

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
2 de Julio de 2009 (02.07.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/080862 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 1/20 (2006.01)

ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, E-46100 Burjassot (VALENCIA) (ES). NADAL GIMENEZ, Inmaculada [ES/ES]; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, E-46100 Burjassot (VALENCIA) (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2008/070243

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de Diciembre de 2008 (23.12.2008)

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

(25) Idioma de presentación: español

(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, 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, 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.

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200703427
24 de Diciembre de 2007 (24.12.2007) ES

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

(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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SANZ HERRANZ, Yolanda [ES/ES]; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, E-46100 Burjassot (VALENCIA) (ES). SANCHEZ SANCHEZ, Ester [ES/ES]; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, E-46100 Burjassot (VALENCIA) (ES). MEDINA, Marcela Susana [AR/ES]; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (IATA), Apartado 73, E-46100 Burjassot (VALENCIA) (ES). DE PALMA, Giada [IT/ES]; INSTITUTO DE AGROQUIMICA Y TECNOLOGIA DE

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- con la parte de lista de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible por medio de la Oficina Internacional previa petición

(54) Title: MICROORGANISMS FOR IMPROVING THE HEALTH OF INDIVIDUALS WITH DISORDERS RELATED TO GLUTEN INGESTION

(54) Título: MICROORGANISMOS PARA MEJORAR EL ESTADO DE SALUD DE INDIVIDUOS CON DESORDENES RELACIONADOS CON LA INGESTA DE GLUTEN

(57) Abstract: The invention relates to microorganisms for the treatment of food allergies, specifically coeliac disease, as well as to methods for the selection thereof. The action mechanisms of said microorganisms include: (i) the regulation of the innate and adaptive immunological response; (ii) the reduction of the concentration of toxic epitopes in the intestinal lumen; (iii) the strengthening of the barrier defense function against harmful antigens and bacteria; and (iv) the provision of enzymatic activities that promote digestion.

(57) Resumen: La presente invención aporta microorganismos para el tratamiento de alergias alimentarias, más concretamente la enfermedad celiaca, así como métodos para su selección. Sus mecanismos de acción incluyen: (i) la regulación de la respuesta inmunológica innata y adaptativa; (ii) la reducción de la concentración de epítomos tóxicos en la luz intestinal; (iii) el fortalecimiento de la función barrera defensiva frente a bacterias y antígenos perjudiciales, y (iv) el aporte de actividades enzimáticas que favorecen la digestión.

WO 2009/080862 A1

MICROORGANISMOS PARA MEJORAR EL ESTADO DE SALUD DE INDIVIDUOS CON DESÓRDENES RELACIONADOS CON LA INGESTA DE GLUTEN

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

ESTADO DE LA TÉCNICA

La enfermedad celíaca es una enteropatía, afección del intestino, de
15 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
20 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.
25 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. La relación entre la ingesta de gluten y las
30 alteraciones psiquiátricas, neurológicas y del comportamiento se considera

fruto de la generación de péptidos bioactivos, como por ejemplo las exorfinas que poseen actividad opioide.

Las proteínas del gluten (gliadinas y prolaminas análogas y gluteninas) constituyen el principal factor ambiental desencadenante de la enfermedad
5 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
10 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
15 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
20 subpoblaciones, implicando así a la inmunidad adquirida. La subpoblación Th2 interacciona con las células B que se diferencian en células plasmáticas y producen anticuerpos anti-gliadina, anti-endomiso y anti-transglutaminasa tisular. La subpoblación Th1 es la responsable de un aumento de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (principalmente
25 IFN- γ) y de la relación IFN- γ /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
30 (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- γ (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 la reducción de la proporción y 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*. 2007 Dec;56(Pt 12):1669-74; Collado et al. Specific duodenal and faecal bacterial groups are associated with paediatric celiac disease. *J Clin Pathol*. 2008 Nov 7.). 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. Además, los individuos que presentan enfermedad celíaca refractaria (5-
5 10%) no responden a esta pauta dietética.

Las alternativas terapéuticas o coadyuvantes que actualmente se encuentran en fase de investigación para el tratamiento de la enfermedad celíaca incluyen la administración oral de enzimas proteolíticas obtenidas a partir de plantas o microorganismos para acelerar la digestión
10 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.
15 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
20 demuestren su efectividad in vivo en individuos que ingieran 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 y tan sólo permitiría la ingesta ocasional de gluten reduciendo
25 el umbral de toxicidad. 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
30 associated with gluten intolerance. 20070184049/A1), compuestos que bloqueen los sitios de unión de los péptidos del gluten a las moléculas

HLA-DQ2 or 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- γ (Maroun et al., 5 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 10 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). Estas estrategias suponen la modificación de moléculas implicadas en múltiples procesos biológicos por lo que su 15 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 20 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 25 processing: new perspectives for celiac disease. Appl Environ Microbiol.73:4499-507).

El uso de cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* como probióticos o preparados farmacéuticos para el tratamiento y prevención de la enfermedad celíaca y los desórdenes asociados no se han propuesto 30 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.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

10

La presente invención aporta un método para la selección de microorganismos o cepas microbianas capaces de modular la respuesta inmune. Estos microorganismos, preferentemente pertenecientes al género *Bifidobacterium*, son susceptibles de ser empleados en el tratamiento o la prevención de base inmunológica tales como la enfermedad celíaca, debido a sus capacidades inmunomoduladoras.

15

Además, la invención también aporta una nueva cepa del género *Bifidobacterium* (CECT 7347; en adelante "cepa de la invención" (IATA-ES1)), sus componentes celulares, moléculas secretadas y compuestos resultantes de su metabolismo y las combinaciones de cualquiera éstos entre sí y/o con otros microorganismos o compuestos bioactivos, 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.)

25

La cepa de la invención fue aislada a partir de heces de lactantes sanos e identificadas por secuenciación del gen del ARNr 16S y el gen *tuf*. Esta cepa posee propiedades inmunomoduladoras capaces de 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 de tipo Th2 características de las alergias a las

30

proteínas de la dieta mediadas por IgE que pueden originarse como consecuencia de la ingesta concreta de proteínas de trigo y otros cereales. La cepa de la invención se caracteriza por inducir baja producción de la citoquina Th1 IFN- γ y de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 y alta producción de las citoquinas reguladoras IL10 y TGF- β 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.

La cepa de la invención 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 cepa de la invención 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* NCDO712, que posee una proteinasa anclada a la superpie celular, también potencia los efectos hidrolíticos debidos exclusivamente a la acción de las bifidobacterias.

La cepa 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- γ , 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 κ B (Ejemplo 3, Tabla 3).

La cepa de la invención y así como los compuestos derivados de ésta también 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- α e IFN- γ) y activando la de citoquinas reguladoras (IL-10).

La cepa de la invención también posee actividades metabólicas (por ejemplo: fosfatasa, esterasa, lipasa, galactosidasa, glucosidasa y N-acetilglucosaminidasa) que favorecen la digestión de nutrientes y mejoran el síndrome de malabsorción y desnutrición propio de pacientes celíacos.

La cepa de la invención posee 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.

Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para la selección de microorganismos o cepas de microorganismos capaces de modular la respuesta inmune en alergias alimentarias que

comprende: a) aislar microorganismos de muestras, preferentemente heces, provenientes de individuos sanos, preferentemente individuos lactantes, y seleccionar aquellos microorganismos de la etapa a) capaces de modular la respuesta inmune e hidrolizar, inactivar o interferir en el mecanismo de acción al menos un agente causante de alergias alimentarias, preferentemente la enfermedad celíaca. Preferentemente, los microorganismos seleccionados en la etapa a) pertenecen a géneros o especies potencialmente probióticos. En una realización preferida, la respuesta inmune modulada por el microorganismo obtenido de la etapa a) es la respuesta pro-inflamatoria tipo Th1 o Th2. Además, los microorganismos obtenidos en la etapa a), alternativamente o sumatoriamente a su capacidad moduladora de la respuesta inmune, pueden ser seleccionados por su capacidad para aumentar la viabilidad y/o integridad de las células epiteliales mejorando la función barrera intestinal.

Los microorganismos seleccionados por el método anterior o capaces de hidrolizar, inactivar o interferir en el mecanismo de acción de al menos un agente causante de alergias alimentarias y de modular la respuesta inmune pueden ser utilizados para el tratamiento o la prevención de alergias alimentarias (en adelante "microorganismos de la invención"). Así un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de estos microorganismos para su uso como medicamento o composiciones alimenticias, preferentemente, para el tratamiento o la prevención de alergias alimentarias. Estos microorganismos pueden pertenecer a cualquier género o especie bacteriana, preferentemente del género *Bifidobacterium* y, más preferentemente, de la especie *Bifidobacterium longum*.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana con número de depósito CECT 7347.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición (en adelante, la "composición de la invención") que comprende al menos uno

de los microorganismos de la invención, preferentemente la cepa de la invención, donde además preferentemente se encuentran en la composición en una proporción de entre 0.1 y 99.9%, preferentemente entre 1% y 99% y mas preferentemente entre el 10% y el 90%. Esta
5 composición puede comprender además otros microorganismos o medios que potencien, entre otras, su capacidad inmunoreguladora o de hidrolizar, inactivar o interferir los mecanismos de acción de los agentes causantes de las alergias alimentarias del microorganismo o cepa de la invención”.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una composición obtenible a
10 partir de compuestos bioactivos derivados de los microorganismos de la invención, como son, a modo ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, el sobrenadante de un cultivo de cualquiera de los microorganismos de la invención (en adelante “sobrenadante de la invención”), los extractos obtenidos a partir del cultivo puro o mixto de
15 cualquiera de los microorganismos de la invención o la cepa de la invención (en adelante, “extracto de la invención”), los componentes celulares o fracciones sub-celulares, metabolitos y productos secretados por los microorganismos o cepa de la invención obtenidos por técnicas físico-químicas y/o biotecnológicas conocidas para un experto en la
20 materia Estos compuestos bioactivos derivados del microorganismo de la invención, en adelante “compuestos bioactivos derivados de la invención”, pueden ser empleados para la elaboración de alimentos, suplementos, nutracéuticos, productos basados en probióticos o simbióticos, nuevos alimentos o medicamentos, así como sus diferentes usos también forman
25 parte de la presente invención.

Otro aspecto de la invención se refiere un material de soporte para la elaboración de productos alimenticios que comprende la composición de la invención o al menos un microorganismo de la invención, preferentemente, la cepa de la invención. En una realización preferida el microorganismo de
30 la invención está contenido en el material de soporte en una cantidad de al menos alrededor de 10^5 ufc/g de material de soporte, preferentemente

entre 10^6 ufc/g y 10^{12} ufc/g, más preferentemente entre 10^6 ufc/g y 10^{10} ufc/g. Según lo expuesto, forman también parte de la presente invención cualquier producto alimenticio o suplemento que comprenda la composición de la invención o el material de soporte de la invención.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica o composición alimenticia que comprende cualquiera de los siguientes compuestos: la composición de la invención, los compuestos bioactivos derivados de la invención, el sobrenadante de la invención, el extracto de la invención, un microorganismo de la invención, la cepa de la invención y,
10 opcionalmente, medios y/o excipientes farmacológicamente aceptables. La cantidad de microorganismos que debe contener la composición farmacéutica o la composición alimenticia variará en función del tipo de patología a la que esté destinada a tratar. Preferentemente dicha patología es una alergia alimentaria y, más preferentemente, la enfermedad celíaca.
- 15 En el caso de la elaboración de composiciones alimenticias, y de acuerdo con la presente invención, al menos un microorganismo de la invención o un compuesto bioactivo derivado de la invención, es incorporado a un material de soporte preferentemente en una cantidad de alrededor entre 10^5 ufc/g y 10^{14} ufc/g de material de soporte, más presentemente alrededor
20 de 10^8 ufc/g y 10^{13} , más preferentemente alrededor de ufc/g, y todavía mas preferentemente alrededor de 10^7 ufc/g y 10^{12} ufc/g, en el caso de un microorganismo de la invención, y en el caso de un compuesto bioactivo derivado de la invención en una proporción de entre 0.1 y 99.9%, preferentemente entre 1% y 99% y mas preferentemente entre el 10% y el
25 90%. Estas composiciones alimenticias pueden ser empleadas para la elaboración de nutracéuticos, alimentos funcionales, probióticos, simbióticos, supletamentos nutricioanes, o cualquier otro tipo de producto destinado al tratamiento o la prevención preferentemente de alergias alimentarias y, mas preferentemente, de la enfermedad celíaca.

La composición farmacéutica o composición alimenticia de la invención puede encontrarse preferentemente en forma de tabletas, cápsulas, microcápsulas, polvos, disoluciones, pastas, etc.

Otro de los aspectos de la invención se refiere a la composición de la invención, compuestos bioactivos derivados de la invención, el sobrenadante de la invención, extracto de la invención, la composición farmacéutica de la invención, las fracciones subcelulares de la invención, la composición alimenticia de la invención o el material de soporte de la invención, donde el microorganismo de la invención o la cepa de la invención está combinado con otro microorganismo, un sobrenadante obtenido a partir de su cultivo o las fracciones subcelulares del mismo. Preferentemente, dicho microorganismo pertenece al género *Lactococcus*, preferentemente de la especie *Lactococcus lactis* y, más preferentemente, es la cepa de *Lactococcus lactis* NCDO712.

Un último aspecto de la invención se refiere a las diferentes formas de presentación de la composición de la invención pudiendo ser formulada como alimento, nutracéutico, preparado farmacéutico, suplemento, probiótico o simbiótico, o nuevo alimento.

20 **Definiciones:**

Lactantes: a lo largo de la descripción este término se referirá preferentemente a individuos sanos, preferentemente de menos de dos años, más preferentemente de menos de 1 año y mas preferentemente de menos de 6 años, que han sido alimentado principalmente con leche materna. Preferentemente, estos individuos son humanos.

Individuo sano: este término se refiere preferentemente a aquel que no sufre ningún tipo de patología ni crónica ni aguda bajo criterio de médicos especialistas. Preferentemente dicha patología provoca inflamación del epitelio intestinal, más preferentemente la enfermedad celíaca.

30 Alergias alimentarias: a lo largo de la descripción este término se referirá preferentemente a aquellas alergias alimentarias producidas

preferentemente por leche, huevos, legumbres, nueces, crustáceos, pescados moluscos, sésamo, semillas de girasol, semillas de algodón, semillas de amapola, frijoles, guisantes, lentejas y, más preferentemente, por el gluten.

5 Respuesta pro-inflamatoria tipo Th1: aquella respuesta a un estímulo que provoca una elevada producción de citoquinas de tipo Th1, y preferentemente de la citoquina IFN-gamma superior al control preferentemente en al menos 100 veces, más preferentemente en al menos un 15 veces, más preferentemente en al menos 10 veces y todavía
10 más preferentemente en al menos en 4 veces.

