



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 311 729**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12Q 1/24 (2006.01)

A23L 1/03 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A23C 9/12 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03761516 .8**

96 Fecha de presentación : **26.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1565547**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.08.2005**

54

Título: **Cepas probióticas, un procedimiento para la selección de ellas, composiciones de las mismas y su uso.**

30

Prioridad: **28.06.2002 WO PCT/EP02/07169**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

73

Titular/es: **PULEVA BIOTECH, S.A.**
Camino de Purchil, 66
18004 Granada, ES

72

Inventor/es: **Xaus Pey, Jordi;**
Martín Jiménez, Rocio;
Rodríguez Gómez, Juan Miguel;
Boza Puerta, Julio y
Jiménez López, Jesús

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 311 729 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepas probióticas, un procedimiento para la selección de ellas, composiciones de las mismas y su uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento novedoso para la selección de nuevas cepas probióticas, a nuevos microorganismos probióticos del género *Lactobacillus* seleccionados según este método y a composiciones que comprenden estos microorganismos; a su uso para la profilaxis o el tratamiento frente a enfermedades digestivas, infecciosas, neurodegenerativas y relacionadas con el sistema inmunitario tales como alergias o enfermedades inflamatorias, y a una fuente novedosa para obtener dichos microorganismos.

Antecedentes de la invención

15 Durante muchos años, se han utilizado las bacterias del ácido láctico como agentes de fermentación para la conservación de alimentos beneficiándose de un pH bajo y de la acción de productos de fermentación generados durante la actividad fermentativa de las mismas para inhibir el crecimiento de bacterias degradantes. Con este objetivo, se han usado bacterias del ácido láctico mal caracterizadas o “fermento” para preparar una variedad de diferentes productos alimenticios tales como productos cárnicos fermentados secos, queso y otros productos lácteos fermentados a partir de leche.

Recientemente, las bacterias del ácido láctico han atraído una gran atención debido a que se ha encontrado que algunas cepas muestran propiedades valiosas para el hombre y los animales tras su ingestión. En particular, se ha encontrado que cepas específicas del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* pueden colonizar la mucosa intestinal y ayudar en el mantenimiento del bienestar del hombre y el animal, y se han denominado como probióticas.

Las cepas probióticas se considera que son preparaciones microbianas viables que estimulan la salud del individuo conservando una microflora más sana en el intestino. Una preparación microbiana puede aceptarse comúnmente como probiótica en el caso de que se conozca el efecto de la misma y su modo de acción. Se considera que las cepas probióticas se unen a la mucosa del intestino, colonizan el tracto intestinal y asimismo impiden la unión de microorganismos nocivos sobre el mismo. Un requisito previo crucial para su acción reside en que deben alcanzar la mucosa del intestino en una forma apropiada y viable y no destruirse en la parte superior del tracto gastrointestinal, especialmente por la influencia del pH bajo que prevalece en el estómago.

25 Durante los estudios extensos que conducen a nuevas cepas probióticas, solicitudes de patente previas han descrito el aislamiento de una variedad de diferentes cepas bacterianas a partir de heces de bebé (documentos JP04320642, JP05227946). Además, las cepas probióticas obtenidas hasta la fecha se seleccionaron principalmente por su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal, habitualmente mediante experimentos *in vitro*. No siempre se ha realizado selección posterior, y si se ha hecho, solía basarse principalmente en propiedades individuales de la cepa. Finalmente, y algunas veces tras la comercialización de la cepa, se han comprobado *in vivo* los efectos beneficiosos de la cepa seleccionada.

En este aspecto, varias solicitudes de patente tales como, por ejemplo, EP0768375, WO97/00078, EP0577903 y WO00/53200 dan a conocer cepas específicas de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y sus efectos beneficiosos sobre la diarrea, inmunomodulación, reacciones de hipersensibilidad o infección por microorganismos patógenos.

Además, también se han notificado de manera extensa los efectos beneficiosos de la leche materna humana sobre el bienestar de los lactantes en comparación con los alimentados con preparado a base de leche. En este aspecto, se ha descrito una reducción en el riesgo de infección, alergia, asma y afecciones relacionadas, y una mejora de la maduración intestinal y las funciones del intestino. Además, se ha notificado que la composición de la flora intestinal es diferente en lactantes alimentados con leche humana respecto a los alimentados con preparado a base de leche. Los efectos beneficiosos y la modulación de la flora intestinal de la leche materna humana se han atribuido a su composición característica en comparación con preparados para lactantes. Por tanto, se han notificado los beneficios de proteínas de la leche materna tales como lactoferrina o inmunoglobulinas maternas y la rica composición en oligosacáridos que pueden actuar como compuestos prebióticos, en la regulación de la flora y las funciones del intestino.

Sin embargo, a nuestro entender, no hay ninguna publicación o trabajo que describa la presencia de cepas microbianas en leche materna humana normal. Tampoco se ha notificado que tales cepas microbianas pudiesen ser beneficiosas para el bebé amamantado, y por tanto actuar como cepas probióticas que modulan la flora intestinal del lactante amamantado. Este trabajo sugiere que los efectos de bienestar de los seres humanos amamantados también podrían mediarse mediante cepas microbianas presentes en la misma.

Se ha sugerido en varios trabajos que la colonización inicial del recién nacido se debe a la contaminación cruzada con microflora de la vagina durante el parto. Sin embargo, hay varios estudios que muestran una colonización microbiana inicial similar del recién nacido independientemente de la vía de alumbramiento del recién nacido (cesárea frente a parto natural). Además, el hecho de que no sea posible obtener animales libres de gérmenes a partir de ratones preñados convencionales a pesar de que se hayan obtenido por cesárea, y que estos animales también podrían obtenerse tras el alumbramiento del embrión en ratones receptores estériles (Okamoto, M. y Matsumoto, T. 1999. Exp. Anim.

48: 59-62), sugiere que debe haber otros mecanismos diferentes de la contaminación vaginal que también influyen en la colonización inicial del recién nacido y que este mecanismo debe comenzar antes del parto.

5 En este aspecto, a nuestro entender, no hay ninguna publicación o trabajo que describa la presencia de cepas bacterianas del ácido láctico en el líquido amniótico humano normal. Tampoco se ha notificado que tales cepas microbianas no patógenas pudiesen ser beneficiosas para el bebé en gestación, y por tanto condicionar, justo durante la gestación, las poblaciones microbianas iniciales que pueden colonizar el intestino fetal.

10 Al entender las propiedades valiosas que pueden proporcionar cepas particulares de bacterias del ácido láctico, hay un deseo en la técnica de obtener cepas bacterianas del ácido láctico adicionales que sean beneficiosas para el bienestar del hombre y/o los animales. En consecuencia, un problema de la técnica anterior era proporcionar métodos racionales para la selección de nuevas cepas bacterianas adicionales y fuentes novedosas para la selección de las mismas, que permitan la obtención de cepas bacterianas que muestren individualmente un alto número de propiedades beneficiosas para el hombre y/o los animales. El problema anterior se ha solucionado proporcionando microorganismos novedosos, concretamente bacterias del ácido láctico, que pertenecen al género *Lactobacillus*. Estas nuevas cepas se han obtenido a partir de diferentes fuentes aparte de heces, tales como queso de cabra y a partir de leche materna humana y líquido amniótico, y se han elegido mediante un método que consiste en la capacidad de estas cepas de sobrevivir en la leche materna y/o el líquido amniótico, y por su capacidad para transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico tras la ingesta oral.

20 Este método de selección garantiza que las cepas bacterianas obtenidas tienen implícitamente la mayoría de las características atribuidas a una posible cepa probiótica, concretamente buena resistencia al proceso de digestión y la capacidad de colonización del intestino, pero también un origen humano más natural, aspectos de seguridad y la capacidad de colonizar y regular algunos nichos humanos diferentes del intestino. Finalmente, las cepas seleccionadas también se han sometido a prueba no sólo para determinar sus capacidades de adhesión sino para determinar si tienen un alto grado de características beneficiosas.

Breve descripción de las figuras

30 Figura 1

Método de selección: supervivencia de bacterias en la leche materna y el líquido amniótico

35 Esta figura ilustra la tasa de supervivencia de las cepas probióticas seleccionadas de esta invención en la leche materna y el líquido amniótico. Según el método de selección, se midió la supervivencia de las posibles cepas probióticas usando leche materna humana (barras grises) y líquido amniótico (barras negras). Se resuspendieron 10^8 ufc de cualquier cepa bacteriana candidata en 1 ml de MRS o leche materna o líquido amniótico y se incubaron durante 1 hora a 37°C en condiciones anaerobias. Se evaluó la supervivencia tras el cultivo cultivando diluciones en serie en placas de agar MRS. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. Se seleccionaron inicialmente las bacterias candidatas que sobreviven más del 75% en al menos uno de los líquidos humanos.

Figura 2

Método de selección: transferencia de bacterias a la leche materna

45 Esta figura ilustra la transferencia de bacterias seleccionadas a la leche materna tras la ingesta oral. A) Marcaje de las cepas. Se marcaron genéticamente las cepas que sobreviven en la leche materna y/o el líquido amniótico usando una construcción detectable por PCR. Se marcaron diferentes cepas con fragmentos de ADN de diferentes tamaños (159 pb: F159; 189 pb: F189; y 228 pb: F228). La señal de PCR es detectable sólo en las cepas genéticamente marcadas. La figura muestra como ejemplo el marcaje de las cepas bacterianas CECT5711, CECT5713 y CECT5714. B) Transferencia de bacterias seleccionadas a la leche materna. Se evaluó la capacidad de las cepas marcadas para transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico usando ratones preñados como modelo animal. Se inocularon ratones preñados cada dos días con 10^8 ufc/ratón (en esta figura se muestran los resultados de *L. salivarius* CECT5713) durante dos semanas antes del parto. Se detectó indirectamente la presencia de bacterias en la leche comparando el número de bacterias detectables por PCR en el intestino de recién nacidos antes y justo después de la primera lactación. El carril 1 en cada panel corresponde al marcador de peso molecular.

Figura 3

60 *Perfil de RAPD de las bacterias seleccionadas*

Esta figura ilustra los perfiles de RAPD de las 5 cepas probióticas seleccionadas de esta invención usando dos cebadores diferentes (Argdei y OPL5). Los carriles 1, 8 y 15 corresponden al marcador de peso molecular, los carriles 7 y 14 son los controles negativos.

65

Figura 4

Comparación del perfil de RAPD de las bacterias seleccionadas con otras bacterias de la misma especie

5 Esta figura ilustra las diferencias en los perfiles de RAPD observadas entre las cepas probióticas seleccionadas de esta invención y los obtenidos con otras cepas bacterianas de la misma especie. Cada especie está representada en uno de los paneles: *L. coryniformis* (A), *L. salivarius* (B), *L. gasseri* (C) y *L. fermentum* (D). Las cepas usadas se describen en la tabla III.

10 Figura 5

Adhesión de cepas probióticas a células intestinales

15 Esta figura ilustra la adhesión de cepas probióticas a células intestinales. Se evaluó la adhesión de cepas probióticas de esta invención usando las líneas celulares intestinales Caco-2 (barras grises) o HT-29 (barras negras) y se compararon con cepas probióticas comerciales. Se contaron veinte campos aleatorios y se expresaron los resultados como la media del número de bacterias unidas a las células por campo \pm DE. La capacidad de adhesión de una cepa probiótica a cada línea celular intestinal se consideró alta si el número de bacterias unidas era >250 , moderada entre 100 y 250 y ligera >100 .

20

Figura 6

Supervivencia de cepas probióticas a la condición de digestión

25 Esta figura ilustra la supervivencia de cepas probióticas a las condiciones de digestión. Se evaluó la resistencia de las cepas probióticas de esta invención a un contenido ácido (barras grises) y en sal biliar alto (barras negras) *in vitro* mediante el cultivo de las bacterias en MRS pH 3,0 ó 0,15% de sales biliares durante 90 minutos. Los resultados se representan como la media \pm DE de tres experimentos independientes. La resistencia de una cepa probiótica se consideró alta si la supervivencia era $>80\%$, moderada entre el 60% y el 80% y ligera $>60\%$.

30

Figura 7

Tiempo de generación de cepas probióticas

35 Esta figura ilustra el tiempo de generación de cepas probióticas. Se evaluó el tiempo de generación de las cepas probióticas de esta invención *in vitro* cultivando bacterias en MRS 0,2% de glucosa durante 120 minutos. Los resultados se representan en minutos y como la media \pm DE de tres experimentos independientes. El tiempo de generación de una cepa probiótica se consideró rápido si el tiempo era <60 , moderado entre 60 y 120 y lento >120 minutos.

40 Figura 8

Capacidades de fermentación de cepas probióticas

45 Esta figura ilustra la capacidad de cepas probióticas de fermentar hidratos de carbono complejos. Se evaluaron *in vitro* las capacidades de fermentación de las cepas probióticas de esta invención para usar hidratos de carbono complejos como una única fuente de hidratos de carbono cultivando bacterias en MRS sin glucosa y complementado con el 2% de hidratos de carbono indicados durante 24 y 48 h. Se evaluó la reducción del pH usando púrpura de bromocresol. Los resultados se representan como la inducción en veces en la absorbancia tras 24 horas en comparación con un cultivo control sin fuente de hidrato de carbono (A) y la suma de todos los valores de inducción en veces independientes (B). La capacidad de fermentación de una cepa probiótica se consideró alta si el valor total era >30 , moderada entre 25 y 30 y ligera >25 .

50

Figura 9

55 *Resistencia a antibiótico de cepas probióticas*

Esta figura ilustra la resistencia a antibiótico de cepas probióticas. Se evaluó *in vitro* la resistencia al tratamiento con antibiótico de las cepas probióticas de esta invención mediante un ensayo de difusión en pocillo con agar en placas Müeller-Hinton durante 24-48 horas. El diámetro del halo de inhibición determina el efecto del antibiótico. Los resultados se representan como R (resistente) si el halo tiene un diámetro < 12 mm, I (intermedio) desde 12 hasta 15 mm y S (sensible) si >15 mm. Tras eso, se asignó un valor numérico a cada condición: R=3, I=2 y S=1. La capacidad de resistencia de una cepa probiótica se consideró alta si el valor total era >17 , moderada entre 15 y 17, y ligera <15 .

65

ES 2 311 729 T3

Figura 10

Producción de ácido por las cepas probióticas

5 Esta figura ilustra la producción de ácido por las cepas probióticas. Se evaluó *in vitro* la producción de ácido (ácido láctico, propiónico, acético y butírico) por las cepas probióticas de esta invención mediante la medición del pH en cultivos de leche durante 24 (barras grises) y 48 (barras negras) horas. La producción de ácido por una cepa probiótica se consideró alta si el valor de pH de la leche tras 48 horas era <4, moderada entre 4 y 4,5, y ligera >4,5.

10 Figura 11

Producción de metabolitos bactericidas por las cepas probióticas

15 Esta figura ilustra la producción de metabolitos antimicrobianos por las cepas probióticas. Se evaluó *in vitro* la producción de metabolitos antimicrobianos por las cepas probióticas de esta invención mediante un ensayo de difusión en pocillo con agar en placas TSA cultivadas con *S. typhimurium* (barras negras) o *Escherichia coli* (barras grises). El diámetro del halo de inhibición (en milímetros) inducido por los sobrenadantes bacterianos determina el efecto bactericida. La capacidad antimicrobiana de una cepa probiótica se consideró alta si el halo era >12, moderada entre 8 y 12, y ligera <8 para ambas cepas patógenas.

