

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/007198 A1

(43) Fecha de publicación internacional
21 de enero de 2010 (21.01.2010)

PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070285

(22) Fecha de presentación internacional:
14 de julio de 2009 (14.07.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200802102 15 de julio de 2008 (15.07.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **SANZ HERRANZ, Yolanda** [ES/ES]; Instituto De Agroquímica Y Tecnología De Alimentos (iata), Apartado de correos, 73, E-46100 Burjassot (Valencia) (ES). **DE PALMA, Giada** [IT/ES]; Instituto De Agroquímica Y Tecnología De Alimentos (iata), Apartado de correos, 73, E-46100 Burjassot (Valencia) (ES). **SÁNCHEZ SÁNCHEZ, Esther** [ES/ES]; Instituto De Agroquímica Y Tecnología De Alimentos (iata), Apartado de correos, 73, E-46100 Burjassot (Valencia) (ES). **MEDIANA, Marcela Susana** [AR/ES]; Instituto De Agroquímica Y Tecnología De Alimentos (iata), Apartado de correos, 73, E-46100 Burjassot (Valencia) (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Darío, 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: BACTERIA AND DERIVED PRODUCTS TO STRENGTHEN DEFENCES AND REDUCE RISK OF ILLNESS

(54) Título: BACTERIAS Y PRODUCTOS DERIVADOS PARA FORTALECER LAS DEFENSAS Y REDUCIR EL RIESGO DE ENFERMEDAD

(57) Abstract: This invention provides a new strain of the genus *Bifidobacterium* and the components of the cultivation supernatants thereof in the form of diverse preparations (functional and new foods, probiotics, symbiotics, supplements, nutraceuticals and drugs) destined to improve defences and reduce the risk of illness. The mechanisms of action thereof include: (i) regulation of intestinal glycosylation promoting that of healthy individuals, (ii) modulation of interactions between epithelial cells and intestinal microbiota promoting adhesion of beneficial bifidobacteria and (iii) regulation of immunological responses. The products included are stable in gastrointestinal and technological conditions, ensuring their exploitation.

(57) Resumen: Esta invención aporta una nueva cepa del género *Bifidobacterium* y los componentes de sus sobrenadantes de cultivo en forma de diversos preparados (alimentos funcionales y nuevos, probióticos, simbióticos, suplementos, nutraceuticos, y fármacos) destinados a mejorar las defensas y reducir el riesgo de enfermedad. Sus mecanismos de acción incluyen: (i) la regulación de la glicosilación intestinal favoreciendo la propia de individuos sanos, (ii) la modulación de las interacciones entre las células epiteliales y la microbiota intestinal, favoreciendo la adhesión de bifidobacterias beneficiosas y (iii) regulando la respuestas inmunológicas. Los productos incluidos son estables en condiciones gastrointestinales y tecnológicas, garantizando su explotación.



WO 2010/007198 A1

BACTERIAS Y PRODUCTOS DERIVADOS PARA FORTALECER LAS DEFENSAS Y REDUCIR EL RIESGO DE ENFERMEDAD

5 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
10 funcionales y nuevos alimentos, probióticos, simbióticos, nutracéuticos o suplementos alimentarios y formulaciones farmacéuticas con aplicaciones clínicas.

15 ESTADO DE LA TÉCNICA

La mucosa del tracto gastrointestinal constituye una de las principales zonas de contacto con agentes ambientales potencialmente nocivos (bacterias, virus, toxinas y alérgenos). Como consecuencia el tracto gastrointestinal ha desarrollado complejos mecanismos de defensa,
20 desempeñando una importante función protectora adicional a la digestiva. La microbiota comienza a adquirirse después del nacimiento, y su composición tiene una gran repercusión en el desarrollo de las funciones fisiológicas del individuo así como en la predisposición a padecer infecciones y patologías de base inmunológica. El género *Bifidobacterium*
25 es uno de los predominantes en el colon y representa normalmente entre el 3 y el 7% de la microbiota intestinal en adultos y hasta el 91% en lactantes (Harmsen *et al.*, 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000 Jan;30(1):61-7.). La
30 menor susceptibilidad de los niños amamantados con leche materna a sufrir enfermedades se considera asociada a su relación con el predominio

de bifidobacterias intestinales. Estas bacterias contribuyen al estado de salud del individuo a través de diversos mecanismos como la exclusión de patógenos y la regulación de las respuestas inmunológicas y funciones metabólicas del mismo (Boirivant y Strober 2007. The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol.* 23:679-692; Sanz et al. 2007 Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2 ; 2:148-56; Toba Takahiro et al. 2007. *Bifidobacterium* or lactic acid bacterium having effect of preventing infection via ss-defensin and food/pharmaceutical composition containing the same. WO2007023912; Petay et al., 2006. Immunomodulatory product obtained from a *Bifidobacterium* culture and compositions containing the same. EP1615657, etc.). Como consecuencia, cepas del género *Bifidobacterium* constituyen uno de los principales probióticos comercializados para consumo humano con distintas finalidades.

15

El mucus que cubre la mucosa intestinal, las células epiteliales, el flujo sanguíneo que la irriga, y las secreciones (fosfolípidos, bilis, péptidos antimicrobianos, etc.) constituyen conjuntamente una barrera protectora innata de naturaleza físico-química (Bourlioux et al. 2002. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. *Am J Clin Nutr* 2003; 78, 675-683). El mucus intestinal, integrado por mucinas, representa uno de los primeros mecanismos de defensa previo a la activación de las células inmunocompetentes. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular secretadas por las células epiteliales (Singh y Hollingsworth 2006. Cell surface-associated mucins in signal transduction *Trends in Cell Biol.* 16, 467-476). La mucinas pueden estar compuestas por los siguientes hidratos de carbono: N-acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina, fucosa, ácido N-acetilneuramínico, ácido siálico, manosa, glucosa y xilosa (Freitas et al. 2005. Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. *Histochem. Cell. Biol.* 124: 423-433). Las mucinas están implicadas

