compuestos resultantes de su metabolismo, moléculas secretadas y sus combinaciones se caracterizan por ser capaces de hidrolizar los péptidos del gluten mediante su actividad peptidásica, reduciendo la concentración de epítopos nocivos.

45 La cepa seleccionada posee peptidasas de amplia especificidad y con especificidad por sustratos que contienen prolina, que son muy abundantes en las gliadinas y limitan su hidrólisis por enzimas convencionales (Ejemplo 2, Tabla 2). Concretamente, la cepa seleccionada *Bifidobacterium* IATA-ES1 es una de las que posee mayor actividad iminopeptidásica (>300 U/mg proteína); asimismo, presentan actividad prolil-endopeptidasas (>8 U/mg proteína), X-prolil-dipeptidil-peptidasa (>15 U/mg proteína), prolidasa y prolinasa (>15 U/mg proteína). También poseen actividad tripeptidásica (>130 U/mg proteína frente al sustrato Gleu-Gly-Gly) y leucil-aminopeptidásica (>70 U/mg proteína). La actividad de esta cepa frente a sustratos que contienen prolina, como Pro-pNA, es superior a la detectada en otras bacterias lácticas y especialmente el cociente de actividad Pro-pNA/Leu-pNA (Di Cagno *et al.*, 2004. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Appl Environ Microbiol. 70:1088-96; De Angelis *et al.*, 2006. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. Biochim Biophys Acta. 2006 1762(1):80-93), lo que favorece la hidrólisis específica de los péptidos del gluten que poseen un alto contenido en prolina.

60 El microorganismo objeto de la presente invención, sus componentes celulares, compuestos resultantes de su metabolismo, moléculas secretadas y sus combinaciones poseen actividad metabólica adicionales a las peptidasas (por ejemplo: fosfatasa, esterasa, lipasa, galactosidasa, glucosidasa y N-acetil-glucosaminidasa) que ayudan a digerir los nutrientes que ingerimos con la dieta, y mejoran el síndrome de malabsorción y desnutrición propio de pacientes celíacos.

65 Finalmente, otra realización particular es el uso del microorganismo de la presente invención, sus componentes celulares, compuestos resultantes de su metabolismo, moléculas secretadas y sus combinaciones y la combinación con otros microorganismos, en la producción de formulaciones para la reducción de riesgos y mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten.



## ES 2 343 499 B1

Las formulaciones elaboradas mediante el microorganismo objeto de la presente invención puede desarrollarse industrialmente dando lugar a, entre otras y sin que limite el alcance de la invención, diferentes formas de presentación al consumidor: alimentos, alimentos nuevos suplementos, nutracéuticos, composiciones farmacéuticas, probióticos y/o simbióticos.

5 La cepa *Bifidobacterium* IATA-ES1 posee capacidad de adhesión (1-4%) a mucina y es resistente al pH ácido del estómago (2,0; 2,5 y 3,0) ya las altas concentraciones de sales biliares (0,5; 1,0; 2,0; y 3,0%) presentes en el intestino delgado, que constituyen las principales barreras biológicas que limitan la supervivencia de los probióticos a su paso por el tracto gastrointestinal así como durante los procesos de fermentación de alimentos y su período de almacenamiento (Ejemplo 5, Tabla 6). Por ejemplo, esta cepa mantiene una viabilidad y capacidad de crecimiento del 56-86% tras 90 min de incubación a pH 2.0-2.5. Por lo tanto, esta cepa cuenta con mayores posibilidades de sobrevivir y ser funcionales que otros aislados y así como algunos probióticos actualmente comercializadas como se observa en la Tabla 6. Esta cepa además resiste el tránsito gastrointestinal *in vivo*. Tras su administración en forma de leche fermentada durante 4 semanas a dosis de 107-108 ufc/ml en dos tomas diarias se recupera en heces y su concentración respecto a la inicial (sin ingestión de productos probióticos) aumenta al menos en 1 unidad logarítmica. Las bifidobacterias seleccionadas crecen y se mantienen viables en diversos alimentos y bebidas, constituyendo vehículos idóneos para su aporte. Por ejemplo, son capaces de fermentar y coagular la leche, podrían ser utilizadas para la elaboración de leches fermentadas y otros derivados lácteos. También resisten los tratamientos tecnológicos de producción y conservación de alimentos, suplementos y formulaciones farmacéuticas, como por ejemplo la liofilización y las temperaturas de refrigeración, lo que garantiza su explotación industrial.

Un objeto particular de la presente invención comprende el uso del microorganismo de la presente invención en la elaboración de formulaciones en forma de un alimento.

25 De esta manera el microorganismo objeto de la presente invención, formaría parte de un alimento formulado para aportar, más allá de su valor nutricional habitual, un efecto beneficioso sobre la reducción de riesgos y mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten.

30 Otro objeto particular de la presente invención comprende el uso del microorganismo objeto de la presente invención en la elaboración de preparados en forma de nutracéuticos. Definidos como sustancias naturales bioactivas presentadas en una matriz no alimenticia, que en este caso ejercería efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo sus riesgos y mejorando su estado de salud.

35 En el caso del uso del microorganismo objeto de la presente invención para la obtención de un suplemento dietético o alimentario, incluiría en su composición el microorganismo o los compuestos bioactivos derivados del mismo a fin de complementar la dieta con fines saludables y, en este caso concreto, con el fin de ejercer efectos beneficiosos sobre los pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo sus riesgos y mejorando su estado de salud.