20

Figura 12

Inhibición de la adhesión de bacterias patógenas

25 Esta figura ilustra la inhibición de la adhesión de bacterias patógenas. Se evaluó la adhesión de las cepas patógenas *E. coli* (barras grises) y *S. typhimurium* (barras negras) a células Caco-2 en presencia de las cepas probióticas de esta invención y se compararon con cepas probióticas comerciales. Se contaron diez campos aleatorios y se expresaron los resultados como la media del % de bacterias gram negativas adheridas a las células en comparación con el número de bacterias patógenas adheridas en ausencia de cepas probióticas. La capacidad de una cepa probiótica de inhibir la adherencia de bacterias patógenas se consideró alta si el % de ambas bacterias patógenas unidas era <25, moderada entre 25 y 75, y ligera > 75.

30

Figura 13

Colonización del intestino por L. Salivarius CECT5713

35 Esta figura ilustra la colonización del intestino por *L. salivarius* CECT5713. Se analizó el número de lactobacilos, bifidobacterias y bacterias coliformes fecales en ratones complementados diariamente durante 14 días con 10^8 ufc de *L. salivarius* CECT5713 mediante siembra en placa bacteriana. Se recogieron muestras fecales (200 mg aprox.) en el día 0, 7 y 14 de complementación probiótica y también una y dos semanas (día 21 y 28) tras terminar la complementación. (* p< 0,05; ** p<0,01).

40

Figura 14

Efecto de L. Fermentum CECT5716 sobre la infección por Salmonella

45 Esta figura ilustra el efecto de *L. fermentum* CECT5716 sobre la infección por *Salmonella*. A) *L. fermentum* CECT5716 inhibe la translocación de *Salmonella* al bazo. Se midió el número de colonias de *Salmonella* en los bazos de ratones tratados con *L. fermentum* CECT5716 con o sin vacunación con 10^8 ufc inactivadas de *Salmonella* tras 24 horas de una exposición oral con 10^{10} ufc de *Salmonella*. B) Se usaron los mismos ratones para medir el contenido en IgA en las heces.

50

Figura 15

Efecto de cepas probióticas sobre la expresión de citocinas

55 Esta figura ilustra el efecto de cepas probióticas sobre la expresión de citocinas. Se analizó la producción de citocina TNF- α (A) o IL-10 (B) en macrófagos derivados de la médula ósea estimulados con LPS y la cepa probiótica indicada durante 12 horas. Se detectó la producción de citocina mediante una técnica de ELISA.

60

Figura 16

Efecto de cepas probióticas sobre la expresión de IgG

65 Esta figura ilustra el efecto de cepas probióticas sobre la expresión de IgG. Se analizó la producción de IgG en linfocitos obtenidos a partir del bazo de ratones Balb/c (6-8 semanas de edad) estimulados con LPS y la cepa probiótica indicada durante 6 días. Se detectó la producción de inmunoglobulina mediante una técnica de ELISA de Bethyl.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona, por tanto, un método para la selección de cepas microbianas probióticas que comprende las siguientes etapas:

- a. seleccionar cepas no patógenas que pueden sobrevivir en la leche materna y/o el líquido amniótico, y
- b. seleccionar cepas patógenas que pueden transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico tras la ingesta oral en individuos sanos sin colonizar otros órganos internos excepto mucosas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona nuevas cepas de *Lactobacillus*, que son:

- CECT5711 (*Lactobacillus coryniformis*),
- CECT5713 (*Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*),
- CECT5714: (*Lactobacillus gasseri*, anteriormente *L. acidophilus*),
- CETC5715: (*Lactobacillus gasseri*), y
- CECT5716: (*Lactobacillus fermentum*).

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de leche de mamífero y líquido amniótico de mamífero como fuente para obtener bacterias probióticas no patógenas.

Otro aspecto de la invención se refiere a composiciones y productos que contienen al menos una de las cepas mencionadas anteriormente.

Finalmente, un último aspecto de la invención se refiere al uso de las cepas mencionadas anteriormente o de cualquier cultivo, composición o producto que las contienen en la fabricación de un producto para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades en seres humanos y animales.

Descripción detallada de la invención

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención proporciona un método de selección de nuevas cepas bacterianas que consiste en la capacidad de estas cepas de sobrevivir en la leche materna y/o el líquido amniótico, y su capacidad para transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico tras la ingesta oral, que garantiza las características especiales de las cepas seleccionadas obtenidas con él. Por tanto, el principal aspecto de la presente invención se define como un método para la selección de cepas probióticas microbianas, que comprende las siguientes etapas:

- a. seleccionar cepas no patógenas que pueden sobrevivir en la leche materna y/o el líquido amniótico, y
- b. seleccionar cepas no patógenas que pueden transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico tras la ingesta oral en individuos sanos sin colonizar otros órganos internos excepto mucosas.

Según una realización preferida de la invención, tanto la leche materna como el líquido amniótico son de fuentes humanas. Las cepas probióticas sometidas a prueba en el método de la invención pueden ser cualquier bacteria probiótica seleccionada de, pero que no se limita a, los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*. Estas cepas probióticas se obtienen preferiblemente de la leche materna, heces de bebés amamantados o líquido amniótico, lo más preferiblemente de muestras humanas. Se facilitan a continuación detalles adicionales del método de la invención en "Método y ejemplos".

La presente invención proporciona cepas bacterianas seleccionadas mediante el método de la invención. Algunas de estas nuevas cepas bacterianas que muestran varias características que las hacen beneficiosas para la salud humana, y en particular en la profilaxis o el tratamiento frente a enfermedades digestivas, infecciosas, neurodegenerativas y otras relacionadas con el sistema inmunitario tales como alergias o enfermedades inflamatorias, se han depositado según el Tratado de Budapest en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), Valencia (España) el 11 de junio de 2002. Estas cepas bacterianas y sus características son:

- CECT5711: (*Lactobacillus coryniformis*), obteniéndose dicha bacteria de queso de cabra, seleccionándose mediante el procedimiento propuesto y caracterizándose mediante el perfil de RAPD mostrado en la figura 3 y las características descritas en la tabla I, II y VII.
- CECT5713: (*Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*), obteniéndose dicha bacteria de heces de bebés humanos amamantados, seleccionándose mediante el procedimiento propuesto y caracterizándose mediante el perfil de RAPD mostrado en la figura 3 y las características descritas en la tabla I, II y VII.

ES 2 311 729 T3

- CECT5714: (*Lactobacillus gasseri*, anteriormente *L. acidophilus*), obteniéndose dicha bacteria de leche materna humana, detectándose también en líquido amniótico humano, seleccionándose mediante el procedimiento propuesto y caracterizándose mediante el perfil de RAPD mostrado en la figura 3 y las características descritas en la tabla I, II y VII.
- CECT5715: (*Lactobacillus gasseri*), obteniéndose dicha bacteria de leche materna humana, detectándose también en líquido amniótico humano, seleccionándose mediante el procedimiento propuesto y caracterizándose mediante el perfil de RAPD mostrado en la figura 3 y las características descritas en la tabla I, II y VII.
- CECT5716: (*Lactobacillus fermentum*), obteniéndose dicha bacteria de leche materna humana, seleccionándose mediante el procedimiento propuesto y caracterizándose mediante el perfil de RAPD mostrado en la figura 3 y las características descritas en la tabla I, II y VII.

Además, también se ha confirmado que aplicando el método de la invención, es posible seleccionar nuevas cepas específicas como las mencionadas anteriormente. En este sentido, se han comparado los aspectos genéticos (perfiles de RAPD) y bioquímicos tales como las capacidades de fermentación (perfiles de API), el potencial enzimático (perfiles de APIZYM) y la resistencia a antibiótico de las cepas seleccionadas con otras cepas de las mismas especies depositadas en varias colecciones de cultivo (concretamente CECT, ATCC, LMG, NCFB, etc.). Por consiguiente, se ha establecido que estas nuevas cepas son diferentes de las notificadas anteriormente.

A nuestro entender, esta es la primera vez que un laboratorio experimental ha observado que es posible obtener microorganismos bacterianos no patógenos presentes en leche materna o líquido amniótico de mamífero normal, que existe una transferencia de cepas bacterianas no patógenas hasta la leche materna y el líquido amniótico tras la ingesta oral y que estos organismos microbianos son cepas no patógenas que podrían actuar como cepas bacterianas probióticas y por tanto, afectar de manera beneficiosa no sólo al sujeto que las ingiere sino también al feto o lactante amamantado. Por esta razón, un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso del líquido amniótico y la leche materna de mamífero como nuevas fuentes de microorganismos bacterianos que tienen la capacidad de usarse como cepas probióticas, a las cepas obtenidas a partir de ellas y al uso de las mismas. La leche materna y el líquido amniótico son preferiblemente humanos.

También es un aspecto de la invención que comprende cualquiera de las cepas bacterianas de la invención junto con al menos otra cepa bacteriana. En este aspecto, esta invención se refiere a cultivos biológicos puros de cada una de las cepas, o mezclas entre ellas o con otras cepas bacterianas. Por tanto, dicho aspecto de esta invención es la producción de diferentes composiciones que comprenden al menos una cepa o una mezcla de las cepas de la invención. Según este aspecto, la invención proporciona una composición que comprende al menos una de las cepas bacterianas de la invención, es decir, una de las cepas mencionadas anteriormente o cualquier cepa bacteriana seleccionada mediante el método de la invención, en la que la composición comprende preferiblemente de 2 a 6 cepas, más preferiblemente desde 2 hasta 4 cepas, lo más preferiblemente desde 2 hasta 3 cepas, y en la que cada una de las cepas está presente en la composición en una proporción de desde el 0,1% hasta el 99,9%, preferiblemente desde el 1% hasta el 99%, más preferiblemente desde el 10% hasta el 90%. En una realización preferida, la composición comprende al menos una de las cepas bacterianas de la invención junto con otra cepa o mezcla de cepas en la que la mezcla comprende preferiblemente desde 2 hasta 6 cepas, más preferiblemente desde 2 hasta 4 cepas, lo más preferiblemente desde 2 hasta 3 cepas y en la que cada una de las cepas está presente en la composición en una proporción de desde el 0,1% hasta el 99,9%, preferiblemente desde el 1% hasta el 99%, más preferiblemente desde 10% hasta el 90%.

Las composiciones de la invención están preferiblemente en forma liofilizada, en forma congelada o incluso muerta.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición obtenible a partir del sobrenadante de un cultivo de una cepa bacteriana de la invención, o a partir de cualquier composición de la invención. En una realización preferida, la composición puede obtenerse mediante extracción de un cultivo de cualquiera de las cepas bacterianas de la invención o de una composición de la invención.

Puede usarse el sobrenadante de un cultivo de una cepa de *Lactobacillus* de la presente invención para preparar un soporte administrable. El sobrenadante puede usarse como tal o puede secarse bien en condiciones que no destruyen los compuestos metabólicos secretados o producidos por los microorganismos en el medio líquido, tal como por ejemplo secado por congelación. La presente invención también se refiere al uso de enzimas obtenidas a partir de estas cepas probióticas y a su uso en la producción de metabolitos o hidrolizados de proteína. La presente invención también se refiere a composiciones de las cepas de esta invención en forma liofilizada, secada por congelación o inactivada (bacterias muertas) mediante métodos convencionales. Por tanto, aún en otro aspecto, la invención proporciona un producto obtenible a partir de la actividad metabólica de cualquiera de las cepas de la invención, de un cultivo de cualquier cepa de la invención o de una composición según la presente invención, en la que el producto es preferiblemente una enzima.

Un aspecto adicional de la invención consiste en un producto alimenticio que comprende material de soporte y al menos una cepa según la invención, un cultivo, una composición o un producto según la presente invención. Preferiblemente, el material de soporte es una composición alimenticia seleccionada de leche, yogurt, cuajada, queso,

ES 2 311 729 T3

leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, productos fermentados a base de carne, productos a base de cereales fermentados, polvos a base de leche, polvos a base de cereal, preparados para lactantes, preparado de nutrición clínica, helados, zumos, harinas, pan, pasteles, azúcar, caramelos o chicles. En una realización preferida, la cepa microbiana según la presente invención está contenida en el material de soporte en una cantidad de desde aproximadamente 10^5 ufc/g hasta aproximadamente 10^{12} ufc/g de material de soporte, preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{11} ufc/g de material de soporte, más preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{10} ufc/g de material de soporte.

Para el fin de la presente invención, la abreviatura ufc debe designar una “unidad formadora de colonia” que se define como el número de células bacterianas tal como se determina mediante recuentos microbiológicos en placas de agar.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una cepa según la invención, un cultivo, una composición o un producto según la invención y excipientes farmacéuticamente aceptables. La cantidad de dosificación requerida en la composición farmacéutica o alimenticia descrita anteriormente variará según la naturaleza del trastorno o el uso propuesto de la composición, ya se use profiláctica o terapéuticamente y el tipo de microorganismo implicado. Para preparar una composición alimenticia según la presente invención, se incorpora al menos una de las cepas de *Lactobacillus* de la presente invención en un soporte adecuado, en una cantidad de desde 10^5 ufc/g hasta aproximadamente 10^{14} ufc/g de material de soporte, preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{13} ufc/g de material de soporte, más preferiblemente desde aproximadamente 10^7 ufc/g hasta aproximadamente 10^{12} ufc/g de material de soporte.

Las preparaciones farmacéuticas pueden prepararse en forma de comprimidos, cápsulas, suspensiones bacterianas líquidas, complementos orales secados, complementos orales húmedos, alimentación nasogástrica seca o alimentación nasogástrica húmeda.

No obstante, la actividad de los nuevos microorganismos en el individuo depende de manera natural de la dosis. Es decir, cuanto mayor es el número de los microorganismos novedosos que se incorporan por medio de ingestión o administración del material alimenticio o la composición farmacéutica anterior, mayor es la actividad protectora y/o terapéutica de los microorganismos. Dado que los microorganismos de esta invención no son perjudiciales para el hombre y los animales y se han aislado finalmente de heces de bebé, alimento o leche materna humana o líquido amniótico, puede incorporarse una alta cantidad de los mismos de modo que esencialmente una alta proporción de la mucosa del individuo se colonizará por los microorganismos novedosos.

Preferiblemente, el sujeto que necesita el tratamiento se selecciona del grupo que consiste en individuos que padecen el trastorno o que tienen riesgo de padecer el trastorno seleccionado, concretamente infección, alergia, inflamación, etc. Sin embargo, se reconocerá que los presentes tratamientos se emplean adecuadamente en la profilaxis de esos trastornos en cualquier sujeto.

Además, debido a la capacidad de las cepas seleccionadas de transferirse a y sobrevivir en la leche materna y/o el líquido amniótico, los sujetos que necesitan el tratamiento podrían ser no sólo los que ingieren directamente las cepas seleccionadas, sino también el feto o los bebés amamantados.

Preferiblemente, la cepa probiótica, o la composición que contiene cepas probióticas, se dirige a la superficie mucosa oral, gástrica o a la intestinal; sin embargo, también podría dirigirse a la mucosa nasofaríngea, respiratoria, genitourinaria o glandular, y podría administrarse a seres humanos y animales mediante una vía oral, rectal, tópica, uretral o vaginal.

Además, las cepas probióticas de la presente invención pueden usarse junto con otros tratamientos, para potenciar o ayudar en su eficacia.

Muchas personas tienen una microflora intestinal alterada, es decir, el equilibrio entre las bacterias intestinales útiles y nocivas está alterado. Varios factores, entre otros el estrés, la presencia de sales biliares y especialmente la dieta, influyen en la flora intestinal. En estas situaciones podrían alterarse los procesos de fermentación y reducirse el número de bacterias útiles, la consecuencia sería que la mucosa del colon se debilita y deja de funcionar al mismo tiempo que las bacterias potencialmente malignas crecen rápidamente en número. Por esta razón, un aspecto de esta invención es el uso de cepas probióticas como tratamiento profiláctico o terapéutico de la infección crónica o aguda, o de la colonización microbiana indeseable, de una superficie mucosa, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una cepa probiótica, o una composición que contiene cepas probióticas, a un sujeto que necesita la misma.