30

en el reconocimiento celular, la adhesión e invasión de patógenos, la transducción de señales, y la proliferación y diferenciación de células tumorales (Sudha et al. 2001. Adherence of *Shigella dysenteriae* 1 to human colonic mucin Curr. Microbiol. 42: 381-387; Leteurtre et al. 2004. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate Biol.of the cell 96: 145-151; Singh y Hollingsworth 2006. Cell surface-associated mucins in signal transduction Trends in Cell Biol. 16: 467-476). La expresión y composición de las mucinas está regulada genéticamente en cada individuo; además, se ha descrito que la microbiota intestinal puede contribuir a su regulación modificando la expresión génica de las enzimas del hospedador implicadas en su síntesis (por ejemplo glicosiltransferasas y glicosidasas) o bien mediante su utilización como nutrientes (Hooper y Gordon. 2001. Commensal host–bacterial relationships in the gut. Science; 292: 1115–1118.). Utilizando animales libres de gérmenes y convencionales se ha demostrado que el proceso de colonización por bacterias comensales favorece la síntesis de glicoconjugados fucosilados [fucosa $\alpha(1,2)$ -galactosa β] en el intestino delgado (Hooper y Gordon. 2001. Commensal host–bacterial relationships in the gut. Science; 292: 1115–1118). Posteriormente, se demostró que *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 secretaba un compuesto soluble que modificaba el proceso de galactosilación en cultivos celulares y modelos animales; no obstante su posibles efectos beneficiosos sobre la salud no han sido investigados (Freitas et al., 2001; Freitas et al., 2005. Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. Histochem. Cell. Biol. 124: 423-433). Los cambios en la glicosilación pueden favorecer la adhesión y retención de bacterias y antígenos que de otro modo pasarían por el lumen intestinal sin interaccionar con el epitelio. Un determinado patrón de glicosilación puede favorecer la adhesión y colonización de bacterias comensales con efectos beneficiosos sobre la salud, mientras que otro puede aumentar la adhesión

de patógenos y la susceptibilidad a infecciones microbianas, o favorecer las enfermedades inflamatorias (alergias, enfermedades inflamatorias intestinales, autoinmunidad, cáncer, etc.). Por ejemplo los receptores que permiten la adhesión de *Escherichia coli* contienen galactosa y ácido siálico, y los que permiten la adhesión de *Helicobacter pylori* contienen fucosa por lo que patrones de glicosilación ricos en estos residuos serían buenos receptores para estos patógenos favoreciendo su colonización. Por otro lado, el aumento en el contenido de ácido siálico en los extremos terminales y la reducción de la sulfatación se han asociado a enfermedades inflamatorias intestinales y cáncer (Campbell et al., 2001. Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: a possible role in cancer development. *Glycoconj J.* 18, 851-8). En algunos estudios los cambios en la glicosilación intestinal se han detectado mediante el uso de lectinas, que son proteínas que unen específicamente determinados residuos de hidratos de carbono, actuando como marcadores de la composición de los glicoconjugados. En el yeyuno de individuos con sensibilidad al gluten se ha detectado unión de la lectina UEA (L-fucosa) pero no en sanos, indicando que los correspondientes residuos de hidratos de carbono eran característicos de la mucosa de los pacientes estudiados (Vecchi et al., 1989. Evidence of altered structural and secretory glycoconjugates in the jejunal mucosa of patients with gluten sensitive enteropathy and subtotal villous atrophy. *Gut.* 30, 804-10). Estudios más recientes han demostrado que la mucosa de pacientes celíacos presenta una estructura particular que hace que se tiñan fuertemente con la lectina UEA (α 1,2-fucosa) y no con la PNA (Gal β [1 \rightarrow 3] GalNAc) característica de sanos (Forsberg et al. 2004. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* 99:894-904).

30 Se han atribuido numerosos efectos beneficiosos a cepas del género *Bifidobacterium*; no obstante, la función de distintas especies de este

género en la glicosilación de la mucosa intestinal como mecanismo para modificar el proceso de colonización de la microbiota beneficiosa y su influencia en el riesgo de enfermedad no se ha descrito, tal como se propone en la presente invención. Tampoco se han caracterizado los compuestos bioactivos de origen bacteriano implicados en este proceso, producidos por cepas del género *Bifidobacterium*, que puedan constituir la base de aplicaciones para mejorar el estado de salud. Los estudios realizados hasta ahora sólo se han centrado en la caracterización de enzimas implicadas en la degradación mucus como fuente de carbono para el crecimiento de estas bacterias en el colon (Ruas-Madiedo et al. 2008. Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. Appl Environ Microbiol. 2008 Jan 25) o en la utilización de prebióticos que administrados a través de la dieta favorezcan su crecimiento y posibilidad de supervivencia (Viscomi, et al. 2006. SI1398369T; Vriesema et al. 2006. WO2006112714). Por otro lado, existe un método para seleccionar microorganismos que modulen la glicosilación, incluyendo bacterias lácticas; sin embargo, no se han caracterizado los compuestos responsables de estos procesos, ni se han demostrado los efectos beneficiosos que estas modificaciones pueden tener para mejorar la salud (Jean-Michel et al., 2004. Micro-organisms with *glycosylation* modulating action of intestinal cell surface. 20040058409).

La microbiota intestinal también regula distintos aspectos de la inmunidad innata y adquirida, protegiendo al hospedador frente a las infecciones y procesos de inflamación crónica (por ejemplo enfermedad de Crohn y la enfermedad celíaca) Las células epiteliales y las células presentadoras de antígenos del sistema inmune innato poseen receptores celulares ('Toll-like receptors' y 'Nod-like receptors') capaces de discriminar entre la microbiota comensal y la patógena, induciendo la síntesis de distintos mediadores de la respuesta inmune innata (citoquinas, quemoquinas, moléculas de adhesión, etc.) y de adecuadas respuestas adaptativas

destinadas a combatir al patógeno (Werner y Haller. 2007. Intestinal epithelial cell signalling and chronic inflammation: From the proteome to specific molecular mechanisms. *Mutat Res.* 1;622(1-2):42-57). La inducción moderada de la síntesis de quemoquinas y citoquinas pro-inflamatorias por bacterias beneficiosas, como las del género *Bifidobacterium*, puede contribuir a activar las defensas frente a infecciones. Por otro lado, la inducción de la síntesis de altas concentraciones de citoquinas reguladoras y anti-inflamatorias puede ayudar al desarrollo de un correcto equilibrio de las repuestas de los linfocitos Th1/h2 evitando los procesos patológicos de inflamación crónica (Sanz et al. 2007 Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc.* 2 ; 2:148-56). Dichas propiedades aportan un valor adicional a cepas de *Bifidobacterium* con miras a su aplicación para mejorar las defensas naturales del hospedador y reducir el riesgo de enfermedad, tal y como se propone en la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Descripción breve

La presente invención aporta una nueva cepa del género *Bifidobacterium* (IATA-ES2), los compuestos liberados a los sobrenadantes de cultivo y su formulación a modo de diversos preparados (alimentos funcionales y nuevos alimentos, probióticos, simbióticos, suplementos, nutracéuticos, y formulaciones farmacéuticas) con capacidad de modular la composición de las glicoproteínas de las células epiteliales intestinales que constituyen el mucus y representan la primera línea de defensa frente a agentes nocivos. Los productos objeto de la invención favorecen, de este modo, el patrón de glicosilación propio de un intestino sano y la residencia de la microbiota intestinal beneficiosa en detrimento de la perjudicial, reduciendo globalmente el riesgo de enfermedad.