Respuesta pro-inflamatoria tipo Th2: aquella respuesta a un estímulo que provoca una elevada producción de citoquinas de tipo Th2, y preferentemente de la citoquina IL4 superior al control en un al menos 100 veces, más preferentemente en al menos 15 veces, mas preferentemente
15 en al menos 10 veces y todavía mas preferentemente en al menos un 4 veces%.

Géneros o especies potencialmente probióticas: Preferentemente a lo largo de la descripción este término se referirá a especies y cepas de las siguientes divisiones filogenéticas y géneros de procariotas: *Archaea*,
20 *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Fibrobacters*, *Deferribacteres*, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cianobacteria*, *Methanobrevibacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*. *Peptostreptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*,
25 *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, etc. Así como las especies y cepas de hongos y
30 levaduras *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, entre otros.

Medios: este término se referirá preferentemente a medios de cultivo, sustratos, prebióticos, fibras, compuestos bioactivos, excipientes, ingredientes, etc. que mejoren cualquier característica de los microorganismos de la invención para su uso, preferentemente, en la elaboración de medicamentos, composiciones nutricionales, composiciones, materiales de soporte, sobrenadantes y alimentos de la invención (por ejemplo, estabilidad, capacidades de inmunomoduladoras, de adhesión, de fermentación, de hidrolización o inactivación de agentes causantes de alergias, etc.)

Material de soporte: preferiblemente el material de soporte es una composición alimenticia seleccionada de leche, yogurt, queso, leche fermentada, productos alimenticios basados en leche fermentada, cereales fermentados, harinas, zumos, azúcar, reposterías, helados, formulaciones para la alimentación infantil, etc.

Medicamento: a lo largo de la descripción este término se referirá a composiciones o formulaciones farmacéuticas preferentemente destinadas al tratamiento o la prevención de alergias, alergias alimentarias, enfermedades inflamatorias intestinales, infecciones gastrointestinales y translocación de microorganismos patógenos o sus toxinas, alteración del equilibrio intestinal (disbiosis), sobre-crecimiento bacteriano, alteración de la permeabilidad intestinal, intolerancia a alimentos, enfermedad celíaca, síndrome de malabsorción, etc.

Composición alimenticia: a lo largo de la descripción este término se referirá a alimentos (funcionales y nuevos alimentos), suplementos alimentarios, fórmulas con fines nutricionales, y nutracéuticos destinados preferente al tratamiento o la prevención de alergias, alergias alimentarias, enfermedades inflamatorias intestinales, infecciones gastrointestinales y translocación de microorganismos patógenos o sus toxinas, alteración del equilibrio intestinal (disbiosis), sobre-crecimiento bacteriano, alteración de la permeabilidad intestinal, intolerancia a alimentos, enfermedad celíaca, síndrome de malabsorción, etc.

Compuesto bioactivo derivado de un microorganismo: cualquier compuesto o molécula que forme parte del microorganismo como parte estructural, componente celular, fracción subcelular, metabolito o molécula secretada, obtenible por técnicas físico-químicas y biotecnológicas, entre
5 las que se pueden encontrar 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 cromatográficas, la clonación y sobre-
10 expresión de los genes que codifican las moléculas bioactivas y que tenga la capacidad de ejercer una función beneficiosa para la salud.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 **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 la cepa de la invención; 4) G-P-T incubadas con la cepa de la invención (*Bifidobacterium IATA-ES1*). Panel
20 B: 1) control G-P; 2) control G-P-T; 3) G-P incubadas con la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCDO712.; 4) G-P-T incubadas con la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCDO712.

Figura 2. Cromatograma obtenido de la fracción dializable del digerido in vitro de gliadinas. El pico 2 es el preferentemente hidrolizado por la cepa
25 de la invención.

Figura 3. Alteración de la viabilidad celular (medida como actividad endolisosomal) causada por la fracción soluble y digerida de las gliadinas (Gld), en presencia o ausencia de bifidobacterias in vitro media. Albúmina bovina –BSA- (control negativo); BifA2 (*B. animalis*); Bb (*B. bifidum*) y BL
30 (Cepa de la invención - *Bifidobacterium logum* IATA-ES1-). Los resultados

expresados en valores medios y desviaciones standard determinadas por cuadruplicado.

Figura 4. Producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α) y expression del factor nuclear κ B (NF- κ B) en cultivos de células Caco-2 expuestas a la fracción soluble y digerida de las gliadinas (Gld), en presencia o ausencia de bifidobacterias in vitro media. Albúmina bovina –BSA- (control negativo); BifA2 (*B. animalis*); Bb (*B. bifidum*) y BL (Cepa de la invención - *Bifidobacterium logum* IATA-ES1-). Los resultados expresados en valores medios y desviaciones standard determinadas por cuadruplicado.

10

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para la selección de microorganismos o cepas de microorganismos capaces de modular la respuesta inmune en alergias alimentarias que comprende: a) aislar microorganismos de muestras provenientes de individuos sanos, preferentemente individuos lactantes, y seleccionar aquellos microorganismos del paso a) capaces de modular la respuesta inmune e hidrolizar, inactivar o interferir en el mecanismo de acción de al menos un agente causante de alergias alimentarias, preferentemente la celiacía. Preferentemente los microorganismos seleccionados en el paso a) pertenecen a géneros o especies potencialmente probióticas.

Otro de los aspectos de la presente invención se refiere a microorganismos capaces de hidrolizar inactivar o interferir en el mecanismo de acción de al menos un agente causante de alergias alimentarias y de modular la respuesta inmune. Estos microorganismos pueden ser utilizados preferentemente para el tratamiento o la prevención de alergias alimentarias, enfermedades inflamatorias intestinales, desequilibrios en el ecosistema intestinal (disbiosis), sobre-crecimiento bacteriano, síndrome de malabsorción, infecciones gastrointestinales y

30

translocación de microorganismos patógenos o de sus toxinas, y alteraciones de la permeabilidad intestinal.

La invención también aporta microorganismos útiles para la producción de formulaciones que reduzcan los riesgos y mejoren el estado de salud de
5 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 microbiota intestinal natural de individuos sanos por su propiedades antiinflamatorias y reguladoras.

10 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;
15 (iii) el fortalecimiento de la función barrera defensiva frente a bacterias u otros agentes pro-inflamatorios 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
20 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,
25 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
30 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.* 5 3(7):918-32).

Los microorganismos de la invención pertenecen, preferentemente, al género *Bifidobacterium*. Los microorganismos de este género ofrecen ventajas en las formulaciones de alimentos, nuevos alimentos, probióticos, simbióticos, suplementos, nutracéuticos, y formulaciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca y los 10 desórdenes asociados. Las bifidobacterias tienen una habilidad especial para colonizar el tracto intestinal de los recién nacidos, contribuyendo de forma significativa al desarrollo de sus defensas.

En una realización particular, los microorganismos de la invención pertenecen preferentemente a la especie *Bifidobacterium longum*. Como 15 ejemplo, y sin que limite el alcance de la invención, la cepa de la invención perteneciente a esta especie ha sido aislada a partir de heces de lactantes sanos e identificada por secuenciación del gen del ARNr 16S (Ejemplo 6) y del gen *tuf*. El fragmento secuenciado (1437 bases) se amplificó por PCR utilizando los cebadores 27f y 1401r y para la secuenciación se emplearon 20 además los cebadores 530f y U-968f de acuerdo con los procedimientos descritos por otros autores (Satokari et al., 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504-513; Favier et al. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 219-226). Mediante el alineamiento de la secuencia obtenida con las existentes en 25 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). Parte del gen *tuf* (498 pb) se amplificó y secuenció con los cebadores descritos por Ventura et al. (Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in lactobacillus and bifidobacterium species and their direct 30 application for species identification. *Appl Environ Microbiol.* 2003;

69(11):6908-22). En este caso también se detectó máxima similitud con la especie *B. longum* y concretamente con la secuencia correspondiente de la cepa *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 (número de acceso AY372042.1) utilizando el mismo procedimiento.