Las composiciones de la presente invención también pueden usarse eficazmente en el tratamiento de infecciones virales agudas y crónicas. En particular, el tratamiento del virus de Epstein-Barr, citomegalovirus y otras infecciones de virus de tipo herpes crónicas, que son ubicuos en la población y están asociados con una disminución de la vigilancia inmunitaria.

Otra realización de la invención es el uso de las bacterias probióticas de esta invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la diarrea, independientemente de si este trastorno se debe a la presencia de una infestación

parásita y/o infección bacteriana o viral, el tratamiento con antibióticos o quimio o radioterapia o complicaciones físicas o de la dieta.

La presente invención también se refiere al uso de las cepas probióticas establecidas para la prevención y el tratamiento de niveles de actividad inmunitaria temporalmente reducidos y normalizar los niveles de actividad inmunitaria que están deprimidos en comparación con lo que puede considerarse normal, tales como los que se producen en el envejecimiento o en individuos sanos que se someten a ejercicio intenso o en general a una gran tensión fisiológica.

Además, a través de la modulación de la respuesta inmunitaria y el equilibrio entre citocinas Th1 y Th2, las cepas probióticas de la invención también podrían usarse para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la alergia y los trastornos relacionados con el desarrollo de tolerancia frente a proteínas ingeridas.

Otra realización de la invención es el uso de las cepas probióticas de esta invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de trastornos inflamatorios crónicos tales como, pero que no se limitan a, psoriasis, sarcoidosis, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria del intestino, debido a la capacidad de algunas de las cepas probióticas de reducir la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos activados.

La presente invención también se refiere al uso de las cepas establecidas en esta invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de algunos tipos de cáncer. Este uso de las cepas se basa en los efectos descritos de algunas bacterias del ácido láctico que contrarrestan el cáncer debido a sus efectos en la inhibición de toxinas carcinogénicas en los intestinos tales como nitrosaminas pero también por el efecto de estas cepas probióticas en la modulación de la defensa inmunitaria natural.

Finalmente, la presente invención también se refiere al uso de estas cepas probióticas para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades neurodegenerativas debido al efecto hipocolesterolemico y de modulación del estrés oxidativo de algunas cepas probióticas. Se han relacionado ambas situaciones como factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas tales como Parkinson o Alzheimer. Además, también se ha descrito que las bacterias comensales pueden desaminar L-triptófano produciendo ácido indol-3-propiónico, que es un potente agente neuroprotector.

También se ha sometido a prueba el potencial de las cepas seleccionadas mediante el método de selección de la presente invención, analizando las propiedades probióticas de las cepas seleccionadas usando criterios convencionales. En este sentido, se han estudiado los siguientes aspectos: a) estabilidad a ácido y bilis, porque las bacterias se ingieren principalmente y deben pasar a través del entorno ácido del estómago así como el intestino delgado que contiene bilis, y deben poder sobrevivir en estas condiciones; b) adherencia a la mucosa intestinal, porque esta propiedad permite a las bacterias colonizar y establecerse en el tracto gastrointestinal; c) capacidades proliferativas altas y fermentativas, para potenciar el establecimiento en la mucosa; d) resistencia a antibióticos, porque podría ser necesario para algunas indicaciones; e) reducción del pH (producción del ácido láctico) y producción de metabolitos antimicrobianos por las cepas de la invención, dado que puede ayudarlas a formar una barrera protectora frente a patógenos dentro del tracto gastrointestinal; f) capacidades inmunomoduladoras.

Los siguientes métodos y ejemplos ilustran la invención.

Métodos y Ejemplos

Ejemplo 1

Nuevo método de selección de cepas probióticas

Se ha desarrollado un método novedoso de selección de nuevas cepas bacterianas que consiste en la capacidad de estas cepas de sobrevivir en la leche materna y/o el líquido amniótico, y por su capacidad de transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico tras la ingesta oral. El fundamento de este método novedoso descrito en la presente invención es que garantiza las características especiales de las cepas seleccionadas obtenidas con él, dado que las cepas bacterianas obtenidas tienen implícitamente la mayoría de las características atribuidas a una posible cepa probiótica, concretamente buena resistencia al proceso de digestión y la capacidad de colonización del intestino, pero también un origen humano más natural, aspecto de seguridad y la capacidad de colonizar y regular algunos nichos humanos diferentes del intestino. Además, estas nuevas cepas se han obtenidos de diferentes fuentes aparte de heces, tales como queso de cabra y de leche materna humana y líquido amniótico.

Ejemplo 1a

Resistencia a líquidos humanos

Se comprobaron colonias aisladas de diferentes fuentes para determinar su capacidad de sobrevivir en la leche materna humana y también en el líquido amniótico humano. Para analizar la tasa de supervivencia de las cepas probióticas de esta invención, se cultivaron 10^8 ufc de cada bacteria en 1 ml de leche materna humana o líquido amniótico humano durante 60 minutos en condiciones anaerobias a 37°C. Se calculó la supervivencia mediante siembra en placas de agar

ES 2 311 729 T3

MRS de diluciones en serie y se comparó con el número de colonias obtenidas en condiciones control (caldo MRS pH 6,2). Se cultivaron las placas durante 16-18 horas a 37°C en condiciones anaerobias. El experimento se repitió tres veces. Las cepas se consideraron resistentes cuando la supervivencia al menos en uno de los líquidos humanos era superior al 75% en comparación con las condiciones control (figura 1).

5

Ejemplo 1b

Transferencia a líquidos humanos

10

El segundo criterio en el procedimiento de selección de la presente invención es que las bacterias deben poder transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico tras la ingesta oral. Con el fin de someter a prueba esa capacidad, se marcaron genéticamente las cepas supuestas, tal como se describe a continuación, y se administraron por vía oral a ratones preñados como modelo animal. Se analizó la transferencia de bacterias mediante selección por PCR de las colonias obtenidas a partir del líquido amniótico y del intestino de ratones amamantados.

15

- Marcaje de bacterias

Se emplearon tres parejas de cebadores para obtener tres fragmentos de PCR diferentes (F159: 159 pb, F189: 189 pb y F228: 228 pb, respectivamente). Los tres fragmentos incluían la unión entre el promotor de ARNr 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el gen de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Agrobacterium tumefaciens*. Los cebadores se diseñaron a partir de la secuencia artificial presente en la soja Roundup Ready (número de registro de EMBL: AX033493). Se añadieron sitios BamHI a las colas en 5' de todos los cebadores para facilitar la clonación de los fragmentos de PCR. Una vez obtenidos, se purificaron los productos de PCR usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen), se digirieron con BamHI y se ligaron en pTG262, un plásmido que confiere resistencia a cloranfenicol (Cm). Posteriormente, estos plásmidos se introdujeron individualmente en las cepas seleccionadas mediante electroporación siguiendo protocolos convencionales. Se confirmó la identidad de los transformantes mediante PCR (figura 2A).

20

25

30

- Transferencia de bacterias

Se inocularon por vía oral cuatro ratones Balb/c preñados con 10⁸ ufc de cepas marcadas genéticamente vehiculadas en 200 µl de leche cada dos días a partir de dos semanas antes del parto. Justo antes del parto, se recogió de manera aséptica líquido amniótico de dos de los ratones y se cultivó en placas de agar MRS. Los otros dos ratones preñados finalizaron la gestación. Se analizó la transferencia de las bacterias marcadas genéticamente a la leche materna mediante la comparación de las bacterias aisladas a partir del intestino del recién nacido justo antes y tras la primera lactación. Tocas las placas se incubaron durante 24 h a 37°C en condiciones anaerobias. Para cada muestra obtenida, se seleccionaron aleatoriamente 52 colonias entre las que crecían en las placas de MRS y se subcultivaron en placas de Cm-MRS. Finalmente, para detectar las colonias marcadas genéticamente entre las colonias resistentes a Cm, se realizaron análisis de PCR usando ADN de las colonias resistentes a Cm como molde (figura 2B). Se consideró la transferencia positiva cuando podían detectarse al menos dos colonias positivas por PCR en al menos una de las muestras.

35

40

45

Las cepas bacterianas seleccionadas mediante el método descrito en la presente invención se sometieron a prueba adicionalmente para establecer su singularidad y sus propiedades probióticas tal como se describe en los ejemplos 3 y 4.

50

Ejemplo 1c

50

Aislamiento de bacterias del ácido láctico

Las cepas bacterianas que se han sometido al método de selección descrito en la presente invención se han obtenido de diferentes fuentes aparte de las heces, tales como queso de cabra y de líquido amniótico y leche materna humanos. Este procedimiento de aislamiento se ha realizado tal como se describió anteriormente:

55

- Aislamiento a partir de leche materna humana

Se recogieron de manera aséptica muestras de dos mililitros de leche materna humana de una mujer de 35 años de edad (15 días tras el alumbramiento). Con el fin de aislar cepas bacterianas a partir de esta muestra, se sembraron en placa diluciones en serie de 0,1 ml en agua de peptona en placas de agar MRS (pH 6,2), MRS (pH 5,5), APT, RCM, LM17, GM17 y Elliker a 37°C tanto en condiciones aerobias como anaerobias durante 24-48 horas. A partir de aproximadamente 740 colonias en total, se seleccionaron 74 colonias (10%) que incluían al menos dos colonias de las diferentes morfologías apreciadas y se cultivaron adicionalmente en agar MRS a 37°C en condiciones anaerobias y se sometieron a prueba según el método propuesto. Dos de las colonias obtenidas a partir de esta muestra pudieron cumplir los criterios definidos.

60

65

ES 2 311 729 T3

Los *Lactobacillus gasseri* CECT5714 y *Lactobacillus fermentum* CECT5716 derivados de leche materna seleccionados se aislaron originalmente a partir de placas de agar MRS (pH 6,2) cultivadas en condiciones aerobias, mientras que se aisló el *Lactobacillus gasseri* CECT5715 a partir de placas de agar APT cultivadas en condiciones anaerobias.

5

- Aislamiento a partir de líquido amniótico humano

Se realizó el aislamiento de cepas bacterianas a partir de líquido amniótico humano mediante dilución de 2 ml de líquido amniótico humano recogido de manera aséptica por el personal clínico durante el parto de dos voluntarias. Se sembraron en placa diluciones en serie de 0,1 ml en agua de peptona en placas de agar MRS (pH 6,2), MRS (pH 5,5), APT, RCM, LM17, GM17 y Elliker a 37°C tanto en condiciones aerobias como anaerobias durante 24-48 horas. A partir de aproximadamente 400 colonias en total, se seleccionaron 40 colonias (10%) que incluían al menos dos colonias de las diferentes morfologías apreciadas y se cultivaron adicionalmente en agar MRS a 37°C en condiciones anaerobias y se sometieron a prueba según el método propuesto.

15

Las dos cepas seleccionadas a partir de esta fuente eran idénticas a las seleccionadas anteriormente a partir de leche materna humana, concretamente *Lactobacillus gasseri* CECT5714 y CECT5715.

20

- Aislamiento a partir de productos alimenticios (queso de cabra)

Se llevó a cabo el aislamiento de cepas bacterianas a partir de productos alimenticios mediante homogeneización en agua de peptona de 20 g de una parte central del producto alimenticio recogida de manera aséptica. Se sembraron en placa 0,1 ml de diluciones en serie en placas de agar MRS (Oxoid) y placas de agar RCM (Oxoid) y se cultivaron tanto en condiciones aerobias como anaerobias a 32°C durante 48 horas. A partir de más de 500 colonias en total, se seleccionaron 5 colonias de cada condición y se cultivaron adicionalmente en agar MRS a 37°C en condiciones anaerobias. Estas colonias se sometieron a prueba según el método propuesto. Sólo una de las colonias pudo cumplir los criterios definidos. La colonia derivada de queso seleccionada de *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 se aisló originalmente a partir de placas de agar MRS cultivadas en condiciones aerobias

30

- Aislamiento a partir de heces de bebés humanos amamantados

Se realizó el aislamiento de cepas bacterianas a partir de heces humanas mediante homogeneización de 2 g de heces recogidas de manera aséptica de tres bebés independientes (15-45 días de edad) en agua de peptona. Se sembraron en placa 0,1 ml de diluciones en serie en placas de agar MRS (pH 6,2), MRS (pH 5,5), APT, RCM, LM17, GM17 y Elliker a 37°C tanto en condiciones aerobias como anaerobias durante 24-48 horas. A partir de aproximadamente 670 colonias en total, se seleccionaron 67 colonias (10%) que incluían al menos dos colonias de las diferentes morfologías apreciadas y se cultivaron adicionalmente en agar MRS a 37°C en condiciones anaerobias y se sometieron a prueba según el método propuesto. Sólo una de las colonias pudo cumplir los criterios definidos.

40

El *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* CECT5713 derivado de heces de bebé seleccionado se aisló originalmente a partir de las placas de agar MRS (pH 6,2) cultivadas en condiciones aerobias.

45

Ejemplo 2

Caracterización fisiológica y genética

El fenotipo de cada cepa bacteriana seleccionada que se hizo crecer en medio MRS (agar o caldo) a 37°C en condiciones anaerobias era tal como se describe en la tabla I:

55

60

65

ES 2 311 729 T3

TABLA I

Características fenotípicas de las diferentes cepas probióticas de la invención

5 Se compararon las características fenotípicas de las diferentes cepas probióticas de la invención con las observadas en cepas probióticas comerciales conocidas (*Lactobacillus rhamnosus* LGG de Valio, *Lactobacillus johnsonii* La1 de Nestlé y *Lactobacillus casei immunitas* de Danone).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

LGG	LA1	LC
heces	heces	heces
+	+	+
-	-	-
-	-	-
bastón	bastón	bastón pequeño
1x2-4	0,9x1,5-3,5	0,9x1,5-2
no móvil	no móvil	no móvil
cadena largas	individual/ parejas	individual/ parejas

PRUEBA	CECT5711	CECT5713	CECT5714	CECT5715	CECT5716
Origen	queso	heces	leche materna	leche materna	leche materna
Gran	+	+	+	+	+
catalasa	-	-	-	-	-
oxidasa	-	-	-	-	-
morfología	bastón	bastón	bastón	bastón	bastón
tamaño (µm)	1x1,5-4	0,9x1,5-3	0,9x2-4	1x2-10	1x1,5-3
motilidad	no móvil	no móvil	no móvil	no móvil	no móvil
agregación	individual/ parejas	individual/ parejas	individual/ parejas	individual/ parejas	individual/ parejas

ES 2 311 729 T3

Para la identificación de las cepas probióticas seleccionadas, se llevó a cabo un análisis API 50CH (BioMerieux) de fermentación a 37°C en condiciones anaerobias durante 24 y 48 horas siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante. Los resultados tras 24 h de cultivo se resumen en la tabla II. Un sustrato fermentable positivo es aquél con un valor superior a 3.

TABLA II

Patrón de fermentación de las diferentes cepas probióticas de la invención

Se compararon las capacidades de fermentación de las diferentes cepas probióticas de la invención con las observadas en algunas cepas probióticas comerciales (*Lactobacillus rhamnosus* LGG de Valio, *Lactobacillus johnsonii* La1 de Nestlé y *Lactobacillus casei immunitas* de Danone) usando el método API 50CH (BioMerieux). Los sustratos fermentables positivos se indican en gris.