La bifidobacteria objeto de la invención, *Bifidobacterium* IATA-ES2, fue aislada a partir de heces de lactantes sanos e identificadas por secuenciación del gen del ARNr 16S y del gen *tuf* con la especie *Bifidobacterium bifidum* y diferenciada por RAPDs de otras cepas pertenecientes a la misma especie, demostrando su exclusividad. La nueva cepa secreta compuestos capaces de modular el patrón de glicosilación del mucus intestinal, que constituye la primera línea de defensa innata, favoreciendo el patrón de glicosilación propio de un intestino sano caracterizado por una elevada abundancia de residuos galactosil $\beta(1\rightarrow3)$ N-acetil galactosamina (Gal β [1 \rightarrow 3] GalNAc) demostrado por la alta tinción con la lectina PNA que reconoce estos residuos (Ejemplo 1, Figura 1). El aumento de la síntesis de estos residuos por acción de bifidobacterias o sus metabolitos u otras bacterias no ha sido demostrado en ninguno de los estudios precedentes (Freitas et al., 2001. A heat labile soluble factor from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 specifically increases the galactosylation pattern of HT29-MTX cells. Cell Microbiol. 3:289-300; Freitas et al. 2005. Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. Histochem. Cell. Biol. 124: 423-433). Por el contrario, esta cepa no favorece especialmente la presencia de residuos como la fucosa α (1,2) Gal β (1,4) GlcNAc, cuya abundancia es propia de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas (como la enfermedad celíaca) y que favorecen la adhesión de patógenos como *Helicobacter pylori*, y se caracterizan por teñirse con la lectina UEA-I.

25

La modificación del patrón de glicosilación producido por la cepa y productos secretados al medio actúa también favoreciendo la adhesión de especies de bifidobacterias beneficiosas típicas de niños lactantes y utilizadas como probióticos, como *B. longum* bv *longum*, *B. longum* bv *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* y *B. animalis*, y reduciendo la adhesión de bacterias patógenas y pro-inflamatorias como *Shigella* (Ejemplo 2; Figura

30

2). El aumento de adhesión más significativo a células epiteliales es el de la propia cepa objeto de la patente, demostrando un relación de simbiosis con el hospedador que favorecería su propia colonización. Los compuestos con actividad biológica secretados por la bifidobacteria objeto de la invención son de naturaleza proteica, y su masa molecular determinada por ultrafiltración es mayor de 30 kDa.. Sus características bioquímicas no coinciden con las descritas con anterioridad en el caso de los productos secretados por *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (Freitas et al., 2005. Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. Histochem. Cell. Biol. 124: 423-433).

La bifidobacteria objeto de la invención también (vivas e inactivadas) y sus sobrenadantes poseen propiedades inmunoreguladoras y anti-inflamatorias caracterizadas por estimular la síntesis de altas concentraciones de IL-10, y moderadas de citoquinas pro-inflamatorias IL8, TNF-alpha e IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y epiteliales HT29-MTX. Además, esta cepa reduce ligeramente la expresión de los marcadores de activación de superficie de las PBMCs como los co-receptores CD4.y CD8 y la molécula co-estimuladora CD86, evitando una activación excesiva de la población de linfocitos T. La cepa *B. bifidum* ES-2 induce, globalmente, la síntesis de mediadores de la inflamación en proporciones equilibradas, lo que le permitiría activar las defensas de forma controlada evitando el desarrollo de procesos de inflamación excesivos y crónicos.

La cepa objeto de la invención y los productos secretados toleran las condiciones gastrointestinales y los procesos tecnológicos, garantizado así su explotación comercial. Su formulación incluye y sin que limite el alcance de la invención su incorporación a alimentos funcionales, nuevos alimentos, suplementos, nutracéuticos, prebióticos, simbióticos y

formulaciones farmacéuticas de forma individual o combinada con otros microorganismos o ingredientes funcionales de otra naturaleza.

5 Globalmente, la invención constituye un método natural para mejorar las defensas naturales del individuo y reducir el riesgo de enfermedad con diversas aplicaciones, tanto dirigidas a la población general, como a grupos de riesgo de padecer enfermedades específicas como infecciones o enfermedades inflamatorias crónicas. Está especialmente indicada para grupos de población con bajas defensas como los niños y ancianos o con
10 necesidades específicas, ya que puede favorecer la colonización de bifidobacterias propias de lactantes que aumentan nuestras defensas y regulan nuestro sistema inmunológico. También posee la ventaja de no tener efectos secundarios a diferencia de las estrategias farmacológicas (antibióticos, anti-inflamatorios, inmunosupresores, etc.)

15

Descripción detallada

El objeto de la presente invención es un microorganismo útil para la producción de formulaciones que mejoran las defensas del individuo y
20 reducen el riesgo de padecer enfermedades, preferentemente las infecciones microbianas y las enfermedades de base inmunológica, mediante su capacidad para modular la composición del mucus y sus interacciones con la microbiota intestinal, caracterizado por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado y seleccionado de
25 la flora intestinal natural de individuos sanos. En adelante microorganismo objeto de la presente invención.

La invención comprende un microorganismo y su uso para mejorar las defensas del individuo y reducir el riesgo de enfermedad con diversas
30 aplicaciones, tanto dirigidas a la población general, como a grupos de riesgo de padecer enfermedades específicas como infecciones o

enfermedades inflamatorias crónicas. Está especialmente indicada para grupos de población con bajas defensas, como los niños y ancianos, o con necesidades específicas ya que puede favorecer la colonización de bifidobacterias propias de lactantes que aumentan nuestras defensas y regulan nuestro sistema inmunológico. También posee la ventaja de no tener efectos secundarios a diferencia de las estrategias farmacológicas (antibióticos, anti-inflamatorios, inmunosupresores, etc.).

El microorganismo objeto de la presente invención comprende esencialmente una cepa del género *Bifidobacterium*. Las ventajas de la bifidobacteria específicamente seleccionada para la formulación de preparados farmacéuticos, probióticos, simbióticos, nutracéuticos o alimentos funcionales destinados a aumentar las defensas del individuo 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 mecanismos de defensa (inmunológicos y de otra naturaleza) y a la tolerancia oral a los antígenos de la dieta y a los microorganismos comensales. 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%) y su predominio se asocia a una mayor resistencia a las infecciones y menor susceptibilidad a enfermedades de base inmunológica (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). 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).

- 5 Un objeto particular de la presente invención consiste en la aportación de una nueva cepa de la especie *Bifidobacterium bifidum*, y en particular *Bifidobacterium* IATA-ES2. Un cultivo de *Bifidobacterium* IATA-ES2 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 7365. Esta cepa pertenece a la especie *B. bifidum* de acuerdo con la homología de la secuencia del gen del ARNr 16S y del gen *tuf* con otras actualmente disponibles en las bases de datos (GenBank). Constituye un ejemplo de una cepa de esta especie que posee las propiedades y aplicaciones objeto de la invención.
- 10
- 15

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. El fragmento secuenciado (1304 bases) se amplificó por PCR utilizando los cebadores Y1f y 1401r y para la secuenciación se empleó además el cebador 530f, de acuerdo con los procedimientos descrito 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 Sucesión of Bacterial Communities in Human Neonatos. Appl. Environ. Microbiol. 68, 219-226). Mediante el alineamiento de la secuencia obtenida con las existentes en las bases de datos se detectó máxima similitud con las secuencias equivalentes de cepas de la especie *B. bifidum*. La máxima identidad (99%) se obtuvo con la cepa *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3202 depositada en el GenBank (número de acceso U25952.1). Asimismo, se

20

25

30

ha confirmado la identidad mediante secuenciación del gen *tuf*. El fragmento secuenciado se amplificó por PCR utilizando los cebadores Btuf-1y Btuf-2 de acuerdo con los procedimiento descrito por otros autores (Ventura et al., 2003. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in lactobacillus and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. Appl Environ Microbiol. 2003 Nov;69(11):6908-22).
5 Al igual que en el caso anterior, mediante el alineamiento de la secuencia obtenida (392 pb) con las existentes en las bases de datos se detectó máxima similitud (100%) con la secuencia equivalente de la cepa *B. bifidum* ATCC 29521 depositada en el GenBank (número de acceso
10 AY372041.1).