40 Otro objeto particular de la presente invención comprende el uso del microorganismo en la elaboración de preparados farmacéuticos. De esta forma se utilizaría en la preparación de composiciones biológicamente activas, capaces de ser utilizadas como medicamentos ejerciendo un efecto beneficioso sobre la reducción de riesgos y mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten.

45 En esta ocasión, el microorganismo objeto de la presente invención se utilizaría en la preparación de probióticos y/o simbióticos (combinaciones de probióticos y prebióticos), que contendrían estos microorganismos vivos o liofilizados, mantendrían su actividad biológica en el intestino e ingeridos en cantidades adecuadas ejercerían un efecto beneficioso sobre los individuos con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo sus riesgos y mejorando su estado de salud.

50 Un último objeto particular de la presente invención sería su uso como nuevo alimento. Entendiendo como tal cualquier alimento o ingrediente que no se haya usado de forma habitual para consumo humano en la Unión Europea a partir del 15 de mayo de 1997, que ejercería efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo sus riesgos y mejorando su estado de salud.

55

### Descripción de la figura

60 Figura 1. Análisis del perfil de proteínas de las diferentes digestiones de gliadinas por SDS-PAGE. Panel A: 1) control de gliadinas tras la digestión con pepsina (G-P); 2) control de gliadinas tras la digestión con pepsina y tripsina (G-P-T); 3) G-P incubadas con *Bifidobacterium* IATA-ES1; 4) G-P-T incubadas con *Bifidobacterium* IATA-ES1. Panel B: 1) control G-P; 2) control G-P-T; 3) G-P incubadas con *Bifidobacterium* IATA-ES1 y *Lactococcus lactis* NCD0712.; 4) G-P-T incubadas con *Bifidobacterium* IATA-ES1 y *Lactococcus lactis* NCD0712.

65

**Ejemplos de realización de la invención**

## Ejemplo 1

5 *Procedimiento de selección de cepas del género Bifidobacterium en función de su capacidad para modular la producción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)*

1. *Preparación de los cultivos y sobrenadates de bifidobacterias y otras bacterias lácticas intestinales*

10 Las cepas se inocularon en 10 ml de caldo MRS (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) conteniendo un 0.05% de cisterna (MRS-C) al 1% con un cultivo de 24 h y se incubaron durante 22 h a 37°C en anaerobiosis. (AnaeroGen; Oxoid, Basingstoke, UK). Las células se recogieron por centrifugación (6,000 g, 15 min), se lavaron dos veces en PBS (10 mM sodium phosphate, 130 mM sodium chloride, pH 7.4), y se re-suspendieron en PBS conteniendo un 20% de glicerol. Alícuotas de estas suspensiones se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. El número de  
15 viables tras el ciclo de congelación-descongelación se determinó mediante recuento en placas de MRSC tras incubar 48 h. La viabilidad fue superior al 90% en todos los casos. Cada alícuota se utilizó para un solo ensayo. A fin de evaluar los efectos de bacterias muertas, algunas de las alícuotas se inactivaron por frío (3 ciclos de congelación a -20°C y descongelación) y por calor (30 min a 80°C). Los valores de pH de los sobrenadantes obtenidos se ajustaron a 7.2 con NaOH y se esterizaron por filtración (0.22- $\mu$ m tamaño de poro, Millipore, Bedford, MA) para eliminar la  
20 posible presencia de células viables. Alícuotas de los sobrenadantes libres de células se conservaron a -80°C hasta su uso.

2. *Aislamiento y estimulación de PBMCs*

25 Las PBMCs se aislaron de sangre periférica de 4 voluntarios sanos (edad media 30 años, intervalo 24-40) en tubos con heparina. El aislamiento de PBMCs se realizó por centrifugación en gradiente de Ficoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las células se lavaron con medio RPMI 1640 (Cambrex, New York, USA) y se ajustaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 conteniendo además 10% de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España), 2 mM de L-glutamina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin y 100 U/ml penicilina (Sigma). Las PBMCs se incubaron en placas de poliestireno de fondo plano de 24 pocillos (Corning, Madrid, España) en presencia o ausencia de agentes  
30 estimulantes a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Como estímulo se utilizaron suspensiones bacterias vivas y muertas de  $1 \times 10^6$  CFU/ml, y volúmenes de sobrenadantes de 150  $\mu$ l. Como control positivo se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. Como control negativo se ensayó la producción de citoquinas en PBMCs no estimuladas. Cada tipo de estímulo fue ensayado por duplicado en cada  
35 experimento. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron por centrifugación, se fraccionaron y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta la detección de citoquinas.