PRUEBA	5711	5713	5714	5715	5716	LGG	La1	<i>L. casei</i>
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabinosa	0	0	0	0	0	3	0	0
L-Arabinosa	0	3	0	4	4	0	0	5
Ribosa	0	4	0	4	4	0	0	5
D-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0
β -Metil-xilósido	0	0	0	0	0	0	0	0
Galactosa	4	5	4	5	5	5	4	5
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Fructosa	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Manosa	5	5	5	5	3	5	3	5
L-Sorbosa	0	0	0	0	0	0	0	0
Ramnosa	0	0	0	0	0	0	0	3
Dulcitol	0	0	0	0	0	5	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	1	0	0
Manitol	5	5	0	3	0	5	0	4

ES 2 311 729 T3

	Sorbitol	0	5	0	0	0	5	0	1
5	α -Metil-D-manósido	0	0	0	0	0	0	0	0
	α -Metil-D-glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0
10	N-Acetil-glucosamina	5	5	4	5	0	5	4	5
15	Amigdalina	0	0	0	5	0	1	0	1
	Arbutina	0	4	5	5	4	4	0	4
	Esculina	0	5	5	5	0	5	5	5
20	Salicina	0	3	5	5	0	5	1	4
	Celobiosa	0	4	5	5	0	5	5	5
	Maltosa	0	5	5	5	5	0	1	5
25	Lactosa	5	5	0	4	5	0	5	5
	Melibiosa	0	5	0	0	5	0	0	0
30	Sacarosa	5	5	5	5	5	1	5	5
	Trehalosa	0	5	5	5	0	5	4	4
	Inulina	0	0	0	0	0	0	0	0
35	Melezitosa	0	0	0	0	0	2	0	0
	D-Rafinosa	0	5	0	0	5	0	4	0
40	Amidón	0	0	3	5	0	0	0	1
	Glucógeno	0	0	0	0	0	0	0	0
	Xilitol	0	0	0	0	0	0	0	0
45	β -Gentiobiosa	0	2	5	5	0	2	5	4
	D-Turanosa	0	0	0	0	0	0	0	0
	D-Lixosa	0	0	0	0	0	0	0	0
50	D-Tagatosa	0	0	5	5	0	5	3	3
	D-Fucosa	0	0	0	0	0	0	0	0
55	L-Fucosa	0	0	0	0	0	4	0	0
	D-Arabitól	0	0	0	0	0	0	0	0
	L-Arabitól	0	0	0	0	0	0	0	0
60	Gluconato	0	1	0	1	1	3	0	3
	2-Ceto-gluconato	0	0	0	0	0	0	0	0
65	5-Ceto-gluconato	0	0	0	0	0	1	0	0

ES 2 311 729 T3

Las bacterias seleccionadas se clasificaron taxonómicamente según su perfil de proteína por SDS-PAGE 1D y la secuencia de ADN_r 16S por BCCM/LMG (Bélgica) y/o NIZO Food Research (Países Bajos), respectivamente. Los resultados obtenidos a partir de estos datos conducen a la clasificación taxonómica de las cepas bacterianas tal como se indicó anteriormente. Con esta clasificación, las cepas bacterianas de la invención se depositaron según el Tratado de Budapest en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), Valencia (España) el 11 de junio de 2002 y con los siguientes números de registro:

- *Lactobacillus coryniformis*: CECT5711
- *Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*: CECT5713
- *Lactobacillus acidophilus*: CECT5714
- *Lactobacillus gasseri*: CECT5715
- *Lactobacillus fermentum*: CECT5716

Ejemplo 3

Singularidad de las cepas seleccionadas

Aunque el análisis del perfil de proteína por SDS-PAGE 1D y la secuencia de ADN_r 16S realizados en el ejemplo 2 son métodos adecuados para definir la especie bacteriana, no tienen la especificidad suficiente para diferenciar entre diferentes cepas de la misma especie bacteriana. Por esta razón, se realizó un análisis de RAPD-PCR de las cepas usando dos cebadores específicos de lactobacilos diferentes (ArgDei y OPL5). Para el análisis de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD)-PCR, se aisló ADN genómico a partir de 10 ml de cultivos en MRS durante la noche usando el kit de tejido DNeasy (Qiagen) y siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor para el aislamiento de ADN genómico de bacterias Gram positivas. Se usó ADN total en las posteriores amplificaciones por PCR llevadas a cabo en un termociclador Techne ADN. Se realizaron amplificaciones por PCR usando o bien el cebador OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3'), o bien ArgDei (5'-ACCYTRGAAGGYGGYGATGTB-3'). Se analizaron cinco μ l de las mezclas de PCR en un gel de agarosa (Sigma) al 1,2% (p/v) con tinción con bromuro de etidio. Se usó un marcador de tamaño molecular (Invitrogen) de 100 pb como patrón de peso molecular. Se hicieron correr los geles durante aproximadamente 1 h a 100 V y se visualizó el ADN y se analizó en un sistema de documentación de geles (Gel Doc 2000, Bio-Rad), usando el paquete de software Diversity Database (Bio-Rad). Los resultados se muestran en la figura 3.

Además, con el fin de someter a prueba la singularidad de las cepas bacterianas seleccionadas con este nuevo procedimiento y compararlas con las cepas obtenidas mediante otros criterios de selección pero que se habían asignado anteriormente a la misma especie. Estas cepas probióticas se obtuvieron de varias colecciones de cultivo tales como CECT, ATCC, LMG o DSM y se describen en la tabla III.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 311 729 T3

TABLA III

Cepas probióticas usadas para someter a prueba la singularidad de las cepas probióticas incluidas en esta invención

5

Lactobacillus coryniformis

- 10
- DSM 20005: *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*
 - DSM 20007: *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*
 - 15
 - CECT 982: *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*
 - 20
 - CECT 4129: *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*

Lactobacillus fermentum

- 25
- LMG 8900: *Lactobacillus fermentum* = ATCC 11976
 - LMG 17551: *Lactobacillus fermentum* = ATCC 23271
 - CECT 285: *Lactobacillus fermentum* = ATCC 9338
 - 30
 - CECT 4007: *Lactobacillus fermentum* = ATCC 14931

Lactobacillus gasseri

- 35
- LMG 11413: *Lactobacillus gasseri*
 - LMG 13047: *Lactobacillus gasseri* = ATCC 19992
 - LMG 13134 : *Lactobacillus gasseri* = ATCC 9857
 - 40
 - LMG 18176 : *Lactobacillus gasseri*
 - LMG 18194 : *Lactobacillus gasseri*
 - CECT 4479 : *Lactobacillus gasseri*

Lactobacillus salivarius

- 45
- DSM 20492 : *Lactobacillus salivarius*
 - CECT 4062 : *Lactobacillus salivarius*
 - 50
 - CECT 4063 : *Lactobacillus salivarius*

55 Todas las cepas seleccionadas incluidas en esta invención se compararon con las cepas descritas en la tabla III con respecto a los perfiles de RAPD-PCR usando dos cebadores diferentes, los resultados de este análisis (figura 4) muestran que las cepas seleccionadas incluidas en esta invención son diferentes a las descritas anteriormente. Además, se extendieron estos resultados y se compararon no sólo las características genéticas sino también los aspectos bioquímicos de las cepas seleccionadas con las cepas descritas en la tabla III. En este sentido, se realizaron análisis API (BioMerieux) (tabla IV), análisis APIZYM (BioMerieux) (tabla V) y de resistencia a antibiótico tal como se describe en el ejemplo 5g (tabla VI). Las actividades que difieren de las observadas con las cepas de esta invención se han indicado en gris.

60

65

ES 2 311 729 T3

TABLA IV

Comparación de los perfiles de API de las bacterias seleccionadas usando el método descrito en esta invención con otras bacterias de la misma especie

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

PRUEBA	<i>L. salivarius</i>					<i>L. coryniformis</i>				
	5713	4063	4062	20492	20492	5711	4129	982	2007	2005
Glicerol	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ribosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b-Metil-xilósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galactosa	5	5	0	5	5	5	5	5	5	5
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Fructosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Manosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
L-Sorbosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ramnosa	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0
Dulcitol	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manitol	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Sorbitol	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0
a-Metil-D-manósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a-Metil-D-glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-glucosamina	5	5	5	5	5	4	4	5	5	5
Amigdalina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arbutina	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

L. fermentum

PRUEBA	5714	11413	18194	4479	18176	13047	5715	11413	18194	4479	18176	13047	5716	4007	285	17551	8900
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	5
Ribosa	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5
D-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b-Metil-xilósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galactosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	5
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Fructosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	4	5	5
D-Manosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	0	4	3	3
L-Sorbosa	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Ramnosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dulcitol	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manitol	0	0	5	0	0	0	3	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Sorbitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a-Metil-D-manósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a-Metil-D-glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0

L. gasserii

PRUEBA	5714	11413	18194	4479	18176	13047	5715	11413	18194	4479	18176	13047
Glicerol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eritritol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
Ribosa	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
D-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b-Metil-xilósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galactosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Glucosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Fructosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
D-Manosa	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
L-Sorbosa	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0	0
Ramnosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dulcitol	0	0	4	0	0	0	0	0	4	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Manitol	0	0	5	0	0	0	3	0	5	0	0	0
Sorbitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a-Metil-D-manósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
a-Metil-D-glucósido	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Acetil-	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

ES 2 311 729 T3

5	0	0
	0	0
10	0	0
	0	0
15	0	0
	0	0
20	0	0
	0	0
25	0	0
	0	0
30	0	0
	0	0
35	0	0
	0	0
40	0	0
	0	0
45	0	0
	0	0
50	0	0
	0	0
55	0	0
	0	0
60	0	0
	2-Ceto- gluconato	5-Ceto- gluconato
65		

Las cepas probióticas usadas se describieron en la tabla III. Las actividades que difieren de las observadas con las cepas de esta invención se han indicado en gris.

TABLA V

Comparación de los perfiles de APIZYM de las bacterias seleccionadas usando el método descrito en esta invención con otras bacterias de la misma especie

L. salivarius

Enzima	DSM20492	CECT 4062	CECT 4063	CECT5713
control	-	-	-	-
fosfatasa alcalina	2	2	+	-
Esterasa (C4)	2	2	-	3
Esterasa lipasa (C8)	-	-	-	3
Lipasa (C14)	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+
Valina arilamidasa	-	2	-	1
Cistina arilamidasa	1	4	-	3
Tripsina	-	-	-	-
α -quimiotripsina	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	+	+	+	4
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	1	3	-	+
α -galactosidasa	+	3	-	2
β -galactosidasa	+	3	+	-

L. coryniformis

Enzima	DSM 20005	CECT 4129	DSM 20007	CECT 982	CECT5711
control	-	-	-	-	-
fosfatasa alcalina	1	1	-	-	-
Esterasa (C4)	-	-	-	-	-
Esterasa lipasa (C8)	-	-	-	-	-
Lipasa (C14)	-	1	-	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	+	+	+	+	+
Cistina arilamidasa	2	2	1	1	1
Tripsina	-	-	-	-	-
α -quimiotripsina	-	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	1	3	1	1	1
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	-	+	+
α -galactosidasa	-	1	-	-	1
β -galactosidasa	+	+	-	-	+

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

β -glucuronidasa	-	-	-	-	-	-
α -glucosidasa	-	-	-	-	-	-
β -glucosidasa	-	-	-	-	-	-
N-acetil- β -glucosaminidasas	-	-	-	-	-	-
α -manosidasa	-	-	-	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	-	-	-

β -glucuronidasa	1	1	-	-	-	-
α -glucosidasa	+	+	3	3	-	+
β -glucosidasa	-	-	-	-	-	-
N-acetil- β -glucosaminidasas	-	-	-	-	-	-
α -manosidasa	-	-	-	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	-	-	-

L. gasseri

Enzima	LMG	LMG	LMG	LMG	LMG	LMG	LMG	CECT	CECT5714	CECT5715
control	11413	13047	13134	18176	18194			4479		
fosfatasa alcalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterasa (C4)	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Esterasa lipasa (C8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipasa (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	1	1	3	2	-	-	-	-	-	1
Cistina arilamidasa	1	1	4	2	3	3	4	4	1	1
Tripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -quimiotripsina	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	1	2	+	-	1	1	2	2	1	1
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	1	+	+	+	-	-	+	+	+	+
α -galactosidasa	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+
β -galactosidasa	4	1	3	-	-	-	-	-	-	-
β -glucuronidasa	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
α -glucosidasa	1	+	-	1	2	2	1	1	-	1
β -glucosidasa	+	-	3	+	-	-	3	3	4	+
N-acetil- β -glucosaminidasas	+	1	-	+	-	-	-	-	-	1
α -manosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

L. fermentum

Enzima	CECT285	CECT 4007	LMG 8900	LMG 17551	CECT5716
control	-	-	-	-	-
fosfatasa alcalina	2	-	-	-	-
Esterasa (C4)	3	4	3	4	2
Esterasa lipasa (C8)	3	4	3	4	3
Lipasa (C14)	-	-	-	-	-
Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+
Valina arilamidasa	1	4	4	2	1
Cistina arilamidasa	1	4	3	1	1
Tripsina	-	-	-	-	-
α -quimiotripsina	-	-	-	-	-
Fosfatasa ácida	+	+	+	3	1
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	3	3	2
α -galactosidasa	+	2	+	1	4
β -galactosidasa	+	+	+	+	+
β -glucuronidasa	1	-	-	-	-
α -glucosidasa	+	4	+	+	3
β -glucosidasa	-	-	-	-	-
N-acetil- β -glucosaminidasas	-	-	-	-	-
α -manosidasa	-	-	-	-	-
α -fucosidasa	-	-	-	-	-

ES 2 311 729 T3

Las cepas probióticas usadas se describieron en la tabla III. Las actividades que difieren de las observadas con las cepas de esta invención se han indicado en gris.

TABLA VI

Comparación de resistencias a antibiótico de las bacterias seleccionadas usando el método descrito en esta invención con otras bacterias de la misma especie

<i>L. salivarius</i>											
Antibiótico	20492	4063	4062	CECT573	Antibiótico	20005	20007	4129	982	CECT511	
P10	S	S	S	S	P10	S	S	S	S	S	
E15	S	S	S	S	E15	S	S	S	S	S	
KF30	S	S	S	S	KF30	S	I	S	S	S	
FOX30	S	S	S	S	FOX30	S	R	S	R	R	
CIP5	R	I	I	S	CIP5	R	I	R	R	R	
DA2	S	S	S	S	DA2	S	S	S	S	S	
AML25	S	S	S	S	AML25	S	S	S	S	S	
C30	S	S	S	S	C30	S	S	S	S	S	
CN10	R	R	R	R	CN10	R	R	R	R	R	
TE30	S	S	S	S	TE30	S	S	S	S	S	
CLR15	S	S	S	S	CLR15	S	S	S	S	S	
SXT25	I	R	R	R	SXT25	I	R	R	R	I	
AMP10	S	S	S	S	AMP10	S	S	S	S	S	
NA30	R	R	R	R	NA30	R	R	R	R	R	
VA30	R	R	R	R	VA30	R	R	R	R	R	
MTZ5	R	R	R	R	MTZ5	R	R	R	R	R	

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

L. gasserii

Antibiótico	11413	13047	13134	18176	18194	4479	CECT5714	CECT5715
P10	S	S	S	S	S	S	S	S
E15	S	S	S	S	S	S	S	S
KF30	S	S	S	S	S	S	S	S
FOX30	S	S	I	S	S	S	S	S
CIP5	R	R	R	R	R	R	R	R
DA2	S	I	S	R	R	R	S	S
AML25	S	S	S	S	S	S	S	S
C30	S	S	S	S	S	S	S	S
CN10	R	R	R	R	R	R	R	R
TE30	S	S	S	S	S	S	S	S
CLR15	S	S	S	S	S	S	S	S
SXT25	R	R	R	R	R	R	R	R
AMP10	S	S	S	S	S	S	S	S
NA30	R	R	R	R	R	R	R	R
VA30	S	S	S	S	S	I	I	I
MT25	R	R	R	R	R	R	R	R

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

L. fermentum

Antibiótico	285	4007	8900	17551	CECT5716
P10	S	S	S	S	S
E15	S	S	S	S	S
KF30	S	S	S	S	S
FOX30	R	R	S	R	I
CIP5	R	R	R	R	R
DA2	S	S	S	S	S
AML25	S	S	S	S	S
C30	S	S	S	S	S
CN10	R	R	R	R	R
TE30	S	S	S	S	S
CLR15	S	S	S	S	S
SXT25	R	R	R	R	R
AMP10	S	S	S	S	S
NA30	R	R	R	R	R
VA30	R	R	R	R	R
MT25	R	R	S	R	R

ES 2 311 729 T3

Las cepas probióticas usadas se describieron en la tabla III. Los antibióticos usados y la metodología se describen en el ejemplo 4e. R = resistente, I = intermedio, S = sensible. Las actividades que difieren de las observadas con las cepas de esta invención se han indicado en gris.