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

10 Otro aspecto de la invención se refiere a una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum* y que ha sido depositada 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
15 acuerdo con la homología de la secuencia del gen del ARNr 16S con otras actualmente disponibles en las bases de datos (GenBank), como se describe en el ejemplo 6; así como con la homología del gen *tuf* con el de otras cepas de esta especie. Ésta constituye un ejemplo de una cepa del género *Bifidobacterium* que posee las propiedades que le permite su uso
20 en formulaciones farmacéuticas o medicamentos, alimentos (nuevos o funcionales) o suplementos nutricionales o alimentarios.

Los microorganismos de la invención y, preferentemente, la cepa de la invención, pueden ser combinados con otros microorganismos y compuestos bioactivos para mejorar sus propiedades protectoras y
25 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 la función barrera intestinal, y el aumento del aporte de peptidasas y otras enzimas que favorezcan la digestión incrementando su concentración total
30 o aumentando su tipo y especificidad.

Así otro aspecto de la invención comprende la combinación de bifidobacterias con otros microorganismos o compuestos bioactivos, 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 de la invención 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- β 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 la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCD0712 (Figura 1, panel B, carreras 3 y 4). Esta hidrólisis fue superior a la obtenida sólo con la cepa de la invención (Figura 1, panel A carreras 3 y 4).

Otro aspecto de la invención se refiere a la utilización de los microorganismos de la invención, preferentemente la cepa de la invención, así como de sus equivalentes no viables inactivados por distintos procedimientos (congelación, calor, radiación, etc.) con fines inmunomoduladores.

Los microorganismos de la invención no viables inactivados por distintos procedimientos (congelación, calor, radiación, etc.) siguen pudiéndose utilizar con fines terapéuticos o preventivos y forman también parte de la presente invención. 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 ejemplo 3 y en la tabla 3, se demuestra que suspensiones celulares de la cepa de la invención, 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- γ) y aumentando la síntesis de citoquinas reguladoras (por ejemplo IL-10).

Además, los compuestos bioactivos derivados del microorganismo de la invención tales como los compuestos estructurales, resultantes del metabolismo, moléculas secretadas por cualquiera de los microorganismos o cepa de la invención, obtenidos por técnicas sobradamente conocidas, forman parte de la presente invención y pueden ser también utilizables para la inducción de la inmunomodulación. Por ejemplo 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, la clonación de los genes que codifican dichos compuestos y su sobre-expresión.

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- β). 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 de la invención 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 de la invención 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, los microorganismos de la invención, la composición del invención, los compuestos bioactivos derivados de la invención, el sobrenadante de la invención, el extracto de la invención, la composición farmacéutica o nutricional de la invención, la cepa de la invención, sus componentes celulares o fracciones sub-celulares, compuestos resultantes de su metabolismo, moléculas secretadas y sus combinaciones se caracterizan porque son capaces de regular o modular respuesta inmunológica innata y adaptativa causada por los péptidos nocivos del gluten u otras alergias alimentarias.

La cepa de la invención se ha seleccionado por sus propiedades inmunomoduladoras capaces de 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- γ (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- β (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- β) 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 de la invención 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- γ 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. Los microorganismos de la invención, así como la cepa de la invención, compuesto bioactivos derivados de la 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.

Los microorganismos de la invención son capaces de inhibir bacterias con potencial patogénico 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 inhibitorio 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 de la invención. En la tabla 5, se muestra además el efecto inhibitorio 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, los microorganismos o la cepa de la invención pueden 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- γ y TNF- α) estimulada por la microbiota intestinal de individuos celíacos en células mononucleares de sangre periférica. Por ejemplo, concentraciones de IFN- γ de 90,8 y de TNF- α 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 la cepa de la invención (Ejemplo 7). 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.

Además, los microorganismos de la invención se caracterizan por ser capaces de transportar los péptidos del gluten resultantes de la digestión gastrointestinal, reduciendo la concentración de epítomos nocivos.

Concretamente, la cepa de la invención 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 epítomos 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 epítomos tóxicos de un digerido de gliadinas con pepsina tripsina y pancreatina (como se indica en el Ejemplo 2) de 2349 ppm de gluten determinados por ELISA sándwich fue reducida a 169 pmm de gluten tras ser incubado con suspensiones celulares de la cepa de la invención. Asimismo, la incubación de la cepa de la invención con digeridos de gliadinas en condiciones gastrointestinales y dializados, con un tamaño inferior a 15 kDa, y su posterior análisis por HPLC en fase

inversa puso de manifiesto la capacidad de esta bifidobacteria para reducir la concentración de la fracción #2, que fue la mayoritaria y que contiene péptidos inmunogénicos identificados por espectrometría de masas, en al menos un 10%, propiedad que no presentaron el resto de cepas ensayadas (Ejemplo 8, Figura 2). Los efectos biológicos sobre el epitelio intestinal de esta propiedad de la cepa *Bifidobacterium longum* IATA-ES1 se han demostrado tras la incubación de los distintos digeridos en cultivos de células Caco-2, tal y como se pone de manifiesto en el Ejemplo 8. Dicho ejemplo demuestra que la cepa de la invención puede así aumentar la viabilidad de las células epiteliales, a diferencia del resto de cepas ensayadas (Ejemplo 8, Figura 3). Además, la co-incubación de la cepa de la invención con el digerido de gliadinas redujo el efecto de este sobre la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF-alfa y la expresión del factor NkB responsable la expresión de genes pro-inflamatorias (Ejemplo 8, Figura 4).

La capacidad de los microorganismos de la invención y preferentemente de la cepa de la invención 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 de los digeridos de gliadinas con suspensiones celulares de la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCD0712 (Figura 1, panel B, carreras 3 y 4). Esta hidrólisis fue superior a la obtenida sólo con la cepa de la invención (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* NCDO712 en forma de extractos.

La cepa de la invención 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- γ , 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) κ B, p50, p65 (RelA), c-Rel y Rel B determinadas mediante un ensayo ELISA (Trans AM NF κ 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).

Los microorganismos de la invención, compuestos bioactivos derivados de la 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 epítomos nocivos. Como ejemplo, la cepa de la invención 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, esta cepa es una de las que posee mayor actividad iminopeptidasica (>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.

Así, la cepa de la invención, compuestos bioactivos derivados de la invención, sus componentes celulares, compuestos resultantes de su metabolismo, moléculas secretadas y sus combinaciones posee 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 celíaco.

Finalmente, otra realización particular es el uso del microorganismo de la presente invención, compuestos bioactivos derivados de la 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, u otras alergias alimentarias.

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

La cepa de la invención posee capacidad de adhesión (1-4%) a mucina y es resistente al pH ácido del estómago (2,0; 2,5 y 3,0) y a las altas
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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 aspecto particular de la presente invención comprende el uso de los microorganismos de la presente invención, la cepa de la invención o compuestos bioactivos derivados de la invención en la elaboración de formulaciones en forma de un alimento.

De esta manera, los microorganismos de la invención pueden formar 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.

Otro aspecto particular de la presente invención comprende el uso de los microorganismos, la cepa de la presente invención o los compuestos bioactivos derivados de la 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. En el caso del uso de los microorganismos, cepa de la invención o compuestos bioactivos de la 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.