3. *Determinación de citoquinas*

40 Las concentraciones de citoquinas (IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-10, y TGF- $\beta$ ) de los sobrenadantes se midieron mediante kits ELISA de Bioscience (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

TABLA 1

50 *Propiedades inmunomoduladoras de bifidobacterias y otras bacterias lácticas intestinales. Efecto sobre la producción de citoquinas por PBMCs de bacterias viables*

Estímulo	Producción citoquinas (pm/ml)			
	IL-1	IFN- $\gamma$	IL-10	TGF- $\beta$
RPMI	ND	9, 0 $\pm$ 1, 0	58, 0 $\pm$ 3, 0	ND

## ES 2 343 499 B1

	LPS	ND	12,0±0,5	399,0±8,0	ND
5	<sup>1</sup> ES1	103,0±37,0	10,1±1,0	2459,0±28,0	236,0±119,0
					ND
10	<sup>2</sup> A2	255,0±1,0	13,0±2,0	699,0±396,0	
		-			-
	<sup>3</sup> ATCC15707		66,1±23,9	4098,4±1551,7	
15		ND			
	<sup>4</sup> BIR-324		11,0±5,0	469,0±15,0	ND
		-			
20	<sup>5</sup> W11		160,4±6,8	486,0±236,4	-
		-			
25	<sup>6</sup> BB536		143,7±18,3	1390,0±268,8	-
	<sup>7</sup> LM1V	233,0±99,0	27,0±15,0	166,0±53,5	ND

ND , no detectada

-, no evaluada

<sup>1</sup>*Bifidobacterium* IATA-ES1, <sup>2</sup>*Bifidobacterium* IATA-A2,  
<sup>3</sup>*Bifidobacterium longum* ATCC15707, <sup>4</sup>*Bifidobacterium* BIR-324,  
<sup>5</sup>*Bifidobacterium longum* W11, <sup>6</sup>*Bifidobacterium longum* BB536,  
<sup>7</sup>*Lactobacillus reuteri* LM1V.

### Ejemplo 2

*Procedimiento de selección de bifidobacterias capaces de hidrolizar y transportar los péptidos del gluten reduciendo su toxicidad*

La capacidad de las cepas para hidrolizar las proteínas y péptidos derivados del gluten se ha llevado a cabo mediante la cuantificación de la actividad de peptidasas intracelulares de amplio espectro y específicas para hidrolizar secuencias peptídicas que contienen prolina, presentes en los péptidos responsables de las respuestas inmunológicas y tóxicas del gluten. Las células de cultivos bacterianos de 16-18 horas crecidos en MRSC, se recogieron por centrifugación (9000 x g por 10 minutos a 4°C) se lavaron dos veces con tampón Tris 50 mM a pH 7 y se resuspendieron en el mismo tampón concentrándose 10 veces respecto al volumen del cultivo inicial. La ruptura de las células se realizó mecánicamente en un Bead-Beater (Biospec Products, USA) adicionando 2 volúmenes de bolitas de vidrio por cada volumen de células y aplicando 2 pulsos de 1,5 minutos. El sobrenadante obtenido tras centrifugar (8000 g, 10 min) para eliminar células y fragmentos insolubles se utilizó como extracto enzimático para los ensayos de actividad. Los sustratos ensayados fueron los siguientes: Leu-paranitroanilida (-pNA) para detectar aminopeptidasas de amplia especificidad, Leu-Leu-Gly para detectar aminopeptidasas y tripeptidasas de amplia especificidad, Suc-Ala-Pro-pNA para detectar prolil-endopeptidasas, Pro-AMC para detectar iminopeptidasas, Gly-Pro-AMC para detectar X-prolil-dipeptidil-peptidasas; Val-Pro para detectar prolidasas, y Pro-Gly para detectar prolinasas. En el caso de sustratos derivados de la paranitroanilida, la mezcla de reacción consistió en 200 µl de tampón fosfato 50 mM, a pH 7,2 conteniendo una concentración 0,5 mM del sustrato y 50 µl del extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante un máximo de 30 min. La hidrólisis del sustrato y liberación de la paranitroanilina se monitorizó a 419 nm en un espectrofotómetro (550 Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). La hidrólisis de los péptidos se determinó mediante el ensayo de la L-amino ácido oxidasa (Hejgaard, 1978, Rapad assay to detect peptidasas in column effluent fractions using L-amino acid oxidase. Analytical Biochem 90: 835-839). Se incubaron 100 µl del tampón de reacción

## ES 2 343 499 B1

conteniendo una concentración 0.5 mM con 50  $\mu$ l del extracto enzimático durante 20 min. Tras este período se añadieron 100  $\mu$ l del reactivo de la L-amino ácido oxidasa y tras 5 minutos de incubación se midió la absorbancia a 530 nm. La concentración de la proteína se midió por el método de Bradford utilizando el kit comercial de BioRad (Hercules, CA, USA). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1  $\mu$ mol de sustrato a 37°C durante 1 minuto. Las actividades se expresaron en U/mg de proteína.