5

Ejemplo 4

Características probióticas de las cepas

10 También se analizó la idoneidad del procedimiento de selección de cepas probióticas incluidas en esta invención con respecto a su capacidad de seleccionar cepas bacterianas con características probióticas deseables. Con el fin de evaluar esto, se analizaron las cepas seleccionadas para determinar un alto número de características diferentes que podrían potenciar sus capacidades de actuar como una cepa probiótica. Además, se asignó arbitrariamente (según se indica) un valor numérico a los resultados obtenidos en cada prueba con el fin de comparar la cepa probiótica incluida en esta invención con las obtenidas mediante otros criterios de selección. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla VIII al final de este ejemplo y se describen en los siguientes subejemplos y se comparan con algunas cepas comerciales.

20 Ejemplo 4a

Análisis de adhesión a Caco-2 y HT-29

- Cultivo de células Caco-2 y HT-29

25

Para los análisis de adhesión e inhibición, se utilizaron las líneas celulares Caco-2 (ATCC HTB-37) y HT-29 (ATCC HTB-38) como modelo de las células del intestino. Ambas líneas celulares presentaban rasgos característicos de células intestinales tales como polarización, expresión de enzimas intestinales y producción de mucinas y polipéptidos estructurales particulares.

30

Se hicieron crecer las células en frascos de plástico (75 cm², Nunc) en DMEM (PAA laboratories) como medio de cultivo complementado con FCS inactivado al 10% (suero de ternero fetal, PAA laboratories), aminoácidos no esenciales, penicilina/estreptomicina 100 U/ml, anfoterina 1 µg/ml. Se realizó el cultivo celular a 37°C en una atmósfera que comprendía el 95% de aire y el 5% de CO₂. Se cambió el medio en una base de dos veces al día y se separaron las células cada semana.

35

Para los ensayos de adhesión, se separaron las células en placas de plástico de 35 mm (Nunc) y se cultivaron en condiciones similares pero sin antibióticos tras la confluencia. Se realizaron ensayos de adhesión 10-14 días tras la confluencia.

40

- Cultivo de bacterias

o Cepas probióticas

45 Se cultivaron las cepas probióticas de esta invención en caldo MRS (pH 6,2) en condiciones anaerobias durante 16-18 horas a 37°C tras la inoculación de un 0,1% (v/v) de la disolución madre en glicerol. En estas condiciones, la concentración del cultivo era de 1-2x10⁹ ufc/ml, tal como se observó mediante siembra en placa en agar MRS.

o Cepas Gram-negativas

50

Escherichia coli O157:H7 (no patógena) (CECT4972), *E. coli* O157:H7 (enteropatógena) (CECT4783), *E. coli* O157:H7 (enteropatógena) (CECT4782), *Salmonella choleraesuis typhi* (CECT409) y *S. choleraesuis typhimurium* (CECT443) se obtuvieron todas de la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo). Se cultivaron todas las cepas gram negativas en caldo TSB (AES Laboratoire) en condiciones anaerobias durante 16-18 horas a 37°C tras la inoculación de un 0,1% (v/v) de la disolución madre en glicerol. En estas condiciones, la concentración del cultivo era de 1-2x10⁹ ufc/ml, tal como se observó mediante siembra en placa en agar TSA (AES Laboratoire).

55

- Análisis de adhesión

60 Se cultivaron líneas celulares intestinales Caco-2 y HT-29 en placas de plástico de 35 mm en 2 ml de medio sin antibióticos hasta la confluencia. 10-14 días tras la confluencia, se substituyó 1 ml de medio por 1 ml de una suspensión de 10⁸ bacterias en DMEM. Se incubaron los cultivos durante 1 hora a 37°C. Tras esto, se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron con metanol al 70% enfriado con hielo durante 30 minutos. Se secaron al aire las placas y se tiñeron con Gram. Se visualizaron las bacterias unidas usando un microscopio óptico Axiovert 200 (Zeiss) a 1000x aumentos en inmersión en aceite. Se contaron veinte campos aleatorios y se expresaron los resultados como la media del número de bacterias unidas a las células por campo ± DE. La capacidad de una cepa probiótica se consideró alta si el número de bacterias unidas era >250, moderada entre 100 y 250 y ligera >100 (figura 5).

65

ES 2 311 729 T3

Ejemplo 4b

Resistencia a ácido y sales biliares

5 Para analizar la resistencia de las cepas probióticas de esta invención al contenido ácido y en sal biliar alto, condiciones que estas bacterias encontrarán durante el tránsito digestivo, se cultivaron bacterias en medios de caldo MRS o bien a pH 3,0 o bien en caldo MRS a pH 6,2 complementado con el 0,15% de sales biliares (Sigma) durante 90 minutos. Se calculó la tasa de supervivencia mediante siembra en placa de agar MRS de diluciones en serie y se comparó con la de varias colonias obtenidas en condiciones control (caldo MRS pH 6,2). Se cultivaron las placas durante 16-18 horas a 10 37°C en condiciones anaerobias. Se repitió el experimento tres veces. La resistencia se consideró alta cuando la supervivencia era >80%, moderada del 80% al 60%, ligera <60% en comparación con las condiciones control (figura 6).

Ejemplo 4c

Tiempo de generación

El tiempo de generación, que significa el tiempo que requiere un cultivo bacteriano para duplicar la concentración de bacterias, es una característica importante para una bacteria probiótica. Es importante desde un punto de vista industrial (producción de una mayor cantidad de biomasa en la misma cantidad de tiempo) y desde un punto de vista 20 probiótico (mayor colonización del intestino). Con el fin de considerar ambos aspectos, se ha analizado el tiempo de generación de las cepas probióticas de la invención en un medio rico (punto de vista industrial) y un medio pobre (punto de vista probiótico).

Las cepas probióticas de esta invención se hicieron crecer en caldo MRS (pH 6,2) con un 2% (medio rico) o un 0,2% (medio pobre) de glucosa durante 0, 1, 2, 4 y 6 horas a 37°C en condiciones anaerobias y se determinó la concentración de bacterias mediante siembra en placas de diluciones en serie en placas de agar MRS e incubación de las placas durante 16-18 horas a 37°C en condiciones anaerobias (figura 7). Se calculó el tiempo de generación como el tiempo en minutos necesario con el fin de duplicar el número de colonias en el momento inicial.

Ejemplo 4d

Capacidades de fermentación

La capacidad de una cepa bacteriana de metabolizar hidratos de carbono complejos (fibras solubles y no solubles) garantiza que estas cepas probióticas puedan usarlos como fuente de carbono en el colon, y por tanto potenciar la eficacia de la colonización. Por esta razón, se ha sometido a prueba la capacidad de las cepas probióticas de esta invención de usar varias fibras no digeribles como una única fuente de hidratos de carbono.

Para someter a ensayo la capacidad de las cepas bacterianas probióticas de metabolizar fibra que se cultivaron, se llevó a cabo un cultivo líquido en medio de caldo MRS sin glucosa y complementado con un 2% de cada fibra en placas de plástico de fondo plano de 96 pocillos (Nunc) durante 24 y 48 horas a 37°C en condiciones anaerobias. Se controló el proceso de fermentación mediante la disminución de pH en el medio y se determinó mediante un enfoque colorimétrico usando rojo de fenol al 0,3% como indicador y midiendo la absorbancia a 540 nm.

Las fibras usadas fueron: -celulosa (celulosa sin procesar, Campi y Jove), Actilight (fructooligosacárido, Beghin-Meiji), Ficao (fibra de cacao, Natra), Fructafit (inulina, Sensus), lactosa (Bordulo), pectina (YM100, Genu), rafilina (inulina-oligofructosa, Orafit), rafilosa (inulina-oligofructosa, Orafit) y Vitacel (celulosa purificada, Campi y Jove).

Se calculó la capacidad de fermentación (definida como la inducción en veces de la reducción del pH en comparación con el control sin fibra). Los resultados mostrados en la figura 8 representan los valores individuales para cada fibra (panel A) y la suma de todos estos valores individuales para cada cepa seleccionada (panel B). La capacidad de fermentación se consideró alta cuando la suma de los valores individuales era >30, moderada de 30 a 25, ligera <25.

Ejemplo 4e

Resistencia a antibióticos

El uso de antibióticos conduce a una reducción de la microflora intestinal comensal que algunas veces se relaciona con diarrea y otros trastornos intestinales. Además, esta reducción en la cantidad de bacterias intestinales podría ser la consecuencia de que virus y bacterias patógenas oportunistas infecten al huésped. El uso de antibióticos para bloquear la infección no resuelve este trastorno sino que lo complica. En otras situaciones como inflamación intestinal en la que las cepas probióticas podrían ejercer un papel beneficioso, este posible efecto está limitado algunas veces por la terapia simultánea con antibióticos. Por estas razones, la selección de posibles cepas probióticas que pueden resistir antibióticos comunes sería una mejora en la técnica.

Para analizar la resistencia de las cepas probióticas de esta invención se usó un ensayo de difusión en pocillo con agar. Se prepararon placas de agar Mueller-Hinton que contenían 10^6 ufc/ml de cada cepa probiótica. Entonces, se añadieron discos comerciales de antibiótico correspondientes a las concentraciones indicadas a los pocillos y se

dejaron difundir en el agar durante un periodo de preincubación de 10 minutos a temperatura ambiente, seguido por incubación anaerobia de las placas a 37°C durante 16-18 horas. Se midió el diámetro de los halos de inhibición y se clasificó el grado de resistencia de las bacterias a cada antibiótico como R (resistente), I (intermedio) o S (sensible) según la sensibilidad descrita de lactobacilos a estos antibióticos (tabla VII). Tras eso, se asignó un valor numérico a cada condición: R=3, I=2, y S=1. Se sometieron a prueba diez antibióticos diferentes y se añadieron los valores numéricos hasta conseguir un valor global. La capacidad de resistencia de una cepa probiótica se consideró alta si el valor total era >17, moderada entre 15 y 17 y ligera <15.

Los antibióticos y las concentraciones usados fueron: eritromicina 15 mg (E 15), penicilina 10 µg (P 10), ciprofloxacina 5 µg (CiP 5), cloranfenicol 30 µg (C 30), ácido nalidíxico 30 µg Na 30), amoxicilina 10 µg (AM 10), tetraciclina 30 µg (Te 10), vancomicina 30 µg (Va 30), cefoxitina 30 µg (Fox 30) y cefalotina 30 µg (CF 30) (figura 9).

Tabla VII: Resistencia de las cepas seleccionadas a antibióticos.

PRUEBA	CECT5711	CECT5713	CECT5714	CECT5715	CECT5716	LGG	LAI	LC
E 15	S	S	S	S	S	S	R	R
P 10	S	S	S	S	S	S	S	S
CiP 5	R	I	R	R	R	I	R	R
C 30	S	S	S	S	S	S	S	S
Na 30	R	R	R	R	R	R	R	R
AM 10	S	S	S	S	S	S	S	S
Te 30	I	S	S	S	S	S	S	S
Va 30	R	R	I	I	R	R	S	S
Fox 30	R	S	R	R	R	R	R	R
CF 30	S	S	I	I	S	I	I	I
Total	19	15	16	18	19	17	18	18

Ejemplo 4f

Producción de ácidos metabólicos

5 La producción de ácidos metabólicos por las bacterias probióticas, concretamente ácido láctico, acético, propiónico y butírico, y la reducción posterior del pH en las heces se ha asociado de manera extensa con un efecto beneficioso de estas bacterias debido a una reducción en el crecimiento y en las capacidades infecciosas de microorganismos patógenos oportunistas. Además, algunos de estos ácidos, especialmente ácido butírico, se absorben rápidamente y se usan por las células intestinales como fuente de energía. En este sentido, el pH reducido en las heces de los lactantes amamantados se ha asociado con el riesgo reducido de trastornos intestinales en comparación con bebés alimentados con preparado.

15 Se observó la capacidad de producción de ácido de las cepas probióticas de la invención mediante la medición de la reducción del pH durante la fermentación de la leche. Se inocularon cinco ml de leche desnatada con 10^8 ufc de cada cepa bacteriana y se fermentaron durante 24 (barras grises) y 48 (barras negras) horas a 37°C en condiciones anaerobias y se midió el pH usando un pH-metro CyberScan 510 (VWR). La producción de ácido por una cepa probiótica se consideró alta si el valor de pH de la leche tras 48 horas era <4,5, moderada entre 4,5 y 5,5, y ligera >5,5 (figura 10).

Ejemplo 4g

Producción de metabolitos antimicrobianos

25 Se ha sugerido que el principal efecto beneficioso de las cepas probióticas es el control del equilibrio entre bacterias intestinales útiles y nocivas en el intestino. Cuando se reduce el número de bacterias útiles, las bacterias oportunistas podrían crecer excesivamente y alterar el bienestar del huésped o incluso inducir una infección. La mayoría de los organismos bacterianos han adquirido características o mecanismos que reducen las capacidades de crecimiento de otros microorganismos que cohabitan con ellos y por tanto, permitiendo su crecimiento selectivo. Tal como se expone en el ejemplo 4f, la reducción del pH a través de la producción de ácido por las bacterias del ácido láctico es uno de tales mecanismos. Además, algunas bacterias del ácido láctico también producen componentes de péptidos bioactivos y otros metabolitos que inhiben selectivamente el crecimiento de otras bacterias, levaduras u hongos. Este es el caso de bacteriocinas tales como pediocina.

35 Se evaluaron las cepas probióticas de esta invención para determinar su capacidad de producir metabolitos antimicrobianos usando un ensayo de difusión en pocillo con agar. Se prepararon placas de agar MRS que contenían 10^6 ufc/ml de diferentes cepas de bacterias patógenas (*Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*). Entonces se cortaron los pocillos, con un diámetro de 5 mm, en el agar usando un taladrador estéril. Entonces, se añadieron 50 μ l de un sobrenadante concentrado 2 veces de cada cultivo de cepa probiótica a los pocillos y se dejó difundir en el agar durante un periodo de preincubación de 2 horas a 4°C, seguido por incubación aerobia de las placas a 37°C durante 40 16-18 horas. La actividad microbiana de cada sobrenadante se consideró alta si el diámetro del halo de inhibición para ambas cepas de bacterias patógenas era >12, moderada entre 8 y 12, y ligera <8 (fig. 11).