Otro aspecto particular de la presente invención comprende el uso de los microorganismos de la invención, la cepa de la invención o de los compuestos bioactivos de la invención 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.

En otra realización particular de la invención los microorganismos de la invención, cepa de la invención o compuestos bioactivos de la invención se utilizaría en la elaboración probióticos y/o simbióticos (combinaciones de probióticos y prebióticos), donde los microorganismos son incorporados, por ejemplo vivos o liofilizados, en cantidades y condiciones adecuadas que permitan llevar a cabo su efecto beneficiosos o terapéutico sobre individuos con alergias alimentarias, preferentemente aquellas relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo así sus riesgos y mejorando su estado de salud.

Un último objeto particular de la presente invención comprende el uso de los microorganismos de la invención, la cepa de la invención o compuestos bioactivos de la invención en la elaboración de nuevos alimentos. Entendiendo como nuevos alimentos 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 el estado de salud.

20

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

EJEMPLO 1. 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.

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 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 estreptomina 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 uso lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1 μ 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 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

Las concentraciones de citoquinas (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.

Tabla 1. 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- γ	IL-10	TGF- β
RPMI	ND	9,0 \pm 1,0	58,0 \pm 3,0	ND
LPS	ND	12,0 \pm 0,5	399,0 \pm 8,0	ND
¹ ES1	103,0 \pm 37,0	10,1 \pm 1,0	2459,0 \pm 28,0	236,0 \pm 119,0
² A2	255,0 \pm 1,0	13,0 \pm 2,0	699,0 \pm 396,0	ND
³ ATCC15707	-	66,1 \pm 23,9	4098,4 \pm 1551,7	-
⁴ BIR-324	ND	11,0 \pm 5,0	469,0 \pm 15,0	ND
⁵ W11	-	160,4 \pm 6,8	486,0 \pm 236,4	-
⁶ BB536	-	143,7 \pm 18,3	1390,0 \pm 268,8	-
⁷ LM1V	233,0 \pm 99,0	27,0 \pm 15,0	166,0 \pm 53,5	ND

ND , no detectada

-, no evaluada

¹Cepa de la invención (IATA-ES1), ²*Bifidobacterium* IATA-A2, ³*Bifidobacterium longum* ATCC15707, ⁴*Bifidobacterium* BIR-324, ⁵*Bifidobacterium longum* W11, ⁶*Bifidobacterium longum* BB536, ⁷*Lactobacillus reuteri* LM1V.

5

EJEMPLO 2. PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN DE BIFIDOBACTERIAS CAPACES DE HIDROLIZAR Y TRANSPORTAR LOS PÉPTIDOS DEL GLUTEN REDUCIÉNDO 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 50mM 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

30

mM del sustrato y 50 μ l 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).

5 La hidrólisis de los péptidos se determinó mediante el ensayo de la L-amino ácido oxidasa (Hejgaard, 1978, Rapad assay to detect peptidases in column effluent fractions using L-amino acid oxidase. Analytical Biochem 90: 835-839). Se incubaron 100 μ l del tampón de reacción conteniendo una concentración 0.5 mM con 50 μ l del extracto enzimático durante 20
10 min. Tras este período se añadieron 100 μ 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
15 hidrolizar 1 μ 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
20 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 μ 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
25 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
30 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-µm 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).

25

Tabla 2. Actividad peptidásica de cepas de bifidobacterias y latobacilos de origen intestinal frente a sustratos sintéticos.

Lactobacilos 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
¹ 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
² 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
³ 15707	27.4± 2.0	37.9± 0.8	-	-	5.1±0.5	0.02±0.6	0.2±0.5
⁴ 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 ± SD.

-, no evaluada

¹Cepa de la invención (IATA-ES1), ²*Bifidobacterium* IATA-A2,³*Bifidobacterium longum* ATCC15707, ⁴*Lactobacillus reuteri* LM1V.

5

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.

10

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

20 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.

5

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

ND, no detectado

¹Cepa de la invención (IATA-ES1)

²*Bifidobacterium* IATA-A2

10 ³*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 PATOGENICO.

15

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.

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 patogénico. 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 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 liófilos 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 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 μ 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 halos de inhibición alrededor del pocillo.

5 **Tabla 4. Inhibición de bacterias potencialmente patógenas aisladas de pacientes celíacos por cultivos de las bifidobacterias.**

Cepas	Inhibición (cm) por las cepas de <i>Bifidobacterium</i>	
	IATA-A2	IATA-ES1
<i>Bacteroides</i> CAQ4	0,4	1,4
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0,5	1,3
<i>Clostridium 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

10 **Tabla 5. Inhibición de bacterias potencialmente patógenas aisladas de pacientes celíacos por sobrenadantes de cultivos de las bifidobacterias.**

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

15 **EJEMPLO 5. EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE BIFIDOBACTERIAS A CONDICIONES DE ESTRÉS GASTROINTESTINAL**

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

Cepas	Viabilidad*				Capacidad de crecimiento †					
	(%)				pH					
	pH 3		pH 2,5		3		2,5		2	
	3	2,5	2	Contr ol	Log ufc/m l	(%)	Log ufc/m l	(%)	Log ufc/m l	(%)
IATA- ES1	99,4± 4,2	86,2± 13,0	57,9± 2,3	9,3±0 ,0	9,3±0 ,0	99,7	8,1±0 ,0	86,7	5,2±0 ,0	56,1
BIR 324	89,4± 2,3	73,1± 1,0	61,6± 1,7	9,1±0 ,0	8,8±0 ,0	96,9	8,8±0 ,2	96,8	5,79± 0,1	63,6
Bion 3	98,4± 1,9	78,4± 1,7	11,6± 3,7	9,0±0 ,0	7,3±0 ,0	81,2	4,8±0 ,1	52,8	-	-
NCIM B 8809	1,8±0 ,5	-	-	8,1±0 ,0	-	-	-	-	-	-

*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 %.

†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 %.

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

nd, no determinado

-, no detectado

Tabla 7. Tolerancia de las cepas de *Bifidobacterium* a la presencia de sales biliares

Cepas	Capacidad de crecimiento relativa*(%)				
	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

5 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 µg/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

10 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),

15 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 GFXTMPCR (Amershan, Bioscience, UK). Para la secuenciación

20 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.*,

25 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

30 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).

5 **EJEMPLO 7. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CEPAS DEL**
GÉNERO BIFIDOBACTERIUM PARA REGULAR LAS RESPUESTAS
PRO-INFLAMATORIAS CAUSADAS POR LA MICROBIOTA
INTESTINAL ALTERADA DE INDIVIDUOS CELÍACOS CON
10 **ENFERMEDAD ACTIVA Y TRAS SER TRATADOS CON DIETA EXENTA**
DE GLUTEN.

1. Preparación de los cultivos de bifidobacterias intestinales y muestras fecales para su evaluación.

Las cepas del género Bifidobacterium se inocularon en 10 ml de caldo MRS (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) conteniendo un 0.05%
15 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.
20 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.

25 Heces de pacientes celíacos con enfermedad activa (en el momento del diagnóstico) y tratados con una dieta exenta de gluten al menos 2 años se diluyeron 1/10 en tampón fosfato, se homogeneizaron en un stomacher 3-5 minutos y se congelaron a -20°C para ser utilizadas como estímulo en células mononucleares de sangre periférica. También se tomaron muestras
30 d heces de individuos sanos como controles.