La capacidad de las cepas para transportar e hidrolizar los péptidos derivados de la digestión de las gliadinas se determinó mediante electroforesis. En este caso, las suspensiones celulares se ajustaron a una densidad óptica de 4 a 655 nm, equivalente a  $10^9$  UFC/ml y se incubaron con tres hidrolizados distintos de gliadinas a una concentración final de 300-600  $\mu$ g/ml en PBS al que se adicionó un 0.2% de glucosa. Los hidrolizados de gliadinas (Sigma, St. Louis, MO) se obtuvieron simulando el proceso de digestión gastrointestinal del siguiente modo: A) 100 g de gliadinas se digirieron en un litro de HCL 0,2 N (pH: 1,8) con 2 g de pepsina purificada a 37° durante 2 h (a este hidrolizado se le denominará G-P). B) La digestión resultante, se digirió con tripsina adicionando 2 g de tripsina después de ajustar el pH a 8 con NaOH 2N (a este hidrolizado se le denominará G-P+T. C) El doble digerido fue luego tratado con 2 g de pancreatina y agitado durante 2 horas a pH 8 (a este hidrolizado se le denominará G-P+T+x). Tras cada etapa de digestión se centrifugó a 10,000 g durante 10 min, y se guardó el sobrenadante para los ensayos siguientes a -20°C. La inactivación de los digeridos se realizó mediante incubación a 100°C durante 30 minutos. Las suspensiones bacterianas se incubaron en presencia de los tres hidrolizados de gliadinas (A, B y C) durante 6 horas, a 37°C, en anaerobiosis. Los cambios en viabilidad durante las incubaciones se determinaron utilizando el sistema comercial LIVE/DEAD BacLight Kit (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) para microscopía siguiendo las instrucciones del fabricante. El recuento de bacterias vivas (verdes) y muertas (rojas) se efectuó en un microscopio de epifluorescencia. BX 51 Olympus microscope (Tokyo, Japan). En todos los casos se detectaron mínimas pérdidas de viabilidad (0,0-11,5%) tras la incubación. Tras el período de incubación se centrifugó para eliminar las células y proteínas insolubles y los sobrenadantes se esterizaron por filtración (0.22- $\mu$ m tamaño de poro, Millipore, Bedford, MA) para eliminar la posible presencia de células viables. La capacidad de las cepas para transportar y utilizar los distintos hidrolizados de gliadinas se determinó valorando la desaparición de bandas en geles convencionales de poliacrilamida al 15% y en geles Tris-Tricine (Ready gels 10-20% linear gradient, 4% stacking gel, Bio-Rad, Barcelona, España) para separación de péptidos. Las proteínas se visualizaron por tinción Coomassie Brilliant Blue R-250. La reducción de epitopos tóxicos derivada del transporte y digestión de gliadinas por acción de las bacterias seleccionadas se evaluó mediante ensayo ELISA sándwich R5 (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

TABLA 2

*Actividad peptidásica de cepas de bifidobacterias y latobacilos de origen intestinal frente a sustratos sintéticos*

Cepas	Actividad específica (U/mg proteína)*						
	Val-Pro	Pro-Gly	Leu-Gly-Gly	Pro-pNA	Leu-pNA	Suc-Ala-Pro-pNA	Gly-Pro-pNA
<sup>1</sup> ES1	18.1±3.5	15.7±3.8	132.3±7.2	480.2±91.7	80.0±8.9	8.5±1.9	17.1±0.0
<sup>2</sup> A2	27.1±14.0	27.1±07.5	326.1±15.9	140.5±6.4	176.5±3.5	18.5±4.8	60.43±11.0
<sup>3</sup> 15707	27.4± 2.0	37.9± 0.8	-	-	5.1±0.5	0.02±0.6	0.2±0.5
<sup>4</sup> LmV1	9.34±0.7	10.3±0.6	54.6±2.7	7.8±3.7	61.8±3.4	8.0±3.5	15.2±3.2

\*Media  $\pm$  SD.

-, no evaluada

<sup>1</sup>*Bifidobacterium* IATA-ES1, <sup>2</sup>*Bifidobacterium* IATA-A2,  
<sup>3</sup>*Bifidobacterium longum* ATCC15707, <sup>4</sup>*Lactobacillus reuteri* LM1V.

## ES 2 343 499 B1

### Ejemplo 3

*Regulación de la respuesta inmunológica provocada por las gliadinas en células inmunocompetentes mediante su coincubación con las cepas del género Bifidobacterium seleccionadas por sus propiedades inmunomoduladoras*

Suspensiones de la cepa seleccionada ( $10^6$ - $10^9$  UFC/ml), así como otras incluidas con fines comparativos, fueron incubadas con los distintos hidrolizados de gliadinas (P, P+T y P+T+P), obtenidos tal y como se describe en el ejemplo 3, y PBMCs a una concentración de  $10^6$  cfc/ml durante 24 h. Como estímulos control se utilizaron los distintos hidrolizados de gliadinas sin bacterias y LPS de *E. coli* O111:B4. También se detectó la producción basal de citoquinas sin adicionar ningún estímulo. El procedimiento de aislamiento de PBMCs, estimulación y detección de citoquinas fue el descrito en el ejemplo 1.

TABLA 3

*Producción de citoquinas por PBMCs estimuladas simultáneamente por los digeridos intestinales de gliadinas y cultivos de bifidobacterias y otras bacterias lácticas de origen intestinal no viables*