45 Además, también se sometió a prueba si la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se debía a una sustancia antimicrobiana o a la producción de ácidos metabólicos. En este sentido, se sometió a ensayo el efecto inhibitorio de una dilución de cada ácido metabólico (acético, láctico, propiónico y butírico) a pH 4,5. Ninguna de estas situaciones inhibió el crecimiento de *Salmonella* o *E. coli* en estas condiciones (datos no mostrados). También se sometieron a prueba las capacidades antimicrobianas de sobrenadantes obtenidos a partir de cultivos bacterianos usando glucosa o lactosa como fuente de hidratos de carbono. En estas circunstancias, las cepas bacterianas que no fermentan lactosa (*L. rhamnosus* GG y *L. acidophilus* CECT5714) no mostraron actividad microbiana en el cultivo que contenía lactosa 50 mientras que mostraron esta actividad en el cultivo con glucosa (datos no mostrados).

Ejemplo 4h

Inhibición de adhesión de patógenos a Caco-2

55 Se cultivaron líneas celulares intestinales Caco-2 en placas de plástico de 35 mm en 2 ml de medio completo sin antibióticos hasta la confluencia. 10-14 días tras la confluencia, se sustituyó 1 ml de medio por 1 ml de una suspensión de 10^8 bacterias probióticas en DMEM. Se incubaron los cultivos 1 hora a 37°C. Tras eso, se añadió 1 ml de una suspensión de 10^8 bacterias patógenas (*E. coli* o *S. typhimurium*) en DMEM a los cultivos y se incubó 1 hora más a 37°C. Se lavaron dos veces las células con PBS y se fijaron con metanol al 70% enfriado con hielo durante 30 minutos. Se secaron al aire las placas y se tiñeron con Gram. Se visualizaron las bacterias unidas usando un microscopio óptico Axiovert 200 (Zeiss) con 1000x aumentos en inmersión en aceite. Se contó el número de bacterias gram negativas en 10 campos aleatorios y se expresaron los resultados como la media del % de bacterias patógenas unidas a las células en comparación con los cultivos control sin cepas probióticas. La capacidad de inhibir la adhesión 65 de bacterias patógenas a las células intestinales de una cepa probiótica se consideró alta si el % de ambas cepas de bacterias unidas gram negativas en comparación con el control era <25%, moderada entre el 25% y el 75%, y ligera >75% (figura 12).

ES 2 311 729 T3

Todos los resultados obtenidos en el ejemplo 4 se resumen en la tabla VIII. Cada prueba se realizó tal como se indicó en el correspondiente sub-ejemplo y se describió en este documento. Las categorías en cada prueba se asignaron tal como se indica. a) Ejemplo 4a; número de bacterias unidas por campo; alto >250, moderado: de 100 a 250, ligero <100. b) Ejemplo 4b; % de supervivencia en comparación con condiciones control; alto >80%, moderado: del 80% al 60%, ligero <60%. c) Ejemplo 4c; minutos necesarios para duplicar la población inicial; rápido < 60, moderado: de 60 a 120, lento >120. d) Ejemplo 2; número de sustratos fermentables; alto >18, moderado, de 12 a 18, ligero < 12. e) Ejemplo 4d; reducción en veces acumulada de los sustratos fermentables totales en comparación con el control; alta >30, moderada: de 25 a 30, ligera <25. f) Ejemplo 4e, resistencia acumulada a cada antibiótico (resistente =3, intermedio =2, sensible =1); alta >17, moderada: de 15 a 17, ligera <15. g) Ejemplo 4f; valor de pH de la leche tras el cultivo de 48 horas; alto <4, moderado: de 4 a 4,5, ligero >4,5. h) Ejemplo 4g; mm del halo de inhibición alto >12, moderado: de 12 a 8, ligero <8, (*) sólo en presencia de glucosa pero no de lactosa. i) Ejemplo 4h; % de adhesión; alto <25, moderado: de 25 a 75, ligero <75. Se calculó la capacidad probiótica global mediante la suma de todas las pruebas (alta=3, moderada=2, ligera=1).

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 311 729 T3

TABLA VIII

Potencia para actuar como cepa probiótica de las diferentes cepas de la invención

5 Se compararon las diferentes capacidades de actuar como cepa probiótica de las diferentes cepas de la invención con las observadas en algunas cepas probióticas comerciales (*Lactobacillus rhamnosus* LGG de Valio, *Lactobacillus johnsonii* La1 de Nestlé y *Lactobacillus casei immunitas* de Danone) y se cuantificaron arbitrariamente.

10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

PRUEBA	CECT5711	CECT5713	CECT5714	CECT5715	CECT5716	LGG	LA1	LC
Adhesión a Caco-2 ^a	alta	moderada	alta	alta	alta	alta	alta	ligera
Adhesión a HT-29 ^a	alta	alta	moderada	moderada	alta	alta	moderada	ligera
Resistencia a ácido ^b	alta	moderada	alta	moderada	alta	moderada	ligera	ligera
Resistencia a bilis ^b	alta	alta	ligera	ligera	moderada	ligera	alta	alta
Tiempo de generación ^c	moderado	rápido	moderado	lento	moderado	rápido	moderado	moderado
API CH50 ^d	ligero	alto	moderado	alto	moderado	moderado	moderado	alto
Fermentación ^d	moderada	alta	ligera	ligera	ligera	ligera	alta	alta
Antibiograma ^f	alto	ligero	moderado	alto	alto	moderado	alto	alto
Reducción del pH ^g	alta	moderada	moderada	moderada	moderada	ligera	moderada	ligera
Prod. Antimicrobiana ^h	alta	alta	alta (*)	moderada	moderada	moderada (*)	ligera	ligera
Inhibición de patógenos ⁱ	alta	alta	moderada	alta	alta	alta	moderada	ligera
Capacidad probiótica	29	28	23	23	26	23	24	20

Ejemplo 5

Colonización probiótica del intestino de ratones

5 Por definición, una cepa probiótica debe colonizar la mucosa intestinal del huésped. Además, se ha descrito que las acciones beneficiosas ejercidas por las cepas probióticas requieren esta colonización. Aunque estudios *in vitro* todavía se mantuvieron los animales en observación durante otros 14 días. Se recogieron muestras de heces a los 0, 7, 15 14, 21 y 28 días desde el inicio del experimento. Se recogieron aproximadamente 200 mg de heces independientemente de cada ratón y se homogeneizaron a 50 mg/ml en agua de peptona. Se prepararon diluciones en serie del sobrenadante recogido y se sembraron en placa 0,1 ml en placas de agar selectivo (MRS para lactobacilos, agar Eugon + zumo de tomate para bifidobacterias y agar McConkey para bacterias coliformes). Se incubaron las placas a 37°C en condiciones anaerobias durante 24 horas. Se determinó el número de ufc mediante recuento en las placas de medio selectivo placas 20 y se calculó el promedio.

Se complementaron diariamente seis ratones Balb/c macho (de 6-8 semanas de edad) con 10^8 ufc en 0,2 ml de leche desnatada de *L. salivarius* CECT5713 durante 14 días. Tras este periodo, se detuvo la complementación probiótica pero todavía se mantuvieron los animales en observación durante otros 14 días. Se recogieron muestras de heces a los 0, 7, 15 14, 21 y 28 días desde el inicio del experimento. Se recogieron aproximadamente 200 mg de heces independientemente de cada ratón y se homogeneizaron a 50 mg/ml en agua de peptona. Se prepararon diluciones en serie del sobrenadante recogido y se sembraron en placa 0,1 ml en placas de agar selectivo (MRS para lactobacilos, agar Eugon + zumo de tomate para bifidobacterias y agar McConkey para bacterias coliformes). Se incubaron las placas a 37°C en condiciones anaerobias durante 24 horas. Se determinó el número de ufc mediante recuento en las placas de medio selectivo placas 20 y se calculó el promedio.

La figura 13 muestra que la complementación con *L. salivarius* CECT5713 provocó un aumento estadísticamente significativo en el número de lactobacilos totales en heces que demuestra que esta cepa puede sobrevivir a su paso a través del tubo digestivo y alcanzar el colon. Además, el hecho de que el aumento en el recuento de lactobacilos pudiese observarse todavía una semana tras la finalización de la complementación oral demuestra que esta cepa probiótica puede colonizar temporalmente la mucosa intestinal. 25

De manera concomitante con el aumento de lactobacilos, también se observó una reducción en el recuento fecal de bacterias coliformes, y todavía era estadísticamente significativa dos semanas tras la finalización del tratamiento probiótico. Este hallazgo muestra que la complementación dietética con células CECT5713 no sólo provoca la estimulación de la flora beneficiosa sino también la inhibición de las bacterias nocivas. 30

Ejemplo 6

35 *Efecto de Lactobacillus fermentum CECT5716 sobre la translocación de Salmonella typhimurium en ratones tras inmunización con vacuna frente a Salmonella inactivada*

La translocación de bacterias Gram negativas a través del epitelio del intestino puede producirse especialmente en sujetos tras la infección gastrointestinal, enfermedad o cirugía. Si se deja sin tratar, puede conducir a endotoxemia. En este ejemplo, se examinó el efecto del suministro de *L. fermentum* CECT5716 sobre la translocación del patógeno del intestino *Salmonella typhimurium*. 40

Se inocularon diariamente por vía oral ratones Balb/c macho (6-8 semanas de edad) con 1×10^8 ufc en 0,2 ml de leche o leche sola durante dos semanas. Después de eso, se inmunizaron los ratones por vía oral o no con una vacuna frente a *Salmonella* inactivada (10^8 ufc inactivadas con paraformaldehído en 0,2 ml de leche). Tras la inmunización, se inocularon los ratones por vía oral dos semanas más con la preparación de *L. fermentum* CECT5716 en días alternos durante dos semanas más. Dos semanas tras la inmunización oral, se expusieron todos los ratones por vía oral con *S. typhimurium* viva (10^{10} ufc en 0,2 ml de leche). Entonces, tras 24-48 horas, se determinó el nivel de colonización de *S. typhimurium* en el bazo mediante recuento de colonias en agar SS (Oxoid). También se midió la concentración fecal de IgA específica para antígenos de *Salmonella* mediante técnicas de ELISA (Biosource). 50

Los resultados obtenidos demuestran que *L. fermentum* CECT5716 potencia el efecto beneficioso de la vacunación de ratones con la vacuna frente a *Salmonella* inactivada tal como se muestra en la figura 15. La inhibición de la translocación de *S. typhimurium* inducida por la vacuna inactivada y potenciada por *L. fermentum* CECT5716 se debía al aumento de la secreción de IgA específica y también al efecto de bloqueo o inhibición de la cepa probiótica sobre la adhesión a la mucosa de *Salmonella* tal como se describió en el ejemplo 4h. 55

Ejemplo 7

60 *Efecto de bacterias probióticas sobre citocinas inflamatorias*

Además de la reducción del riesgo de infección, muchos efectos clínicos asociados con tratamientos probióticos se deben a las capacidades inmunomoduladoras de las cepas probióticas seleccionadas. La regulación de la respuesta inmunitaria está mediada habitualmente a través de un cambio en el equilibrio entre citocinas proinflamatorias (Th1) tales como TNF- α , citocinas humorales (Th2) tales como IL-4 o IL-13 y citocinas reguladoras (Th3) tales como IL-10 y TGF- β . Por esta razón, también se sometió a prueba el efecto de algunas de las cepas probióticas de esta invención en la regulación de la expresión de algunas de estas citocinas cruciales. 65

ES 2 311 729 T3

Se estimularon macrófagos derivados de la médula ósea con 100 ng/ml de LPS (Sigma) como modelo celular. Se cultivaron 10^5 macrófagos/pocillo en placas de plástico de 24 pocillos (Nunc) con 1 ml de DMEM. Una vez unidos, se estimularon los macrófagos o no con 100 ng/ml de LPS y con 10^7 ufc/ml de las cepas probióticas indicadas durante 12 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la producción de citocinas usando un ELISA de IL-10 de ratón o de TNF- α de ratón (Biosource). Los resultados obtenidos (figura 15) muestran que el consumo de las cepas probióticas de esta invención podrían tener un efecto beneficioso en algunas situaciones inflamatorias dado que inducen un efecto antiinflamatorio global sobre células inmunitarias tales como macrófagos, induciendo un aumento en la expresión de IL-10 sin aumentar los niveles de TNF- α secretado.

10 Ejemplo 8

Efecto de bacterias probióticas sobre la producción de Ig

Se analizó el efecto de las cepas probióticas de esta invención sobre la producción de inmunoglobulina usando cultivos de linfocitos obtenidos a partir del bazo de ratones Balb/c macho (6-8 semanas de edad). Se cultivaron 2×10^6 linfocitos en 1 ml de DMEM en placas de plástico de 24 pocillos y se estimularon con cultivos probióticos inactivados (10^8 ufc/ml) en presencia o ausencia de 25 μ g/ml de LPS durante 6 días. Se evaluó la producción de IgG por linfocitos usando un ELISA de IgG de ratón de Bethyl.

Los resultados obtenidos (figura 16) muestran que el efecto sobre la producción de IgG inducida en linfocitos de las cepas probióticas de esta invención es sumamente variable dependiendo de la cepa seleccionada usada. En este aspecto, hay algunas cepas (CECT5711 y CECT5714) que tienen actividades inmunoestimuladoras dado que inducen la expresión de IgG, mientras que otras (CECT5713 y CECT5715) tienen efectos inmunosupresores.

25 Ejemplo 9

Preparación de un preparado de leche líquida fermentada

Se preparó una composición de leche líquida fermentada normal con cepas probióticas usando la siguiente fórmula:

30	Leche 1,5% de grasa; 3,2% de proteína	997 g/kg
	Leche en polvo desnatada	3 g/kg
35	Cepa probiótica (10^{12} ufc/g)	0,1 g/kg

Los contenidos en sólidos secos y en grasa de la leche se normalizaron según la formulación descrita anteriormente. Tras esto, se homogeneizó la leche a 20-25 Mpa y 65-70°C para obtener propiedades físicas óptimas en el producto. La preparación se calentó a 90-95°C y un tiempo de espera de aproximadamente 5 minutos. Este periodo de tiempo provoca la desnaturalización de aproximadamente el 70-80% de las proteínas del suero. Se inoculó leche fría (40-45°C) con la cepa probiótica en ausencia de cualquier cultivo iniciador y se fermentó en el tanque de incubación a 40-45°C durante 10 horas sin agitación hasta alcanzar un pH final (pH 4,5-5). Tras la formación del coágulo, se homogeneizó la mezcla mediante métodos mecánicos. Una vez que se llevó a cabo la homogeneización, se enfrió la preparación hasta una temperatura inferior a 10°C en 60 minutos. Tras esto, se envasó la composición. El enfriamiento final, normalmente hasta 5°C, tuvo lugar en una habitación fría, en la que los productos se mantuvieron hasta la caducidad.

Ejemplo 10

Preparación de un yogurt natural

Se preparó un producto de yogurt con cepas probióticas usando la siguiente fórmula:

50	Leche 3,1% de grasa; 3,2% de proteína	987 g/kg
55	Leche en polvo desnatada	13 g/kg
	Iniciador	0,1 g/kg
60	Cepa probiótica (10^{12} ufc/g)	0,1 g/kg

Los contenidos en sólidos secos y en grasa de la leche se normalizaron según la formulación descrita anteriormente. Se homogeneizó la leche a 20-25 Mpa y 65-70°C para obtener propiedades físicas óptimas en el producto y se realizó un tratamiento con calor a 90-95°C y un tiempo de espera de aproximadamente 5 minutos que puede desnaturalizar aproximadamente el 70-80% de las proteínas del suero. Tras la pasteurización, se enfrió la leche hasta 40-45°C y se dosificaron los cultivos iniciador y probiótico en la corriente de leche a medida que se bombeaban desde un tanque de almacenamiento intermedio hasta la máquina de llenado. Tras el envasado en la máquina de llenado, los envases, tras el embalaje y paletización, se transportaron en el sistema para la incubación y el enfriamiento. Tras eso, se fermentaron

ES 2 311 729 T3

los palets llenos en la habitación de incubación a 40-45°C durante 5-6 horas hasta que se alcanzó un pH de 4,5. El enfriamiento de los paquetes se realizó rápidamente obteniendo una temperatura de 12-15°C en 55-70 minutos. El enfriamiento final, hasta 5°C, tuvo lugar en el almacén frío.