La diferenciación de esta cepa de otras de la misma especie se realizó mediante el estudio del perfil de ADN obtenido por PCR realizando
15 ampliaciones aleatorias con cebadores inespecíficos (RAPDS). Por ejemplo, el uso de la técnica de RAPD con el cebador M13 permitió diferenciar la cepa ES-2 de otras dos cepas de la misma especie aisladas en el laboratorio y de la cepa de colección *B. longum* LMG 1041T en al menos 3 bandas de ADN. Esto indica que se aporta una cepa exclusiva.

20 La nueva cepa objeto de esta invención sintetiza y secreta al medio de cultivo compuestos que modulan la composición en carbohidratos de los glicoconjugados que forman el mucus intestinal y esto conlleva modificaciones en las interacciones con la microbiota intestinal

25 La cepa objeto de la invención produce compuestos capaces de modular el patrón de glicosilación del mucus intestinal, que constituye la primera línea de defensa innata, favoreciendo el patrón de glicosilación propio de un intestino sano caracterizado por una elevada abundancia de residuos galactosil $\beta(1\rightarrow3)$ N-acetil galactosamina demostrado por la alta tinción
30 con la lectina PNA que reconoce estos residuos (Ejemplo 1, Figura 1). Por

ejemplo, en células HT29-MTX que constituyen un modelo de células intestinales, la adición del sobrenadante libre de células de un cultivo de *Bifidobacterium* IATA-ES2 da lugar a una tinción con la lectina PNA hasta 7 veces superior a la detectada en el control (MRS) y con los sobrenadantes de cultivo de otras especies de bifidobacterias, como *B. animalis*, *B. longum* y *B. breve*. El aumento de la síntesis de estos residuos a los que se une la lectina PNA por acción de otras bacterias o sus metabolitos no ha sido demostrado en ninguno de los estudios precedentes (Freitas et al., 2001. A heat labile soluble factor from *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 specifically increases the galactosylation pattern of HT29-MTX cells. Cell Microbiol. 3:289-300; Freitas et al. 2005. Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps *in vivo*. Histochem. Cell. Biol. 124: 423-433). Por el contrario, esta cepa no favorece especialmente la síntesis de residuos propios de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas (por ejemplo la enfermedad celíaca) como la Fucosa α (1,2) Gal β (1,4) GlcNAc caracterizados por alta tinción con la lectina UEA-I y que también favorece la adhesión de patógenos como *Helicobacter pylori* (Ejemplo 1).

20

La modificación del patrón de glicosilación producido por la cepa y productos secretados al medio actúa también favoreciendo la adhesión de especies de bifidobacterias beneficiosas típicas de niños lactantes y probióticos, como *B. longum* bv *longum*, *B. longum* bv *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* y *B. animalis*, y reduciendo la adhesión de patógenos oportunistas o potencialmente pro-inflamatorias como *Shigella*. (Ejemplo 2; Figura 2). El aumento de adhesión más significativo a células epiteliales es el de la propia cepa objeto de la invención, demostrando un relación de simbiosis con el hospedador que favorece su propia colonización.

30

La nueva cepa produce compuestos capaces de modular la composición del mucus y sus interacciones con la microbiota intestinal. Los compuestos con actividad biológica secretados por la bifidobacteria al medio de cultivo son de naturaleza proteica, ya que su actividad se destruye por incubación como proteasas como la proteinasa K, pero no por incubación en presencia de amilasas ni de lipasas. Su masa molecular determinada por filtración es mayor de 30 kDa. Sus características bioquímicas, por tanto, no coinciden con las descritas con anterioridad para los productos secretados por *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 (Freitas et al., 2005. Indigenous microbes and their soluble factors differentially modulate intestinal glycosylation steps in vivo. *Histochem. Cell. Biol.* 124: 423-433).

Además, la bifidobacteria objeto de la invención (viva o inactivada) y los productos secretados al medio de cultivo poseen propiedades inmunoreguladoras y anti-inflamatorias caracterizadas por estimular la síntesis de altas concentraciones de IL-10, y moderada de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α , e IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), y también moderada de la quemoquina IL8, en células HT29-MTX (Ejemplo 3, Tabla 1). La estimulación de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (por ejemplo TNF- α , IFN- γ) y de la quemoquina IL-8 que atrae células fagocíticas para activar las defensas frente a patógeno, es inferior a las generadas por bacterias Gram-negativas como *Bacteroides* y otras bifidobacterias evaluadas, y por el contrario la síntesis de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, que evitaría una activación excesiva de los mediadores de la inflamación, es superior a la detectada en la mayoría de cepas. Además, esta cepa reduce la expresión de los marcadores de activación de superficie de las PBMCs como por ejemplo los co-receptores CD4 y CD8 y la molécula co-estimuladora CD86, evitando una activación excesiva de la población de linfocitos T citotóxicos y T colaboradores. Así, se demuestra que la cepa *B. bifidum* ES-2, globalmente, induce la síntesis de mediadores de la inflamación en

proporciones equilibradas, lo que le permitiría activar las defensas de forma controlada evitando el desarrollo de procesos de inflamación excesivos y crónicos.

- 5 El microorganismo objeto de la invención pertenece a una de las especies del género *Bifidobacterium* identificada predominantemente en niños y a la que se atribuyen propiedades beneficiosas para la salud del recién nacido, así como administrada en forma de probiótico a otros grupos de población, de forma individual o combinada con otros pro- y prebióticos. Por ejemplo,
- 10 la administración de una cepa de la especie *B. bifidum* combinada con otros prebióticos fue efectiva para el tratamiento de la diarrea aguda en niños (Canani et al., 2007 Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. BMJ. 2007 Aug 18;335(7615):340), una combinación de *Lactobacillus acidophilus* y *B.*
- 15 *bifidum* mostró eficacia significativa en la prevención de la diarrea del viajero (McFarland . 2007. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. Travel Med Infect Dis. Mar;5(2):97-105), la administración de *B. bifidum* Bb12 a adultos aumentó la capacidad fagocítica frente a patógenos (Schiffrin et al., 1997. Immune modulation of
- 20 blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. Am J Clin Nutr. 1997 Aug; 66(2):515S-520S). El consumo de *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *B. longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 durante 3 semanas redujo los episodios y duración del resfriado común (De Vrese, et al., 2005. Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8,
- 25 *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: a double blind, randomized, controlled trial. Clin Nutr. 2005 Aug;24(4):481-91).