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 µg/ml de estreptomicina 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 extractos de heces de sanos, celíacos activos y no-activos en presencia o ausencia de 30 µl de suspensiones bacterias vivas de 1×10^6 CFU/ml. 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. Determinación de citoquinas y marcadores celulares de activación

Las concentraciones de citoquinas (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. Los marcadores de distintas poblaciones linfocitarias y de activación se detectaron utilizando anticuerpos marcados con FITC anti CD4, CD8 y CD86 (eBioscience, San Diego, CA) y citometría de flujo (Citómetro de flujo EPICS® XL-MCL; Beckman Coulter, Florida). La implicación de la ruta de transducción de señales mediada por el factor nuclear (FN) κ B en la respuesta immune se determinó adicionando un inhibidor de la misma (lactacistina).

Resultados

Las heces de celíacos, que presentan alteraciones en la composición de la microbiota, inducen una producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IFN- γ) superior a las sanos y una producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 inferior a la de sanos en PBMCs. También incrementan la síntesis de la molécula de superficie CD86 esencial para la activación de células T más que las heces de controles. La co-incubación con bifidobacterias regula el perfil de citoquinas pro-inflamatorias inducido por la microbiota fecal de pacientes celíacos, reduciendo la síntesis de TNF- α e IFN- γ y aumentando la de IL-10. La inhibición de la síntesis de citoquinas en presencia de lactacistina sugiere que el FN κ B está implicado en los efectos inmunomoduladores ejercidos por las bifidobacterias.

EJEMPLO 8: CARACTERIZACIÓN DE LAS FRACCIONES DE GLIADINAS GENERADAS DURANTE EL PROCESO DE DIGESTIÓN IN VITRO Y CARACTERIZACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE LAS GLIADINAS POR BIFIDOBACTERIAS Y SUS EFECTOS BIOLÓGICOS

1. Digestión gastrointestinal de gliadinas

Se utilizó un preparado comercial de gliadinas (Sigma, G3375) que contiene cuatro de las isoformas, α - β -, γ -, ψ ω - gliadinas, de éstas proteínas de las que se dispone de su secuencia completa de aminoácidos.

La disolución de distintas alícuotas (150 mg) del extracto comercial de gliadinas se llevó a cabo en una disolución salina isotónica (140 mM NaCl, 5 mM KCl) a pH 3, calentando la mezcla a 55 °C durante 30 minutos en un baño con agitación. Las muestras se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal simulado con pepsina (Sigma, P7000) (800-2500 UI/mg proteína) y pancreatina (P1750) (actividad, 4×USP) porcina, y extracto biliar (B3883).

La digestión gástrica (pepsina en 0.1M HCl/pH 3/1h, agitación) se llevó a cabo en tubos de centrifuga (50 ml). Posteriormente, la etapa intestinal (pancreatina-bilis en 0.1M NaHCO₃/pH 6.9-7/2h, agitación) se llevó a cabo en el compartimento superior (dador) (1.5 ml) de un sistema bicameral preparado con una membrana de diálisis (Spectra/Por 2.1, Spectrum Medical, Gardena, CA) con un tamaño de poro de 15 KDa. En el compartimento basal (aceptor) se dispone de disolución salina (1 ml). Una vez finalizado el proceso de digestión el contenido total proteico se cuantificó en el sobrenadante (4000 rpm/5 min/4 °C) del digerido gastrointestinal y en el dializado utilizando un kit comercial (Sigma, TP0200) basado en el método de Lowry.

2. Análisis cromatográfico de las fracciones de gliadinas tras el proceso de digestión in vitro. Para el análisis de gliadinas se adaptó un método de cromatografía en fase reversa. La separación se llevó a cabo en una columna BioBasic C18 (5 µm 4.6x250 mm) utilizando un equipo Hewlett Packard 1050 HPLC. Las fases móviles utilizadas consisten en (A) Acetonitrilo (ACN, calidad HPLC) acuoso al 15% (v/v) con ácido Trifluoroacético (TFA) 0.1% (v/v), y (B) ACN acuoso al 80% (v/v) con TFA 0.1% (v/v). El gradiente de elución utilizado fue el siguiente; 0 – 5 min., gradiente lineal hasta 5% del solvente B; 5 – 12 min., gradiente lineal hasta 20% del solvente B. La columna se lavo con 100% del solvente B durante 5 minutos, y se reequilibró utilizando las condiciones iniciales durante 3 minutos. Las muestras se filtraron a través de una membrana de nylon (13 mm 0.22 µm Millex GN, Millipore). Se analizaron tres alícuotas (100 µl) independientes de cada tratamiento. La absorción en la región ultravioleta se monitorizó a 210 nm.

3. Identificación de las secuencias peptídicas de las gliadinas mediante cromatografía en fase reversa acoplada a electrospray-MsMs (RP-HPLC-ESI-MS/MS). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna BioBasic C18 (5 µm 4.6x250 mm) utilizando con un equipo Agilent HPLC system acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica

de cuadrupolo (Esquire-LC-Ms(n), Bruker Daltonics, Billerica, MA). El gradiente de elución cromatográfico utilizado fue el descrito en el apartado anterior. En el análisis se utilizó nitrógeno como nebulizador y gas de secado, y helio como gas para la colisión molecular a presión aproximada de 5×10^{-3} bar. El capilar de colisión se mantuvo a 4 kV. Los espectros de masas se monitorizaron en el rango masa/carga (m/z) de 500 - 5000. El método muestra el análisis de masas (Ms) medio de 15 espectros, y el análisis secuencial de masas Ms(n) de 5 espectros. El límite de corriente iónica para llevar a cabo el análisis secuencial de masas se estableció en 5000, y los iones precursores se aislaron en un rango de m/z de 4.0 fragmentándose en una rampa de voltaje de 0.39 a 2.6 V. Los datos espectrales de m/z se procesaron y transformaron utilizando el software de análisis proporcionado por el fabricante (Data Analysis version 3, Bruker Daltonics). La secuencias peptídicas de los espectros Ms(n) se establecieron utilizando un software de análisis (BioTools version 2.1 (Bruker Daltonics)).

4. Efectos de la co-incubación del digerido gastrointestinal de gliadinas en presencia de bifidobacterias.

El digerido gastrointestinal de gliadinas obtenido en el apartado 1 se co-incubó en presencia y ausencia de bifidobacterias intestinales, como la cepa de la invención, situadas en la parte apical (dador) de un cultivo en tranwell de células Caco-2, modelo de epitelio intestinal. A fin de estimar la reducción del efecto tóxico de las gliadinas en presencia de la cepa de la invención (IATA-ES1) se midió la síntesis de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α y el NF κ B por métodos ELISA en el cultivo de células Caco-2 de la cámara basal (aceptor) en presencia y ausencia de la bifidobacteria (Figuras 3 y 4).

Resultados.

Análisis RP-HPLC de la fracción proteica inferior a 15 KDa derivada de la diálisis del digerido gastrointestinal de gliadinas. La separación cromatográfica (Figura 2) revela la presencia de cinco fracciones

peptídicas siendo la mayoritaria la fracción #2. Estudios de dializabilidad de los péptidos derivados de gliadinas en presencia de distintas cepas bacterianas (i.e., cepa de la invención (IATA-ES1) y *Bifidobacterium* A2), aisladas en nuestro laboratorio evidencian la capacidad proteolítica de estas bacterias sobre las gliadinas y específicamente sobre la fracción #2. La cepa que causó la reducción más importante de la fracción #2 fue la cepa de la invención (IATA-ES1) alcanzando más de un 10% en las condiciones del estudio.