5 Ejemplo 11

Preparación de un preparado para lactantes en polvo

Se preparó un preparado para lactantes con cepas probióticas usando la siguiente fórmula:

10	Suero desmineralizado	512 g/kg
	Oleína de palma	135 g/kg
15	Lactosa	92 g/kg
	Leche desnatada	95 g/kg
	Aceite de colza	52 g/kg
20	Aceite de cacahuete	49 g/kg
	Aceite de girasol	28 g/kg
25	Agua	31 g/kg
	Premezcla de vitaminas	2 g/kg
	Premezcla de minerales	4 g/kg
30	Cepa probiótica (10^{12} ufc/g)	0,1 g/kg

A un tanque de combinación de tamaño apropiado con agitación y calentamiento, se le añadieron todos los ingredientes sólidos con la leche líquida y el agua en ausencia de vitaminas. Entonces, se mezclaron los aceites vegetales. Entonces se calentó la mezcla a 60-70°C y se emulsionó a través de un homogeneizador de fase única a de 6 a 7 MPa en ausencia de oxígeno. Tras la emulsificación, se normalizó la mezcla mediante la adición de vitaminas y se ajustó el pH en el intervalo de aproximadamente 6,7 a 7,2. Entonces, se volvió a calentar la mezcla hasta entre aproximadamente 65°C y 70°C. Finalmente, se secó el producto en un secador por pulverización para obtener un producto en polvo seco final. Finalmente, se mezcló en seco la cepa probiótica (10^{12} ufc/g) (0,1 g/kg) con el producto en polvo seco final y se envasó.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para la selección de cepas microbianas probióticas, que comprende las siguientes etapas:

- a. seleccionar cepas no patógenas que pueden sobrevivir en la leche materna y/o el líquido amniótico, y
- b. seleccionar cepas no patógenas que pueden transferirse a la leche materna y/o el líquido amniótico tras la ingesta oral en individuos sanos sin colonizar otros órganos internos excepto mucosas.

2. Método según la reivindicación 1, en el que tanto la leche materna como el líquido amniótico son de fuentes humanas.

3. Método según la reivindicación 2, en el que las cepas probióticas sometidas a prueba son cualquier bacteria del ácido láctico seleccionada de los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.

4. Método según la reivindicación 3, en el que las cepas probióticas sometidas a prueba se habían obtenido previamente de: leche materna, heces de bebés amamantados o líquido amniótico.

5. Método según la reivindicación 4, en el que las cepas sometidas a prueba se habían obtenido de muestras humanas.

6. Cepa de bacteria depositada en la CECT con el nº de registro 5711 (*Lactobacillus coryniformis*).

7. Cepa de bacteria depositada en la CECT con el nº de registro 5713 (*Lactobacillus salivarius subsp. salivarius*).

8. Cepa de bacteria depositada en la CECT con el nº de registro 5714 (*Lactobacillus gasseri*, anteriormente *L. acidophilus*).

9. Cepa de bacteria depositada en la CECT con el nº de registro 5715 (*Lactobacillus gasseri*).

10. Cepa de bacteria depositada en la CECT con el nº de registro 5716 (*Lactobacillus fermentum*).

11. Cultivo biológicamente puro de una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 6-10.

12. Composición que comprende al menos una de las cepas bacterianas definidas en las reivindicaciones 6 a 10, en la que la composición comprende preferiblemente desde 2 hasta 6 cepas, más preferiblemente desde 2 hasta 4 cepas, lo más preferiblemente desde 2 hasta 3 cepas, y en la que cada una de las cepas está presente en la composición en una proporción de desde el 0,1% hasta el 99,9%, preferiblemente desde el 1% hasta el 99%, más preferiblemente desde el 10% hasta el 90%.

13. Composición que comprende al menos una de las cepas bacterianas definidas en las reivindicaciones 6 a 10 junto con otra cepa o mezcla de cepas, en la que la mezcla comprende preferiblemente desde 2 hasta 6 cepas, más preferiblemente desde 2 hasta 4 cepas, lo más preferiblemente desde 2 hasta 3 cepas y en la que cada una de las cepas está presente en la composición en una proporción de desde el 0,1% hasta el 99,9%, preferiblemente desde el 1% hasta el 99%, más preferiblemente desde el 10% hasta el 90%.

14. Composición que comprende una cepa como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 o una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 en forma liofilizada.

15. Composición que comprende una cepa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 o una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 en forma congelada.

16. Composición que comprende una cepa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 o una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 en forma inactivada o muerta.

17. Producto alimenticio que comprende material de soporte y al menos una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, un cultivo, una composición o un producto según las reivindicaciones 11 y 12 a 16.

18. Producto según la reivindicación 17, en el que el material de soporte es una composición alimenticia seleccionada de leche, yogurt, cuajada, queso, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, productos fermentados a base de carne, productos a base de cereales fermentados, polvos a base de leche, polvos a base de cereal, preparados para lactantes, preparado de nutrición clínica, helados, zumos, harinas, pan, pasteles, azúcar, caramelos o chicles.

19. Producto según la reivindicación 17, en el que la cepa microbiana según las reivindicaciones 6 a 10 está contenida en el material de soporte en una cantidad de desde aproximadamente 10^5 ufc/g hasta aproximadamente 10^{12} ufc/g de material de soporte, preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{11} ufc/g

ES 2 311 729 T3

de material de soporte, más preferiblemente desde aproximadamente 10^6 ufc/g hasta aproximadamente 10^{10} ufc/g de material de soporte.

5 20. Composición farmacéutica que comprende al menos una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, un cultivo, una composición o un producto según las reivindicaciones 11 y 12 a 19 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 21. Composición farmacéutica según la reivindicación 20, en la que las cepas microbianas están contenidas en una cantidad de desde 10^5 ufc/g hasta 10^{14} ufc/g de material de soporte, preferiblemente desde 10^6 ufc/g hasta 10^{13} ufc/g de material de soporte, más preferiblemente desde 10^7 ufc/g hasta 10^{12} ufc/g de material de soporte.

22. Cepa de bacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, un cultivo, una composición o un producto según las reivindicaciones 11 y 12 a 19 para tratamiento terapéutico o profiláctico.

15 23. Composición según la reivindicación 22, para administración tópica, oral, ocular, nasal, enteral, urogenital, vaginal o rectal.

20 24. Composición según la reivindicación 22, diseñada para administrarse a mujeres embarazadas para el tratamiento terapéutico o profiláctico de su feto.

25 25. Composición según la reivindicación 22, diseñada para administrarse a mujeres lactantes para el tratamiento terapéutico o profiláctico de sus bebés amamantados.

26. Uso de una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, un cultivo, una composición o un producto según las reivindicaciones 11 y 12 a 20 en la fabricación de un producto para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades en seres humanos o animales.

30 27. Uso según la reivindicación 26, para el tratamiento y/o la profilaxis de la infección crónica o aguda, o de la colonización microbiana no deseada, en el que la infección o colonización está provocada por parásitos, bacterias, levaduras, hongos o virus, de una superficie mucosa en un sujeto o animal que necesita el mismo, en el que la superficie mucosa se selecciona pero no se limita al grupo que consiste en la oral, nasofaríngea, respiratoria, gástrica, intestinal, urogenital y glandular.

35 28. Uso según la reivindicación 26, para el tratamiento y/o la profilaxis de niveles inmunitarios temporalmente deprimidos en individuos sometidos a estrés fisiológico.

40 29. Uso según la reivindicación 26, para la mejora de la barrera intestinal inmunitaria en un sujeto o animal que necesita la misma; para el tratamiento y/o la profilaxis de reacciones de hipersensibilidad reguladas por disminución frente a alimentos e intolerancia metabólica tal como: intolerancia a la lactosa; del estreñimiento y otros trastornos gastrointestinales; de trastornos inflamatorios o autoinmunitarios tales como: EII (enfermedad inflamatoria del intestino), colitis ulcerosa, artritis, aterosclerosis, esclerosis múltiple, psoriasis o sarcoidosis; y de crecimiento tumoral, metástasis y cáncer en un sujeto o animal que necesita el mismo.

45 30. Uso según la reivindicación 26, para el tratamiento y/o la profilaxis de trastornos alérgicos y asma en un sujeto o animal que necesita el mismo.

50 31. Uso según la reivindicación 26, para el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades neurodegenerativas en un individuo o animal que necesita el mismo, seleccionadas de, pero no limitadas a, el grupo que consiste en Parkinson, accidente cerebrovascular, Alzheimer, Huntington y demencia.