30 La cepa objeto de la invención presenta una supervivencia superior al 50% tras su incubación en condiciones gástricas (solución salina con 3g/l de pepsina, ajustada a pH 3,0) y una capacidad de crecimiento del 70% en

presencia de las concentraciones de bilis presentes en el intestino delgado (0,5 % oxgall, Sigma), lo que confirma que es capaz de mantener su viabilidad y actividad metabólica en condiciones gastrointestinales y, por tanto, su posible uso como probiótico. También es capaz de crecer en matrices alimentarias, como la leche, que puedan actuar como vehículo del probióticos y ser origen de nuevos alimentos funcionales. La cepa objeto de la invención también resiste la liofilización, lo que asegura su comercialización y posible administración en forma, entre otras, de preparados farmacéuticos.

10

Los productos activos liberados al medio de cultivo, descritos anteriormente, son estables a los tratamientos industriales y de conservación como por ejemplo y sin que limite el alcance de la invención la congelación, la concentración por filtración, cromatografía, congelación y liofilización, lo que permite su formulación en forma de diversos preparados. El hecho de que los compuestos activos sean secretados al medio de cultivo por la cepa objeto de la invención hace que su aplicación no requiera necesariamente el mantenimiento de la viabilidad de la bacteria en el producto en el que se comercialice, ampliando el número de aplicaciones industriales.

20

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, preparados farmacéuticos, probióticos y/o simbióticos.

25

Un objeto particular de la presente invención comprende el uso del microorganismo de la presente invención o los compuestos bioactivos derivados en la elaboración de formulaciones en forma de un alimento. De esta manera el microorganismo objeto de la presente invención, formaría

30

parte de un alimento formulado para aportar, más allá de su valor nutricional habitual, un efecto beneficioso sobre la reducción de riesgos de padecer enfermedades.

5 Otro objeto particular de la presente invención comprende el uso del microorganismo objeto de la misma o los compuestos bioactivos derivados en la elaboración de preparados en forma de nutracéuticos, definidos como sustancias naturales bioactivas presentadas en una matriz no alimenticia.

10

Otro objeto de la presente invención es el uso del microorganismo objeto de la misma o los compuestos bioactivos derivados para la obtención de un suplemento dietético o alimentario, que incluiría en su composición el microorganismo o los compuestos bioactivos derivados del mismo a fin de
15 complementar la dieta con fines saludables.

20

Otro objeto particular de la presente invención comprende el uso del microorganismo o los compuestos activos derivados en la elaboración de preparados farmacéuticos. De esta forma se utilizarían en la preparación
de composiciones biológicamente activas, capaces de ser utilizadas como medicamentos para obtener los efectos beneficiosos descritos sobre la salud.

25

Otro objeto adicional de la presente invención es el uso del microorganismo 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 efectos
beneficiosos.

30

Otro objeto particular de la presente invención es 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.

5

Un último objeto de la invención sería su uso en forma de alimentos, alimentos nuevos, suplementos, nutracéuticos, composiciones farmacéuticas, probióticos y/o simbióticos en combinación con otros microorganismos (probióticos o cultivos iniciadores) u otros ingredientes

10 funcionales distintos de los microorganismos vivos.

DESCRIPCIONES DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto de la incubación de células epiteliales HT29-MTX con los

15 compuestos secretados al sobrenadante de cultivos de distintas bacterias sobre el marcaje con la lectina PNA marcada con fluoresceína, que reconoce los residuos galactosil $\beta(1\rightarrow3)$ N-acetil galactosamina propios de un intestino sano. Control (PBS); BH (control de bacteroides); MRS (control de bifidobacterias); Bac (*Bacteroides* spp.), ES1 (*Bifidobacterium longum* IATA-ES1); *B. breve* LMG11042T; ES2 (*Bifidobacterium bifidum*

20 IATA-ES2), 324 (*Bifidobacterium longum* BIR-324), A2 (*Bifidobacterium animalis*). *El efecto del sobrenadante de ES2 fue significativamente diferente al del resto aplicando el test de Mann–Whitney *U* a $P < 0.05$.

25 **Figura 2.** Diferencias significativas entre el porcentaje de adhesión de *B. bifidum* ES2 y otras bacterias intestinales a células HT29-MTX, tras su estimulación con los compuestos secretados al sobrenadante de cultivo por la misma cepa frente y con medio de cultivo estéril como control (MRS) aplicando el test de Mann–Whitney ($*P < 0.05$).

30

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

EJEMPLO 1. PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN DE LA MODULACIÓN DEL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN INTESTINAL POR 5 BACTERIAS

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

10 Las cepas del género *Bifidobacterium* 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
cepas del género *Bacteroides* se inocularon en caldo Brain Herat
15 (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) siguiendo el mismo
procedimiento. Las células se recogieron por centrifugación (6,000 g, 15
min.), se lavaron dos veces en PBS (10 mM fosfato sódico, 130 mM cloruro
sódico, pH 7,4), y se re-suspendieron en PBS conteniendo un 20% de
glicerol. Alícuotas de estas suspensiones se congelaron con nitrógeno
20 líquido y se conservaron a -80°C. El número de viables tras el ciclo de
congelación-descongelación se determinó mediante recuento en placas de
MRSC y Schadler tras incubar 48 h. La viabilidad fue superior al 90% en
todos los casos. Los sobrenadantes de los medios de cultivo se
esterizaron por filtración (0.22- μ m tamaño de poro, Millipore, Bedford, MA)
25 para eliminar la posible presencia de células viables y alícuotas de éstos
sobrenadantes libres de células se conservaron a -80°C hasta su uso.