Estímulo	Producción de citoquinas (pm/ml)				
	IL-1	IL-8	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-15
RPMI	ND	173 $\pm$ 17	9 $\pm$ 1	58 $\pm$ 3	ND
LPS	ND	2295 $\pm$ 83	12 $\pm$ 0,5	399 $\pm$ 8	175 $\pm$ 17
G-P	61 $\pm$ 2	4570 $\pm$ 484	42 $\pm$ 7	299 $\pm$ 149	34 $\pm$ 1
G-P+T	169 $\pm$ 22	5375 $\pm$ 13	37 $\pm$ 3	136 $\pm$ 16	149 $\pm$ 83
G-P+T+X	75 $\pm$ 1	5264 $\pm$ 122	36 $\pm$ 9	272 $\pm$ 18	25 $\pm$ 7
<sup>1</sup> ES1/G-P	123 $\pm$ 8	4921 $\pm$ 129	11 $\pm$ 1	1192 $\pm$ 752	10 $\pm$ 7
ES1/G-P+T	48 $\pm$ 4	4928 $\pm$ 288	8,2 $\pm$ 5	935 $\pm$ 426	27 $\pm$ 10
ES1/ GP+T+X	ND	5151 $\pm$ 146	2 $\pm$ 0,5	1054 $\pm$ 477	ND
<sup>2</sup> A2/G-P	109 $\pm$ 215	4480 $\pm$ 23	6,9 $\pm$ 2	395 $\pm$ 216	29 $\pm$ 8
A2/G-P+T	129 $\pm$ 4	2848 $\pm$ 45	43 $\pm$ 22	1002 $\pm$ 615	46 $\pm$ 13
A2/G-P+T+X	129 $\pm$ 1	5099 $\pm$ 30	29 $\pm$ 4	1314 $\pm$ 724	134 $\pm$ 57
<sup>3</sup> LM1V/G-P	ND	5152 $\pm$ 119	62 $\pm$ 31	721 $\pm$ 16	33 $\pm$ 4
LM1V/G-P+T	ND	5015 $\pm$ 75	11 $\pm$ 5	458 $\pm$ 218	26 $\pm$ 4
LM1V/G-P+T+X	ND	5189 $\pm$ 98	82 $\pm$ 35	457 $\pm$ 257	6 $\pm$ 1

ND, no detectado

<sup>1</sup>*Bifidobacterium* IATA-ES1

<sup>2</sup>*Bifidobacterium* IATA-A2

<sup>3</sup>*Lactobacillus reuteri* LM1V

### Ejemplo 4

*Capacidad de las bifidobacterias seleccionadas para inhibir el crecimiento de aislados de la flora intestinal de pacientes celíacos con potencial patogénico*

La actividad antimicrobiana de las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas previamente en función de sus propiedades inmunomoduladoras por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1, se determinó mediante dos métodos: (i) por la técnica de la doble capa y (ii) por la técnica de difusión en agar.

## ES 2 343 499 B1

La actividad antibacteriana de cada cepa se evaluó globalmente mediante la técnica de la doble capa utilizando como microorganismos indicadores bacterias aisladas de la flora intestinal de pacientes celíacos y con potencial pato-  
 5 génico. Las bifidobacterias se sembraron en placas de MRS-C en líneas de unos 2 cm y se incubaron en condiciones óptimas durante 16 h y su desarrollo posterior se inhibió con cloroformo. El microorganismo indicador se inoculó a una concentración de  $10^4$ - $10^5$  CFU/ml en 10 ml de agar semisólido adecuado, se vertió sobre la capa de agar del microorganismo protector y se incubó a 37°C en anaerobiosis. Tras 24 h se midieron los halos de inhibición alrededor de las líneas del cultivo de las bifidobacterias.

A fin de evaluar la actividad antibacteriana debida a la secreción de compuestos de naturaleza proteica se utilizó la  
 10 técnica de difusión en agar. 10 ml de caldo MRS-C se inocularon al 1% con un cultivo de 24 h de cada bifidobacteria y se incubaron durante 16 h a 37°C. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación (12.000 g, 15 min, 4°C) y se concentraron por liofilización. Los líofilos se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 6.5, se neutralizaron con NaOH hasta alcanzar un pH de 6,5 para eliminar los efectos de los ácidos orgánicos generados por fermentación, y se esterilizaron por filtración. Estas muestras constituyeron los extractos crudos en los que se  
 15 determinó la posible actividad de proteínas antibacterianas producidas por las bifidobacterias. El microorganismo indicador se inoculó a una concentración de  $10^4$ - $10^5$  células/ml en 10 ml de agar semisólido adecuado y se vertió sobre una capa sólida de agar del mismo medio. Tras solidificar, se perforaron pocillos de 5 mm, a los que se añadieron 40  $\mu$ l del extracto libre de células y neutralizado de cada bifidobacteria. Se dejó difundir 4 h a 4°C y, posteriormente, se incubó en las condiciones óptimas para el microorganismo indicador o patógeno. Tras la incubación se midieron los  
 20 halos de inhibición alrededor del pocillo.

TABLA 4

*Inhibición de bacterias potencialmente patógenas aisladas de pacientes celíacos por cultivos de las bifidobacterias*

<b>Cepas</b>	<b>Inhibición (cm) por las cepas de</b>	
	<b><i>Bifidobacterium</i></b>	
	<b>IATA-A2</b>	<b>IATA-ES1</b>
<i>Bacteroides</i> CAQ4	0,4	1,4
<i>Bacteroides</i> <i>vulgatus</i>	0,5	1,3
<i>Clostridium</i> <i>difficile</i>	0,9	1,6
<i>E. coli</i> CBE9	1,1	1,9
BC-BP1	0,5	1,2
BC-BO1	0,7	1,0
BC-BU1	2,3	2,0
BC-BU3	1,0	1,3

TABLA 5

*Inhibición de bacterias potencialmente patógenas aisladas de pacientes celíacos por sobrenadantes de cultivos de las bifidobacterias*

<b>Cepa indicadora</b>	<b>Inhibición (cm) por <i>Bifidobacterium</i> spp.</b>	
	<b>IATA-A2</b>	<b>IATA-ES1</b>
Bac CAQ4	0,40	0,45
Ent CBE9	0,95	1,15