10 **EJEMPLO 9. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE CEPAS DEL GÉNERO *BIFIDOBACTERIUM* PARA REGULAR LA MADURACIÓN Y FENOTIPO PROINFLAMATORIO INDUCIDO POR GLIADINAS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS IMPLICADAS EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.**

15 1. Preparación de los cultivos de bifidobacterias intestinales y muestras fecales para su evaluación.

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 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 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. Antes del uso de las células como estímulo se lavaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS.

30 2 Aislamiento y estimulación de células dendríticas (CD) obtenidas a partir de de sangre periférica.

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 estreptomina 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 utilizó gliadina (0.1mg/ml) e IFN- γ (150 UI) en presencia y ausencia de bifidobacterias y otras bacterias intestinales. Como control positivo se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1 μ 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 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 y marcadores celulares de activación

Las concentraciones de citoquinas (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. Los marcadores de moléculas de activación se detectaron utilizando anticuerpos marcados con FITC frente a HLA-DR, CD86, CD40 y CD83 (eBioscience, San Diego, CA) y se cuantificaron por citometría de flujo (Citómetro de flujo EPICS® XL-MCL; Beckman Coulter, Florida).

Resultados

La cepa de la invención (IATA-ES1) redujo la producción de IFN- γ , la principal citoquina inflamatoria que se produce en respuesta a las gliadinas en los individuos celíacos, provocada por la estimulación de células

dendríticas por gliadinas y otras bacterias intestinales potencialmente pro-inflamatorias (e.g. bacteroides y enterobacterias aisladas de individuos celíacos) al menos un 10%. Esta cepa también provocó un aumento en la síntesis de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 por células dendríticas en al

5 menos un 200% en comparación con el efecto producido por la estimulación con gliadinas. La cepa de la invención (IATA-ES1) redujo la expresión de las moléculas HLA-DR y CD86, inducida tras la incubación de las células dendríticas en presencia conjuntamente de gliadina e IFN- γ , entre un 15 y un 20%.

REIVINDICACIONES

1. Método de la selección de microorganismos para su uso en el
5 tratamiento o la prevención de alergias alimentarias que comprende:
 - a. aislar microorganismos de muestras provenientes de individuos sanos.
 - b. seleccionar aquellos microorganismos del paso a) capaces de regular la respuesta inmune e hidrolizar, inactivar o interferir con el
10 mecanismo de acción de al menos un agente causante de alergias alimentarias.
2. Método según la reivindicación anterior, donde los individuos sanos son lactantes.
3. Método según la reivindicación anterior donde la alergia alimentaria
15 es la enfermedad celíaca.
4. Microorganismo para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca.
5. Microorganismo para su uso en el tratamiento o la prevención de la celiacuía, según la reivindicación anterior, donde dicho
20 microorganismo es capaz de la regular la inmune e hidrolizar, inactivar o interferir en el mecanismo de acción nocivo de al menos un péptido del gluten causante de la enfermedad celíaca.
6. Microorganismo para uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5,
25 seleccionado del género *Bifidobacterium*.
7. Microorganismo para uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca, según la reivindicación anterior, seleccionado de la especie *Bifidobacterium longum*.
8. Composición farmacéutica o composición alimenticia para su uso en
30 el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca que

comprende un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

9. Cepa bacteriana depositada en la CECT con número de acceso 7347.
10. Cepa bacteriana según la reivindicación anterior para su uso como medicamento, alimento, nutracéutico, suplemento, probiótico o simbiótico, o nuevo alimento.
11. Cepa bacteriana según la reivindicación anterior para su uso como medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca.
12. Composición que comprende una cepa bacteriana o sus compuestos bioactivos derivados según la reivindicación 9.
13. Composición farmacéutica o alimenticia que comprende una cepa bacteriana o sus compuestos bioactivos derivados según la reivindicación 9.
14. Alimento que comprende una cepa bacteriana o sus compuestos bioactivos derivados según la reivindicación 9.
15. Nutracéutico que comprende una cepa bacteriana o sus compuestos bioactivos derivados según la reivindicación 9.
16. Suplemento alimenticio que comprende una cepa bacteriana o sus compuestos bioactivos derivados según la reivindicación 9.
17. Probiótico o simbiótico que comprende una cepa bacteriana o sus compuestos bioactivos derivados según la reivindicación 9.
18. Nuevo alimento que comprende una cepa bacteriana o sus compuestos bioactivos derivados según la reivindicación 9.
19. Compuesto bioactivo derivado de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o de una cepa según la reivindicación 9.
20. Sobrenadante obtenido a partir del cultivo de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o de una cepa según la reivindicación 9.

21. Extracto obtenido a partir del cultivo de un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 o de una cepa según la reivindicación 9.