2. Evaluación del patrón de glicosilación

30 El patrón de glicosilación se determinó utilizando el modelo de células
epiteliales intestinales secretoras de mucus HT29-MTX, proporcionadas

por la Dra. Lesuffleur (INSERM U843, Paris, Francia). Las células se cultivaron en medio DMEM glutamax, conteniendo 4.5 g/L D-glucosa, 25 mM de piruvato (Gibco, Barcelona, España), 100 U/ml penicilina, 100 µl/ml estreptomycin (Sigma, St. Luis, MO) y 10% de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España) inactivado durante 30 minutos a 56°C. Las células se crecieron en frascos de 75 cm², y placas de 6 y 24 pocillos (Corning, Madrid, España) a 37°C en una atmósfera de un 5% CO₂. Los cultivos se inocularon en las placas a una densidad de 5 × 10⁵ células por ml. Para la detección del patrón de glicosilación por marcaje con lectinas, las células HT29-MTX se incubaron 7 días en placas de 6 pocillos hasta que alcanzar confluencia. Las monocapas se lavaron con PBS estéril libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ (Gibco, Barcelona, España) y se incubaron en presencia de medio fresco DMEM conteniendo un 20% (v/v) del sobrenadante libre de células de los cultivos de las bacterias evaluadas o medio fresco BHI o MRS, utilizados como controles, durante 7 días adicionales. Las células también se incubaron en presencia de suspensiones de células bacterianas adicionadas a una concentración de 10⁶ cfu/ml durante 2 días. Después de la estimulación las células HT29-MTX se lavaron 3 veces con PBS libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ PBS (Gibco, Barcelona, España) y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C con un 0.25% de tripsina y 1 mM EDTA, resuspendidos en DMEM y, posteriormente, se centrifugó para recoger las células (1800 r.p.m., 10 min., a 4°C). Las células se lavaron 2 veces con PBS y se tiñeron con lectinas marcadas con fluoresceína (FITC) durante 40 minutos. Las lectinas utilizadas y sus concentraciones fueron las siguientes: UEA (*Ulex europaeus*) [α(1,2)-fucosa] (Sigma), 50 µg/ml; PNA (*Arachys hypogaea*, β-gal(1→3)galNAc (Sigma), 10 µg/ml; HPA (*Helix pomatia*), α-NAc residuos (Molecular Probes, Barcelona, Spain), 10 µg/ml; SBA (*Gycine max*), α- y β-Nac. y galactopiranosil (Molecular Probes, Barcelona, Spain), 10 µg/ml. Después, las células se lavaron 3 veces y se resuspendieron en 400 µl de PBS. El grado de tinción con las lectinas se

cuantificó en un citómetro de flujo (EPICS® XL-MCL flow cytometer; Beckman Coulter, Florida, US).

**EJEMPLO 2. PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN
5 DE BACTERIAS A UN MODELO DE CÉLULAS EPITELIALES
INTESTINALES.**

Las suspensiones de bacterias se tiñeron mediante incubación con 10 mM de 5-diacetato de carboxifluoresceína (Sigma, St. Louis, MO), a 37 °C,
10 durante 1 hora. Las suspensiones de células marcadas se ajustaron a una densidad óptica de 0.50 ± 0.05 a 600 nm y se adicionaron a cultivos confluentes de células HT29-MTX y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las células se lavaron con PBS para eliminar las bacterias no adheridas y las adheridas se recogieron mediante incubación con 200 µl de 1% SDS
15 (Sigma, St Louis, MO) en 0.1 M NaOH a 37 °C durante 1 hora. La fluorescencia liberada se midió en un fluorímetro de placas multipocillo (Fluoroskan Ascent, Labsystem, Oy, Finland) a 485 y 538 nm de longitud de onda de excitación y emisión, respectivamente. La adhesión se expresó como porcentaje de la fluorescencia recuperada tras la adhesión de las
20 bacterias a células HT29-MTX respecto a la fluorescencia inicial de la suspensión bacteriana añadida por pocillo.

**EJEMPLO 3. PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN DE LAS
PROPIEDADES INMUNOLÓGICAS DE *Bifidobacterium bifidum* ES-2**

25

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

Las cepas se inocularon en 10 ml de caldo MRS (Scharlau Chemie S.A.,
30 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 fosfato sódico, 130 mM cloruro sódico, 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 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- μ m tamaño de poro, Millipore, Bedford, MA) para eliminar la 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

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 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 conteniendo además 10 % de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España), 2 mM de L-glutamina, 100 μ 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 estimulantes a 37° C, al 5% de CO₂, durante 24 h. Como estímulo se utilizaron suspensiones bacterias vivas y muertas de 1×10^6 CFU/ml, y volúmenes de sobrenadantes de 150 μ l. Como control positivo se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de

E. coli O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1 µg/ml. Como control negativo se ensayó la producción de citoquinas en PBMCs no estimuladas. Cada tipo de estímulo fue ensayado por duplicado en cada 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. Estimulación de células HT29-MTX

Las células epiteliales intestinales secretoras de mucus HT29- MTX, se cultivaron como se ha descrito en el ejemplo 1 y, posteriormente, se incubaron en presencia de suspensiones celulares y sobrenadantes de cultivo libres de células de bifidobacterias y otras bacterias intestinales durante 24 h, siguiendo el mismo procedimiento descrito para la estimulación de PBMCs. Tras este período, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos por centrifugación, se fraccionaron y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta la detección de citoquinas.

4. Determinación de citoquinas

Las concentraciones de citoquinas (IL-8, IL-1, IFN- γ , IL-10, y TGF- β) de los sobrenadantes se midieron mediante kits ELISA de Bioscience (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

25

30

Tabla 1. Propiedades inmunomoduladoras de bifidobacterias y otras bacterias lácticas intestinales. Efecto de células viables sobre la producción de citoquinas (pg/ml) por PBMCs y de células viables y sobrenadantes de cultivo sobre la producción de la quemioquina IL8 por células epiteliales HT29MTX.

ND , no detectada

-, no evaluada

¹*Bifidobacterium animalis* IATA-A2, ²*Bifidobacterium bifidum* IATA-ES2,

³*Bifidobacterium longum* BIR-324, ⁴*Bifidobacterium longum* W11,

⁵*Bifidobacterium longum* BB536.

Tabla 1

Estímulo	Citoquinas (pg/ml)				
	IL-1 Células	INF- γ Células	IL-10 Células	IL-8 Células	IL8 Sobren
RPMI	ND	9,0 (1,0)	58,0 (3,0)	488,5 (5,5)	488,5 (5,5)
LPS	ND	12,0 (0,5)	399,0 (8,0)	-	-
<i>Bacteroides</i>	-	-	-	937,9 (80,9)	2500,2 (52,1)
¹ A2	255,0 \pm 1,0	13,0 \pm 2,0	699,0 \pm 396,0	461,1 (48,2)	462,0 (50,8)
² ES2	65,0 \pm 4,0	52,0 \pm 12,0	1091,0 \pm 329,0	837,0 (60,4)	639,7 (21,8)
³ BIR-324	ND	11,0 \pm 5,0	469,0 \pm 15,0	1558,8 (21,9)	935,2 (83,6)
⁴ W11	-	160,4 \pm 6,8	486,0 \pm 236,4	-	-
⁵ BB536	-	143,7 \pm 18,3	1390,0 \pm 268,8	-	-

REIVINDICACIONES

- 1.- Microorganismo útil para la producción de formulaciones que mejoran las defensas del individuo y reducen el riesgo de padecer enfermedades, y preferentemente las infecciones microbianas y las enfermedades de base inmunológica, caracterizado por su capacidad para modular la composición del mucus y sus interacciones con la microbiota intestinal, y por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado y seleccionado de la flora intestinal natural de individuos sanos.
- 5
- 10
- 2.- Microorganismo según la reivindicación 1, caracterizado porque es una bacteria del género *Bifidobacterium*.
- 3.- Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 2, caracterizado por ser una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum*.
- 15
- 4.- Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 3, caracterizado por ser una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium bifidum* (IATA-ES2) (CECT 7365).
- 20
- 5.- Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 4, caracterizado porque libera al medio de cultivo parte de los compuestos con capacidad para modular la composición del mucus y sus interacciones con la microbiota intestinal.
- 25
- 6.- Microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizado porque los compuestos con actividad biológica que produce y libera al medio de cultivo son de naturaleza proteica, y de masa molecular mayor de 30 kDa.
- 30

7- Microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizados por su capacidad de modular el patrón de glicosilación del mucus intestinal, a través del aumento de la síntesis de residuos galactosil $\beta(1\rightarrow3)$ N-acetil galactosamina, siendo este hasta 7 veces superior al control.