## ES 2 343 499 B1

### Ejemplo 5

#### *Evaluación de la resistencia de bifidobacterias a condiciones de estrés gastrointestinal*

5 La resistencia de las bifidobacterias aisladas a las condiciones ácidas de los jugos gástricos, que constituyen la primera barrera biológica que limita la viabilidad de los probióticos tras su ingestión, se confirmó para cada una de las cepas recuperadas. Para ello se prepararon suspensiones de células ( $10^8$  células/ml) de cada cepa en PBS, conteniendo 3 g/l de pepsina (Sigma, St. Louis, MO) y ajustada a pH 2 con HCl y se incubaron a 37°C durante un total de 120 min. A distintos tiempos (0, 90 y 120 min), incluyendo el tiempo medio de vaciado gástrico (90 min), se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad mediante recuentos en placas de agar MRS-C. Posteriormente se estudió la tolerancia de las cepas resistentes al pH ácido a otras condiciones de estrés, como la bilis, el NaCl y las altas temperaturas. Para conocer la tolerancia de las cepas objeto de estudio a la bilis, se evaluó su capacidad para crecer en MRS-C, al que se adicionaron diversas concentraciones (0,5-1,5%) de Ox-gall (Sigma, St. Louis, MO). Alícuotas de 200  $\mu$ l de cada medio, inoculadas al 1% con cultivos de 24 h, se cargaron en placas multipocillo y se incubaron a 37°C. El crecimiento se monitorizó mediante medidas de absorbancia a 655 nm en un espectrofotómetro 550 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA).

TABLA 6

20 *Efecto de las condiciones gástricas sobre la capacidad de crecimiento y viabilidad de las cepas de Bifidobacterium*

	Viabilidad*			Capacidad de crecimiento †						
	(%)			pH						
	pH			3		2,5		2		
Cepas	3	2.5	2	Contro 1	Log ufc/ml	(%)	Log ufc/ml	(%)	Log ufc/ml	(%)
IATA-	99,4±4	86,2±1	57,9±2	9,3±0,	9,3±0,		8,1±0,		5,2±0,	
ES1	,2	3,0	,3	0	0	99,7	0	86,7	0	56,1
BIR	89,4±2	73,1±1	61,6±1	9,1±0,	8,8±0,		8,8±0,		5.79±0	
324	,3	,0	,7	0	0	96,9	2	96,8	.1	63.6
Bion 3	98,4±1	78.4±1	11.6±3	9,0±0,	7,3±0,		4,8±0,		-	-
	,9	.7	.7	0	0	81,2	1	52,8		
NCIMB	1,8±0,	-	-	8,1±0,	-	-	-	-	-	-
8809	5			0						

45 \*Viabilidad expresada como porcentaje de la viabilidad detectada con el sistema LIVE/DEAD BacLight Kit (Molecular Probes) en suspensiones celulares en PBS a pH 7,2 , que se consideró del 100 %.

50 †Capacidad de crecimiento expresadas en Log ufc/ml determinados por recuento en placas de MRSC y expresado como porcentaje del recuento de la suspensión de células en PBS, que se consideró del 100 %.

60 \*† Medias y desviaciones estándar de los resultados obtenidos en tres ensayos independientes

65 nd, no determinado

- , no detectado

# ES 2 343 499 B1

TABLA 7

*Tolerancia de las cepas de Bifidobacterium a la presencia de sales biliares*

Cepas	Capacidad de crecimiento relativa* (% $\mu$ )				
	Concentración de oxgall (%)				
	Control	0,5	1,0	2,0	3,0
IATA-ES1	100	88,22±0,70	82,65±1,60	69,95±0,33	67,28±1,31
A2	100	73,03±0,98	64,12±1,79	60,96±0,59	38,21±1,44
BIR 324	100	62,68±3,55	43,99±1,64	38,29±0,32	37,06±0,48
NCIMB 8809	100	45,07±8,20	23,88±7,56	3,94±1,05	0,70±1,00
Bion 3	100	30,17±3,2	23,30±0,0	-	-

\*Datos expresados como porcentaje de la velocidad de crecimiento ( $h^{-1}$ ) obtenida en ausencia de bilis, que se consideró del 100 %. Medias  $\pm$  desviaciones estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