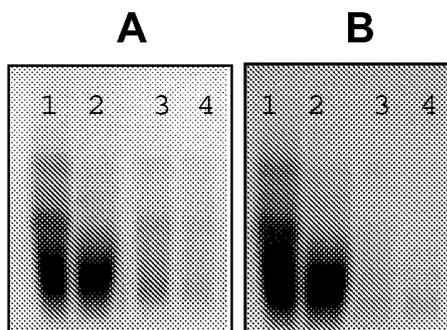


FIG 1

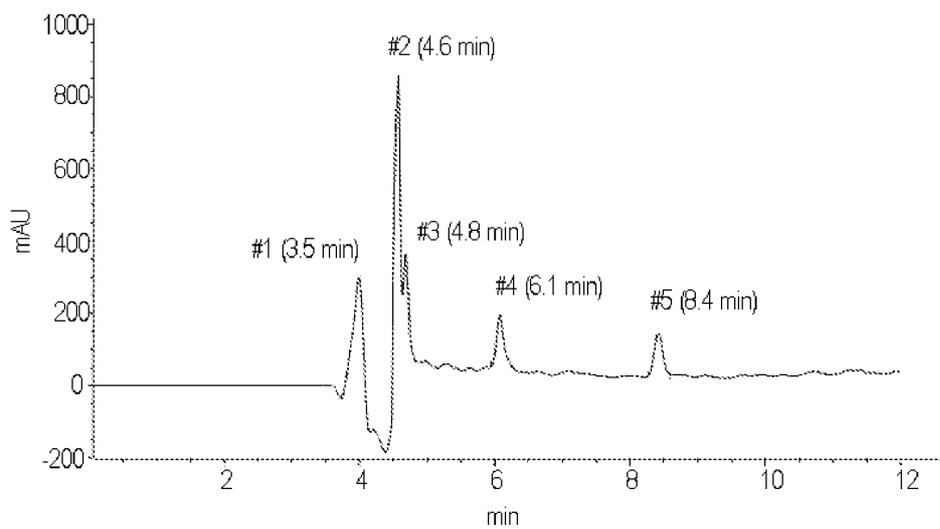


FIG 2

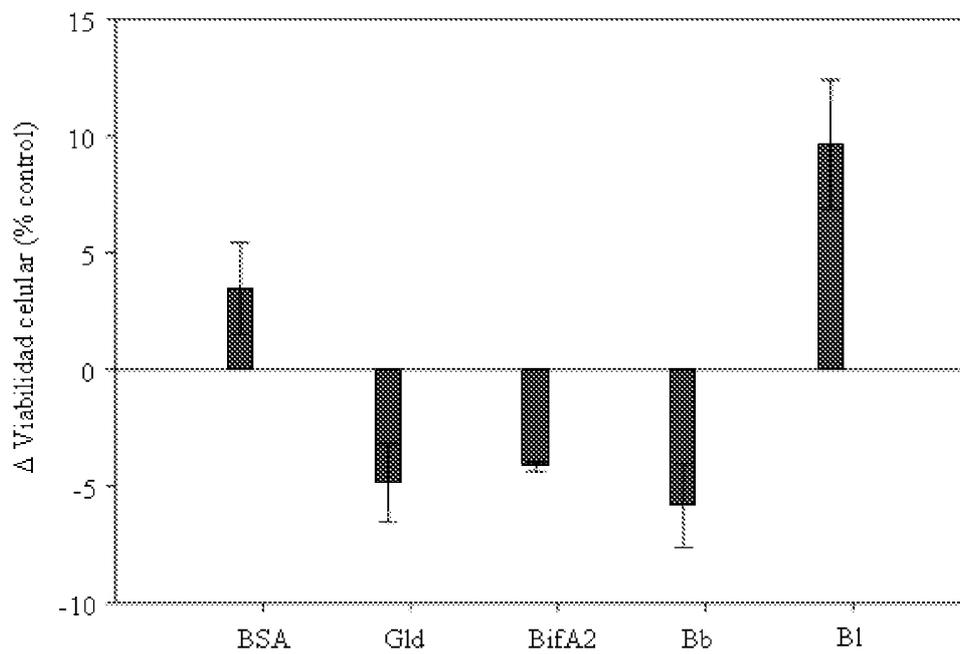


FIG 3.

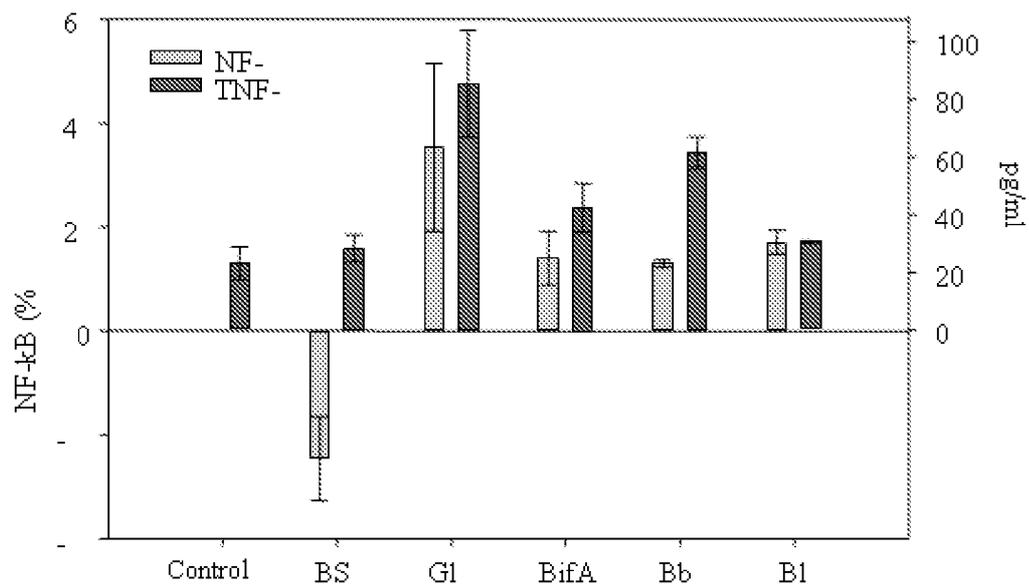


FIG 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2008/070243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01)

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)

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/010297 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED) 06.02.2003. Claims and page 6 of the description.	4-8, 19-21
X	WO 2004/076615 A2 (BIONEER A/S. PROBI AB) 10.09.2004. Claims.	4, 6-8, 20, 21
X	WO 2005/032567 A2 (DANISCO A/S) 14.04.2005. Claims.	4, 6-8, 20, 21
X	WO 2007/108763 A1 (PROBAC AB) 27.09.2007 Claims.	4, 8

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

13 April 2009 (13.04.2009)

Date of mailing of the international search report

(16/04/2009)

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

I.Rueda Molins

Telephone No. +34 91 349.32.79

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-3, relating to a method for selecting a micro organism for use in the treatment or prevention of food allergies.

Invention 2: claims 4-8 and 19-21 (in part), relating to the use of a micro-organism for the treatment or prevention of celiac disease.

Invention 3: claims 9-18 and 19-21 (in part), relating to the bacterial strain filed with CECT (Spanish Standard Culture Collection) under access number 7347.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2008/070243

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03010297 A	06.02.2003	CA 2454803 A	06.02.2003
		IE 20020626 A	19.03.2003
		US 2003092163 A	15.05.2003
		EP 1409644 A	21.04.2004
		MXPA 04000738 A	08.07.2004
		ZA 200400555 A	21.09.2004
		BR 0211442 A	09.11.2004
		CN 1561387 A	05.01.2005
		JP 2005508617 T	07.04.2005
		RU 2004101955 A	10.05.2005
		US 2006121015 A	08.06.2006
-----	-----	-----	-----
WO 2004076615 A	10.09.2004	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
WO 2005032567 A	14.04.2005	CA 2537769 A	14.04.2005
		AU 2004277755 A	14.04.2005
		EP 20040787556	24.09.2004
		CN 1863540 A	15.11.2006
		JP 2007507485 T	29.03.2007
		US 2008038228 A	14.02.2008
-----	-----	-----	-----
WO 2007108763 A, B	27.09.2007	NONE	-----
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2008/070243

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/20 (2006.01)

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)

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

C12N

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, TXT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO 03/010297 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED) 06.02.2003. Reivindicaciones y página 6 de la descripción.	4-8, 19-21
X	WO 2004/076615 A2 (BIONEER A/S. PROBI AB) 10.09.2004. Reivindicaciones.	4, 6-8, 20, 21
X	WO 2005/032567 A2 (DANISCO A/S) 14.04.2005. Reivindicaciones.	4, 6-8, 20, 21
X	WO 2007/108763 A1 (PROBAC AB) 27.09.2007 Reivindicaciones.	4, 8

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.

13 Abril 2009 (13.04.2009)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

16 de Abril de 2009 (16/04/2009)

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

I.Rueda Molins

N° de teléfono +34 91 349.32.79

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2008/070243

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N^{os}. se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones N^{os}. se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones N^{os}. son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Invención 1: Reivindicaciones 1-3. Relativas a un método de selección de un microorganismo para su uso en el tratamiento o la prevención de alergias alimentarias. Invención 2: Reivindicaciones 4-8, 19 – 21 (parcialmente). Relativas al uso de un microorganismo para el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca. Invención 3: Reivindicaciones 9-18, 19 – 21 (parcialmente). Relativas a la cepa bacteriana depositada en la CECT con número de acceso 7347.

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N^{os}.
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N^{os}.

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2008/070243

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 03010297 A	06.02.2003	CA 2454803 A IE 20020626 A US 2003092163 A EP 1409644 A MXPA 04000738 A ZA 200400555 A BR 0211442 A CN 1561387 A JP 2005508617 T RU 2004101955 A US 2006121015 A	06.02.2003 19.03.2003 15.05.2003 21.04.2004 08.07.2004 21.09.2004 09.11.2004 05.01.2005 07.04.2005 10.05.2005 08.06.2006
WO 2004076615 A	10.09.2004	NINGUNO	-----
WO 2005032567 A	14.04.2005	CA 2537769 A AU 2004277755 A EP 20040787556 CN 1863540 A JP 2007507485 T US 2008038228 A	14.04.2005 14.04.2005 24.09.2004 15.11.2006 29.03.2007 14.02.2008 14.02.2008
WO 2007108763 A, B	27.09.2007	NINGUNO	-----