8.- Microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizados por ser capaz de favorecer la adhesión de especies bacterianas beneficiosas.

9.- Microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según la reivindicación 8 caracterizados porque las especies beneficiosas cuya adhesión favorece pueden ser *B. longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, *B. breve*, *B. bifidum* y *B. animalis*

10.- Microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizados por reducir la adhesión de especies perjudiciales y de otras comensales que aún no siendo patógenas pueden reducir la adhesión de las especies bacterianas beneficiosas.

11.- Microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según la reivindicación 10 caracterizados porque las especies perjudiciales cuya adhesión se reduce pueden ser la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Shigella*.

12.- Microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según las reivindicaciones de la 1 a la 5, caracterizados por poseer propiedades inmunoreguladoras y anti-inflamatorias, capaces de estimular la síntesis de citoquinas y reducir levemente los marcadores celulares de activación, contribuyendo a estimular las defensas y evitando los procesos

de inflamación crónica derivados de una activación excesiva del sistema inmunológico.

5 13.- Microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según la reivindicación 12, caracterizados por estimular la síntesis de altas concentraciones de las citoquinas anti-inflamatoria IL-10, y moderadas concentraciones de las citoquinas y quemoquinas pro-inflamatorias IL8, TNF-alpha e IFN- γ y reducción de los marcadores celulares de activación CD4, CD8 y CD86.

10

14.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de manera aislada o en combinación entre sí o con otros microorganismos y/o ingredientes en la producción de formulaciones con fines preventivos o
15 terapéuticos.

20

15.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según la reivindicación 14, caracterizado porque los microorganismos con los que se pueden combinar son probióticos o cultivos iniciadores.

25

16.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según reivindicación 14 caracterizados porque la formulación elaborada es un alimento.

17.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según reivindicación 14 caracterizados porque la formulación elaborada es un nutraceutico.

18.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según reivindicación 14 caracterizados porque la formulación elaborada es un suplemento.

5 19.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según reivindicación 14 caracterizados porque la formulación elaborada es un preparado farmacéutico.

10 20.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según reivindicación 14 caracterizados porque la formulación elaborada es un probiótico y/o simbiótico.

15 21.- Uso del microorganismo y compuestos producidos por el microorganismo según reivindicación 14 caracterizado porque la formulación elaborada es un nuevo alimento.

20

25

30

a)