## Ejemplo 6

### Aislamiento e identificación de la bifidobacteria seleccionada

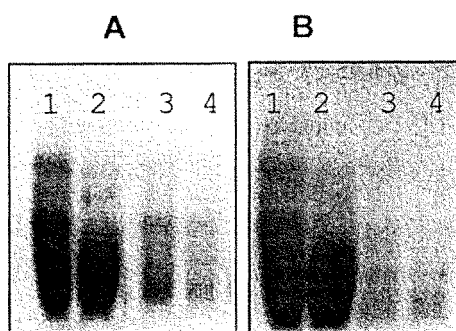
Se procedió al aislamiento de cepas del género *Bifidobacterium* a partir de heces de lactantes sanos que no hubieran ingerido alimentos que contuvieran bifidobacterias durante al menos el mes anterior al análisis y que no hubieran sido sometidos a tratamientos con antibióticos. Las muestras se mantuvieron a 4°C y se analizaron sin que transcurrieran más de dos horas desde su recogida. Dos gramos de cada una de ellas se diluyeron en tampón fosfato 10 mM conteniendo una concentración de NaCl 130 mM (PBS) y se homogeneizaron en un stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, UK), durante 3 min y se diluyeron en agua de peptona. Alícuotas de 0,1 ml de diversas diluciones decimales se inocularon en MRS agar (de Man Rogosa and Sharpe; Scharlau, Barcelona) conteniendo un 0,05% de cisteína (Sigma, St. Louis, MO; MRS-C), y 80  $\mu$ g/ml de mupirocina. Tras una incubación de 48 h a 37°C en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen, Oxoid, UK) se seleccionaron colonias aisladas y su identidad se confirmó por estudio de su morfología bajo tinción de Gram. La identidad de los aislados se confirmó mediante PCR específica de género, de acuerdo con la metodología descrita por Kaufman *et al.* (1997, Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1268-1273), utilizando los cebadores (LM26 y LM3) que amplifican un fragmento de 1,35 kb del gen del ARN ribosómico 16S. Además, se secuenció el gen del ARN 16S a partir de ADN total. El fragmento secuenciado se amplificó utilizando los cebadores 27f y 1401r y se purificó utilizando el sistema comercial GFX<sup>TM</sup>PCR (Amershan, Bioscience, UK). Para la secuenciación se emplearon además los cebadores 530f y U-968f de acuerdo con los procedimientos descritos por otros autores (Jonson, 1994. Similarity analysis of rRNAs. In Methods for General and Molecular Bacteriology; Gerhard, P.; Murray, R. G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R., Eds. American Society for Microbiology, Washington, DC. Pp 683-700; Satokari *et al.*, 2001. Bifidobacterial Diversity in Human Feces Detected by Genus-Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 67, 504-513; Favier *et al.* 2002. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. Appl. Environ. Microbiol. 68, 219-22). La secuenciación se realizó utilizando un secuenciador automático de ADN ABI 3700 (Applied Biosystem, Foster City, CA). La búsqueda de secuencias más próximamente relacionadas se realizó en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol Biol. 215, 403-410).



REIVINDICACIONES

- 5 1. Microorganismo perteneciente a la cepa bacteriana de la especie *Bifidobacterium longum* con el número de depósito CECT 7347 útil para la producción de formulaciones que reduzcan los riesgos y mejoren el estado de salud de sujetos con desórdenes relacionados con la ingesta de gluten mediante diversos mecanismos de acción, **caracterizado** por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado y seleccionado de la flora intestinal natural de individuos sanos por sus propiedades antiinflamatorias e inmuno-reguladoras.
- 10 2. Microorganismo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque ejerce sus propiedades inmunomoduladoras tanto en su forma viable como no viable sobre la inmunidad innata y adaptativa.
3. Combinación de microorganismos **caracterizada** porque comprende el microorganismo según las reivindicaciones 1 ó 2 y otro microorganismo para mejorar sus propiedades beneficiosas.
- 15 4. Combinación de microorganismos según la reivindicación 3, donde el otro microorganismo es *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 y/o *Lactococcus lactis* NCD0712.
- 20 5. Componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas y sus combinaciones **caracterizados** porque se obtienen a partir del microorganismo según las reivindicaciones 1 ó 2 o a partir de la combinación de microorganismos según las reivindicaciones 3 ó 4 mediante técnicas físico-químicas y biotecnológicas entre las que se encuentran la centrifugación, filtración, liofilización, precipitación, sonicación, disrupción celular mecánica y química, extracción de compuestos a partir de cultivos con enzimas y/o agentes químicos, la separación por técnicas cromatografías y la clonación y sobre expresión de los genes que codifican las moléculas bioactivas.
- 25 6. Microorganismo según las reivindicaciones 1 ó 2, combinación de microorganismos según las reivindicaciones 3 ó 4 o componentes celulares según la reivindicación 5, **caracterizado** porque actúa sobre la regulación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa causada por los péptidos nocivos del gluten.
- 30 7. Microorganismo según las reivindicaciones 1 ó 2, combinación de microorganismos según las reivindicaciones 3 ó 4 o componentes celulares según la reivindicación 5, **caracterizado** porque actúa sobre el fortalecimiento de la función barrera defensiva frente a bacterias perjudiciales aisladas del tracto gastrointestinal de los pacientes celíacos.
- 35 8. Microorganismo según las reivindicaciones 1 ó 2 o combinación de microorganismos según las reivindicaciones 3 ó 4, **caracterizado** por ser capaz de transportar los péptidos del gluten resultantes de la digestión gastrointestinal, reduciendo la concentración de epitopos nocivos.
- 40 9. Microorganismo según las reivindicaciones 1 ó 2, combinación de microorganismos según las reivindicaciones 3 ó 4 o componentes celulares según la reivindicación 5, **caracterizado** por ser capaz de hidrolizar los péptidos del gluten mediante su actividad peptidásica, reduciendo la concentración de epitopos nocivos.
- 45 10. Microorganismo según las reivindicaciones 1 ó 2, combinación de microorganismos según las reivindicaciones 3 ó 4 o componentes celulares según la reivindicación 5, **caracterizado** porque proporciona actividades enzimáticas adicionales a las peptidasas, que favorecen la digestión y aporte de nutrientes en síndromes de malabsorción y desnutrición típicos de los pacientes celíacos.
- 50 11. Uso del microorganismo, de la combinación de microorganismos o de los componentes celulares según las reivindicaciones anteriores, en la producción de formulaciones para la reducción de riesgos y mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten.
- 55 12. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un alimento.
13. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un nutracéutico.
- 60 14. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un suplemento.
15. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un preparado farmacéutico.
16. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un probiótico y/o simbiótico.
- 65 17. Uso según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la formulación elaborada es un nuevo alimento.

**FIGURA 1**



# ES 2 343 499 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

5 <120> Microorganismos para la reducción de riesgos y mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten

<160> 1

10

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

15 <211> 1437

<212> DNA

<213> *Bifidobacterium sp.*

20 <400> 1

	gcgccagggc ggcgtgctta cacatgcaag tcgaacggga tccatcaggt tttgcttggt	60
25	ggtgagagtg ggcaataggt gagtaatgcg tgaccgacct gcccataca ccggattagc	120
	tcctggaaac gggtaggtaat gccggatgct ccagttgatc gcatggctctt ctgggaaagc	180
	tttcgcggtg tgggatgggg tcgctgccta tcagcttgac ggcggggtaa cggcccaccg	240
30	tggcttcgac gggtagccgg cctgagaggg cgaccggcca cattgggact gagatacggc	300
	ccagactcct acgggaggca gcagtgggga atattgcaca atgggcgcaa gcctgatgca	360
	gcgacgccgc gtgagggatg gaggccttcg ggttgtaaac ctcttttatc ggggagcaag	420
35	cgagagtgag tttaccggtt gaataagcac cggctaacta cgtgccagca gccgcggtaa	480
	tacgtagggg gcaagcgtta tccggaatta ttgggcgtaa agggctcgta ggcggttcgt	540
40	cgcgtccggg gtgaaagaca taaagttaac ggtggatccg cgccgggtac gggcgggcct	600
	taatgaggta ggggagactg gaattcccgg tgtaacggtg gaatgtgtag atatcgggaa	660
	gaacaccaat ggctcaaggc aggtctctgg gccgttactg acgctgagga gcgaaagcgt	720
45	ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacggtgg atgctggatg	780
	tggggcccgt tccacggggt ccgtgtcggg tctaacgcgt taagcatccc gcctggggag	840
50	tacggccgcg gggctaaaac tcaaagaaat tgacgggggc ccgcagaggc ggcggattat	900
	gcggattaat tcgctgcaac gcgaagaatc ttacctgggc ttgatttggt cccgactgtc	960
	gtacagatac ggcttcctct tcggggacgg gttcacaggt ggtgcatggt cgtcgtccag	1020
55	tctcgtgtcg tgagatggtg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctcg ccccgtggtg	1080
	ccagcggatt atgccgggaa ctcacggggg accgccgggg ttaactcggg ggaagggtggg	1140
60	gatgacgtca gatcatcatg ccccttacgt ccagggcttc acgcatgcta caatggccgg	1200
	tacaacggga tgcgacgcgg cgacgcggag cggatccctg aaaaccggtc tcagttcgga	1260
	tcgcagtctg caactcgact gcgtgaaggc ggagtcgcta gtaatcgca atcagcaacg	1320
65	tcgcggtgaa tgcgttcccg ggtcttgtaa cacaccgaat gacgactggt gttagggtcac	1380
	ccgcggtcgg cagtgaccgt atccatcgat gtccggatgat aactaaggag agagggg	1437



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 499

② Nº de solicitud: 200703427

③ Fecha de presentación de la solicitud: 24.12.2007

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12N 1/20 (2006.01)  
C12R 1/01 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 03010297 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED) 06.02.2003	1-17
A	WO 2004076615 A2 (BIONEER A/S. PROBI AB) 10.09.2004	1-17
A	WO 2005032567 A2 (DANISCO A/S) 14.04.2005	1-17

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.07.2010

Examinador  
I.Rueda Molins

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.07.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 03/010297 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED).	06-02-2003
D02	WO 2004/076615 A2 (BIONEER A/S. PROBI AB).	10-09-2004
D03	WO 2005/032567 A2 (DANISCO A/S).	14-04-2005

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud de patente divulga un microorganismo perteneciente a la especie *Bifidobacterium longum*, con el número de depósito CECT 7347, útil para la producción de formulaciones que reduzcan los riesgos y mejoren el estado de salud de sujetos con desórdenes relacionados con la ingesta de gluten.

Los documentos D01, D02 y D03 divulgan un método para el tratamiento de la enfermedad celiaca empleando microorganismos pertenecientes al género *Bifidobacterium*.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ( Artículos 6 y 8 LP 11/1986)**

El documento D01 divulga, (en las reivindicaciones 15, 16, 21 y 43), el uso de cepas de *Bifidobacterium longum* infantis, así como, formulaciones que comprenden dicho microorganismo, o fracciones derivados del mismo para el tratamiento y/o la prevención de la enfermedad celiaca.

Los documentos D02 (reivindicaciones 1, 121, 148-153), y D03 (reivindicaciones 4, 9, 10, 12-15) reivindican el uso de bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium longum*, para la elaboración de un suplemento nutricional o una composición farmacéutica, para el tratamiento de la enfermedad celiaca.

En ninguno de los documentos citados anteriormente, (D01, D02 y D03), se divulga el empleo de *Bifidobacterium longum*, con número de depósito CECT 7347, para mejorar la salud de sujetos con desórdenes relacionados con la ingesta de gluten. Por tanto, las reivindicaciones 1 - 17 de la solicitud de patente, presentan novedad y actividad inventiva en el sentido de los Artículos 6 y 8 LP11/1986.