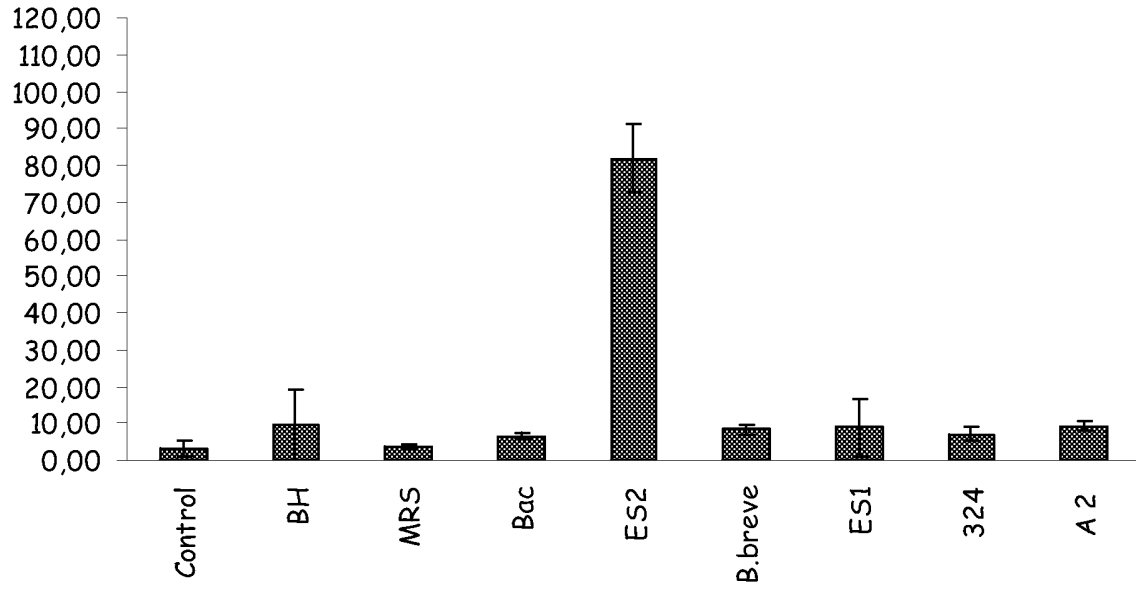


FIG 1

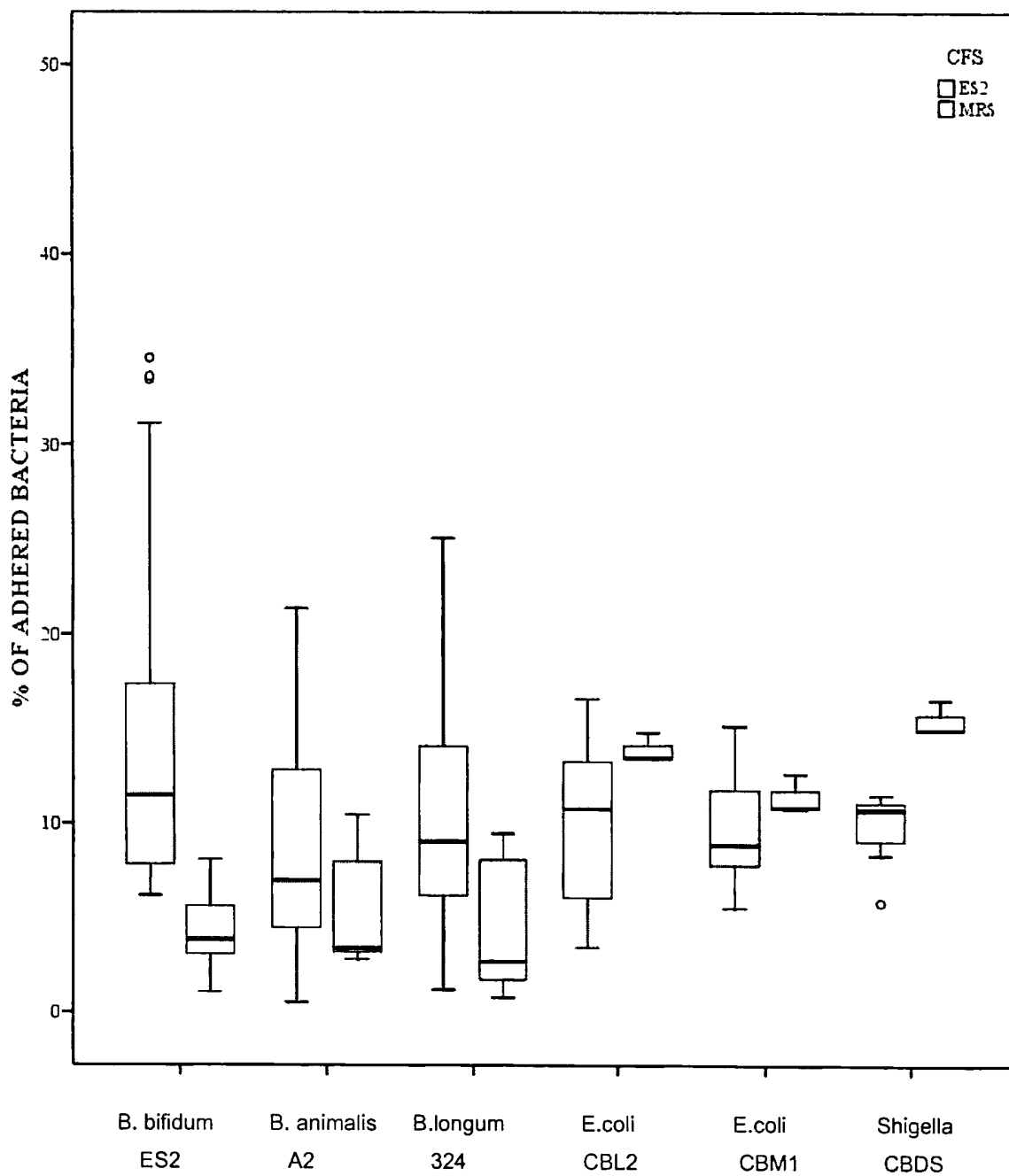


FIG 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A23L, A61K, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBL, GenSeq, GOOGLE SCHOLAR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YOUNG S.L. ET AL. Bifidobacterial species Differentially Affect Expression of Cell Surface	1-3
Y	Markers and Cytokines of Dendritic Cells Harvested from Cord Blood. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 2004, Volumen 11, N° 4, pages 686-690.	14-21
Y	GIBSON G. R. ET AL. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. American Institute of Nutrition. 20.12.1994. Pages 1401-1412. En particular pages 1404, 1405 and 1409.	14-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

“E” earlier document but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 2009 (16.11.2009)

Date of mailing of the international search report

(30/11/2009)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

N. Urquía Fernández

Telephone No. +34 91 349 30 45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070285

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VENTURA, M. ET AL. Analysis, Characterization, and Loci of the <i>tuf</i> Genes in <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> Species and their Direct Application for Species Identification. Applied and Environmental Microbiology. Nov. 2003. Volumen 69 N° 11. Pages 6908-6922. & Base of datos EMBL/GenBank/DDBJ; 16.04.2005; [on line] [Retrieved on 08.11.2009]; Número of acceso AY372041. Parcial Cds 1-988 of the <i>tuf</i> gen of <i>Bifidobacterium bifidum</i> Strain ATCC 29521.	4
A	KATAYAMA, T. ET AL. Novel Bifidobacterial Glycosidases Acting on Sugar Chains of Mucin Glycoproteins. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005. Volumen 99, N° 5. Pages 457-465.	5-9
A	MISRA, A.K. ET AL. The Selection of Bifidobacteria for the Manufacture of Fermented Milks. Australian Journal of Dairy Technology. 1991. Volumen 46, N° 1. Pages 24-26.	10-11
A	NIERS, L.E.M. ET AL. Identification of Strong Interleukin-10 Inducing Lactic Acid Bacteria which Down-regulate T Helper Type 2 Cytokines. Clinical and Experimental Allergy. 2005. Volumen 35, Pages 1481-1489.	12-15
A	MEDINA, M. ET AL. Differential Immunomodulatory Properties of <i>Bifidobacterium longum</i> Strains: Relevance to Probiotic Selection and Clinical Applications. Clinical And Experimental Immunology. Volumen 150. Pages 531-538.	12-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070285

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2009/070285

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, A23L, A61K, C12R

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, NPL, XPESP, EMBL, GenSeq, GOOGLE SCHOLAR

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	YOUNG S.L. ET AL. Bifidobacterial species Differentially Affect Expression of Cell Surface	1-3
Y	Markers and Cytokines of Dendritic Cells Harvested from Cord Blood. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 2004, Volumen 11, N° 4, páginas 686-690.	14-21
Y	GIBSON G. R. ET AL. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. American Institute of Nutrition. 20.12.1994. Páginas 1401-1412. En particular páginas 1404, 1405 y 1409.	14-21

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.
“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

16 Noviembre 2009 (16.11.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

30-NOVIEMBRE- 2009 (30/11/2009)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

N. Urquía Fernández

N° de teléfono +34 91 349 30 45

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070285

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	VENTURA, M. ET AL. Analysis, Characterization, and Loci of the <i>tuf</i> Genes in <i>Lactobacillus</i> and <i>Bifidobacterium</i> Species and their Direct Application for Species Identification. Applied and Environmental Microbiology. Nov. 2003. Volumen 69 N° 11. Páginas 6908-6922. & Base de datos EMBL/GenBank/DDBJ; 16.04.2005; [en línea] [Recuperado el 08.11.2009]; Número de acceso AY372041. Cds parcial 1-988 del gen <i>tuf</i> Cepa <i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 29521.	4
A	KATAYAMA, T. ET AL. Novel Bifidobacterial Glycosidases Acting on Sugar Chains of Mucin Glycoproteins. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005. Volumen 99, N° 5. Páginas 457-465.	5-9
A	MISRA, A.K. ET AL. The Selection of Bifidobacteria for the Manufacture of Fermented Milks. Australian Journal of Dairy Technology. 1991. Volumen 46, N° 1. Páginas 24-26.	10-11
A	NIERS, L.E.M. ET AL. Identification of Strong Interleukin-10 Inducing Lactic Acid Bacteria which Down-regulate T Helper Type 2 Cytokines. Clinical and Experimental Allergy. 2005. Volumen 35, Páginas 1481-1489.	12-15
A	MEDINA, M. ET AL. Differential Immunomodulatory Properties of <i>Bifidobacterium longum</i> Strains: Relevance to Probiotic Selection and Clinical Applications. Clinical And Experimental Immunology. Volumen 150. Páginas 531-538.	12-13

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)