55

60

65

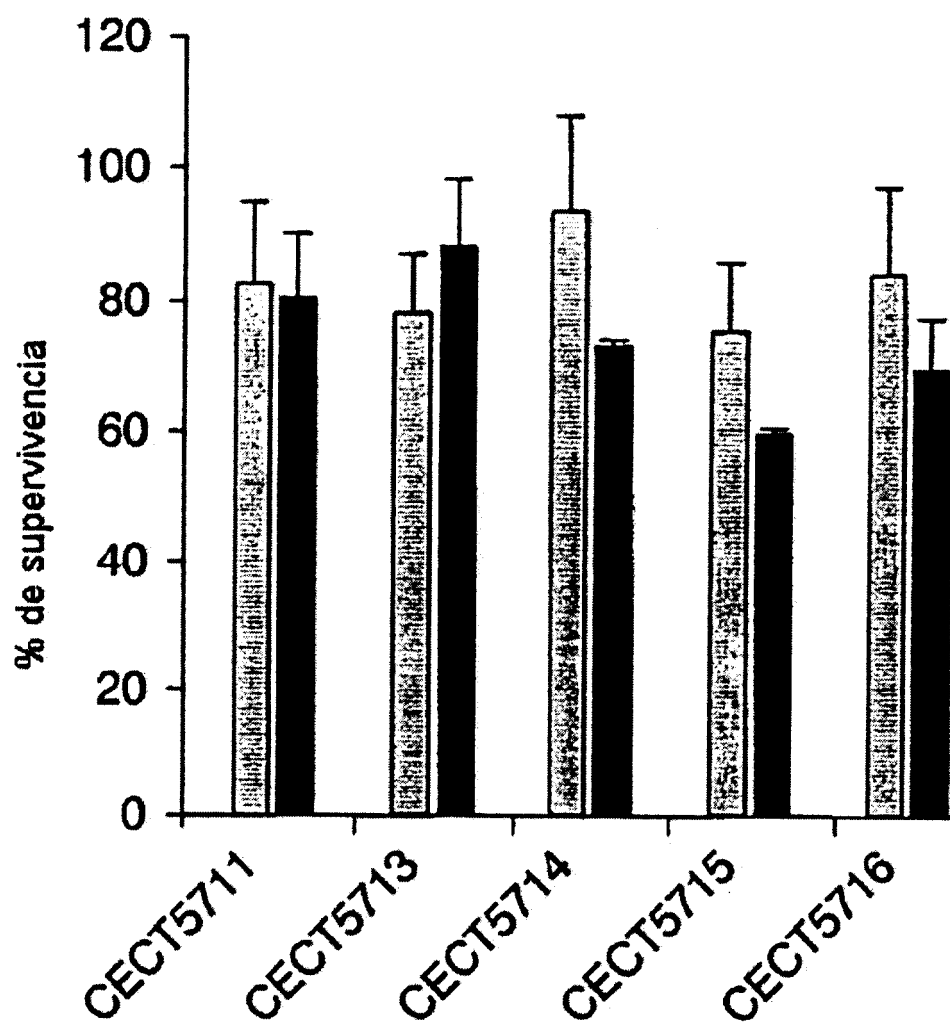


FIG. 1

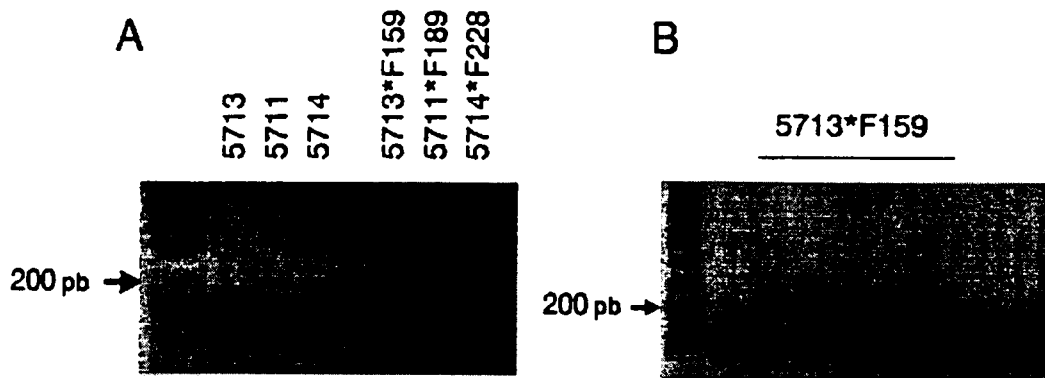


FIG.2

ArgDei

OPL5

CECT5711
CECT5713
CECT5714
CECT5715
CECT5716

CECT5711
CECT5713
CECT5714
CECT5715
CECT5716

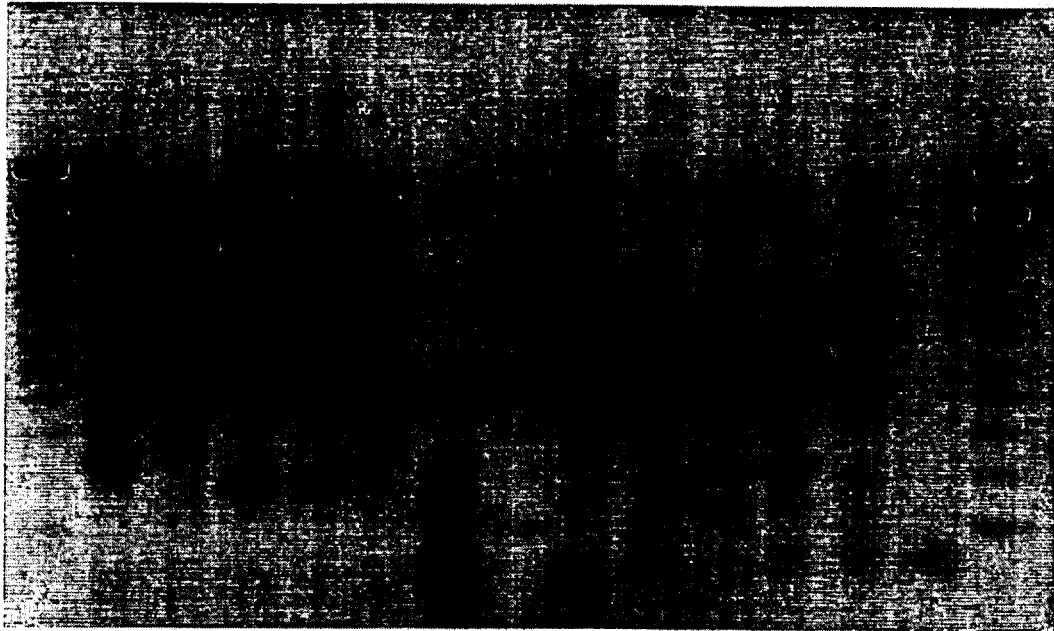


FIG.3

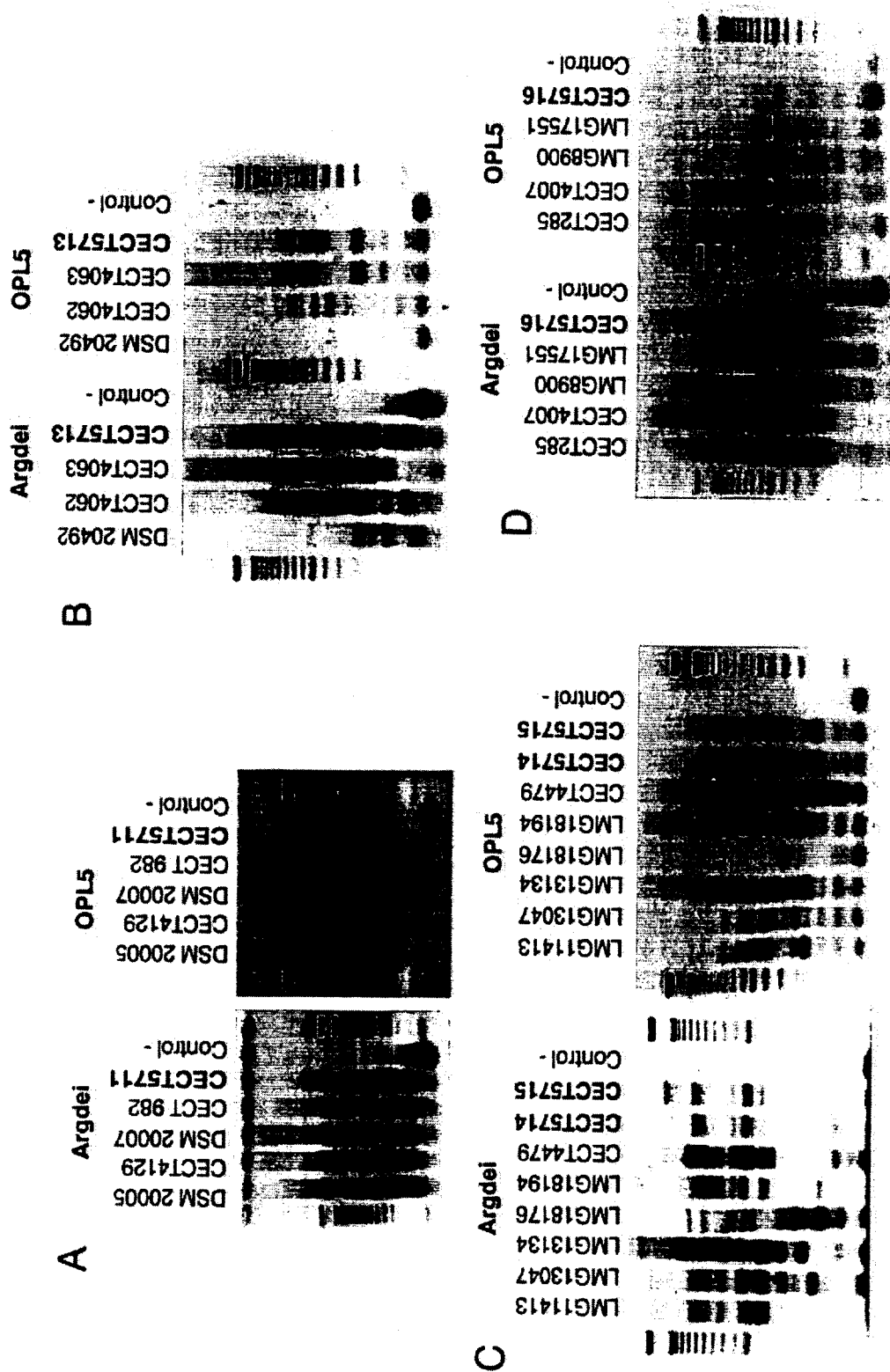


FIG.4

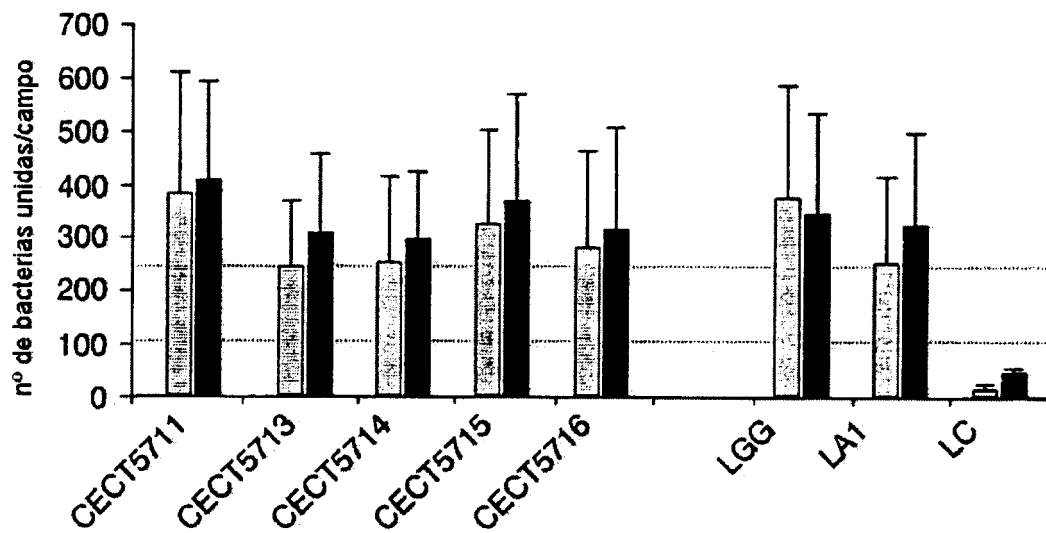


FIG.5

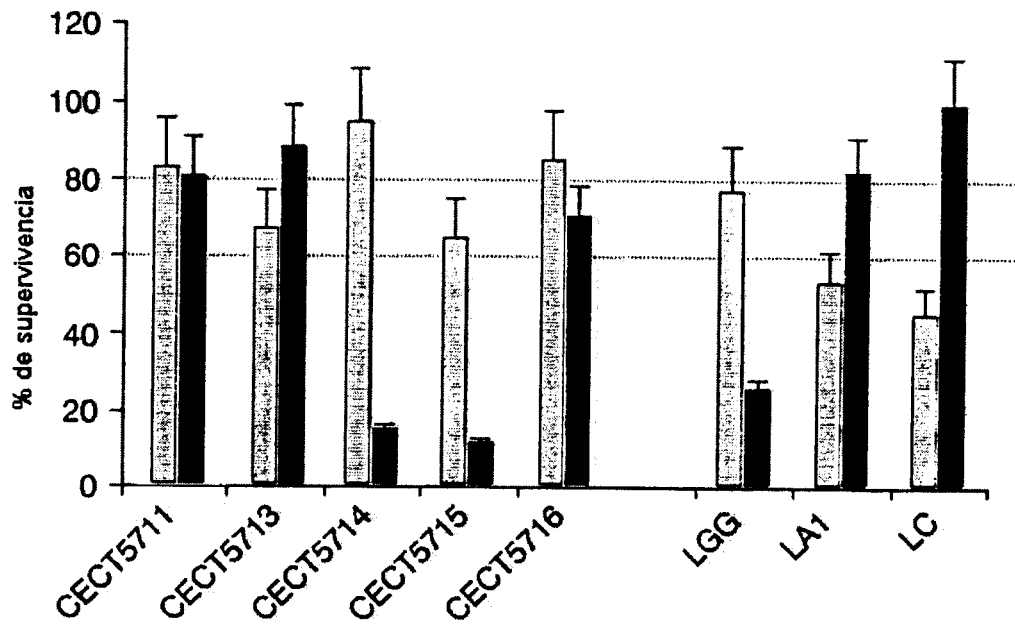


FIG.6

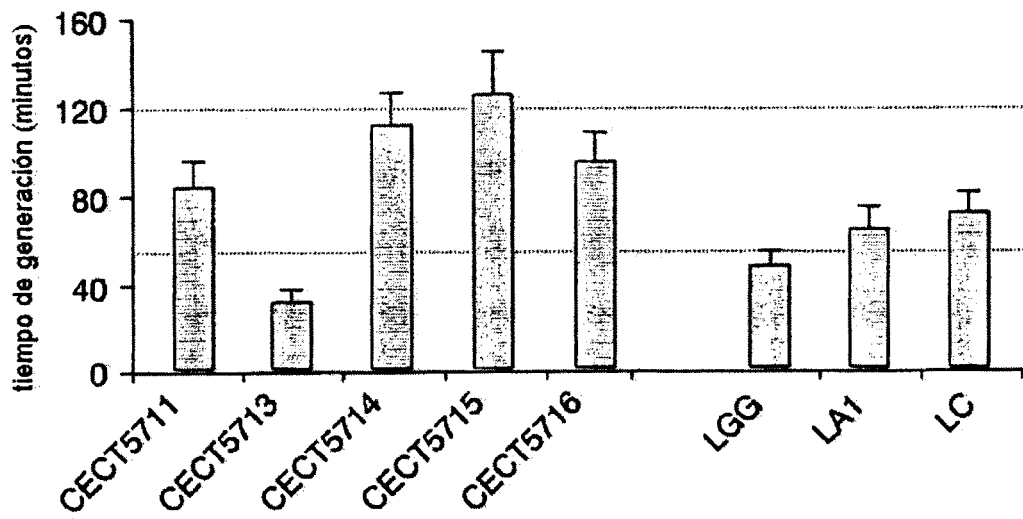
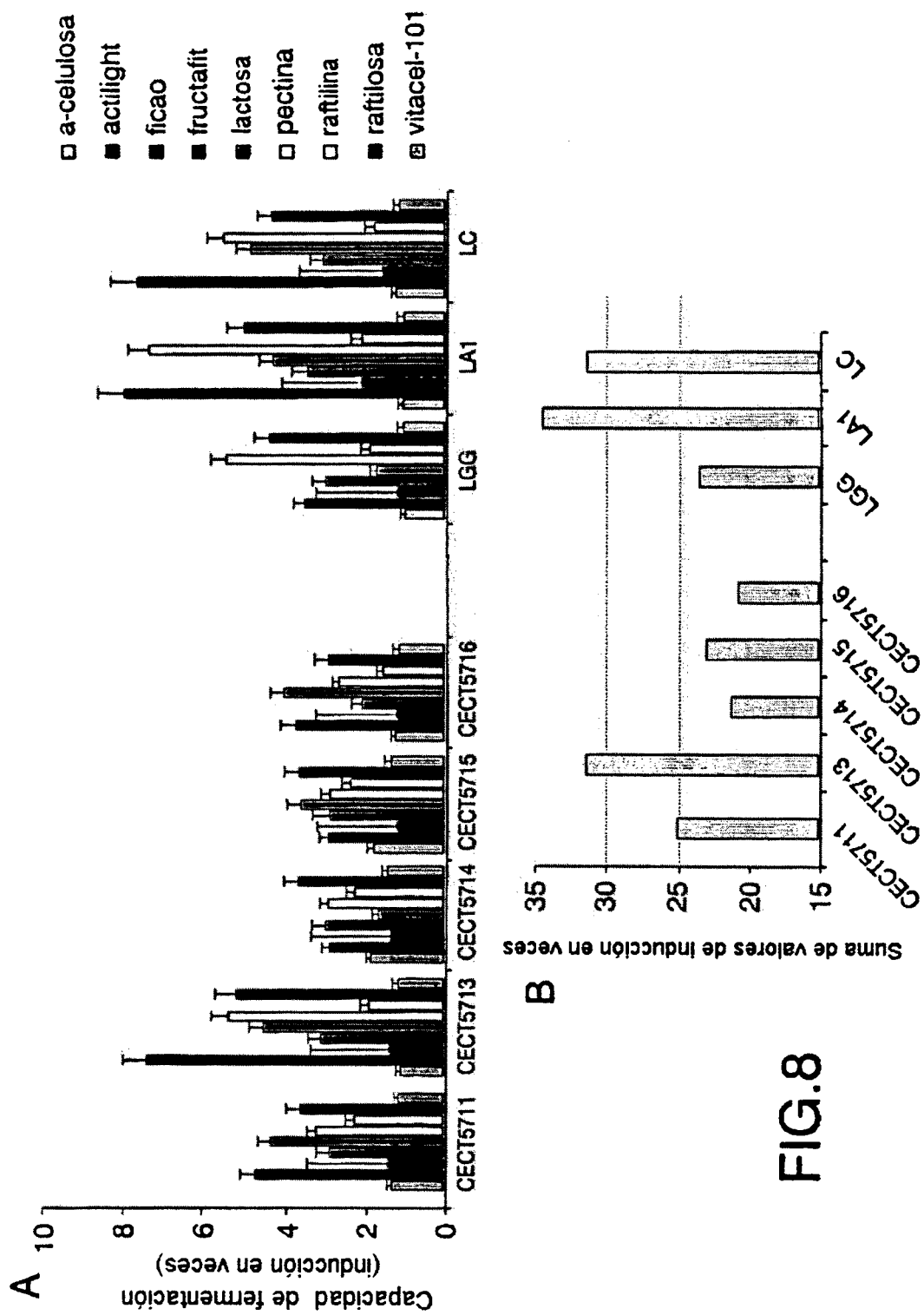


FIG.7



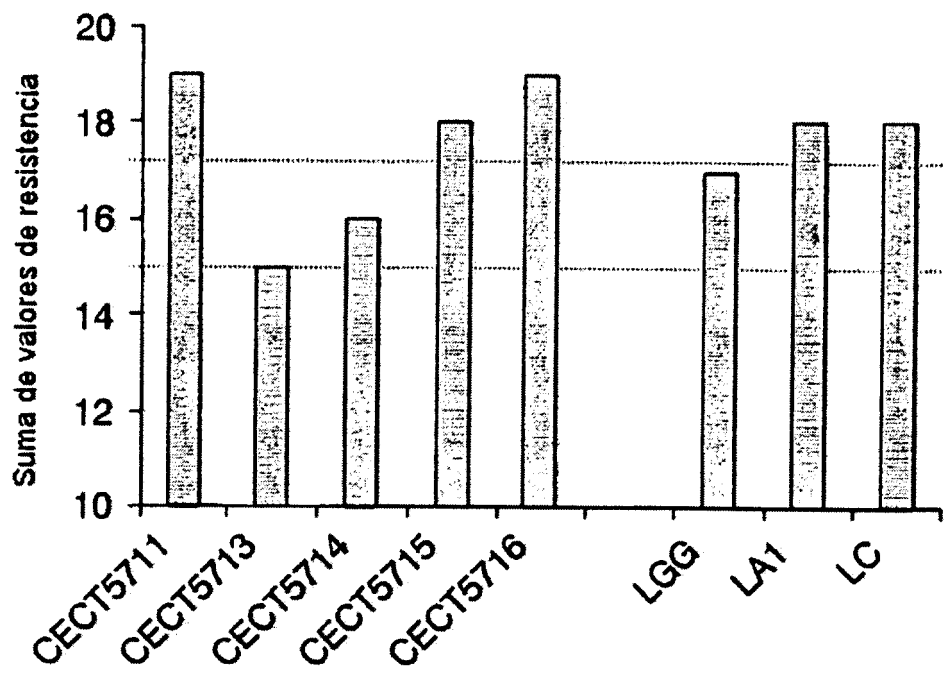


FIG.9

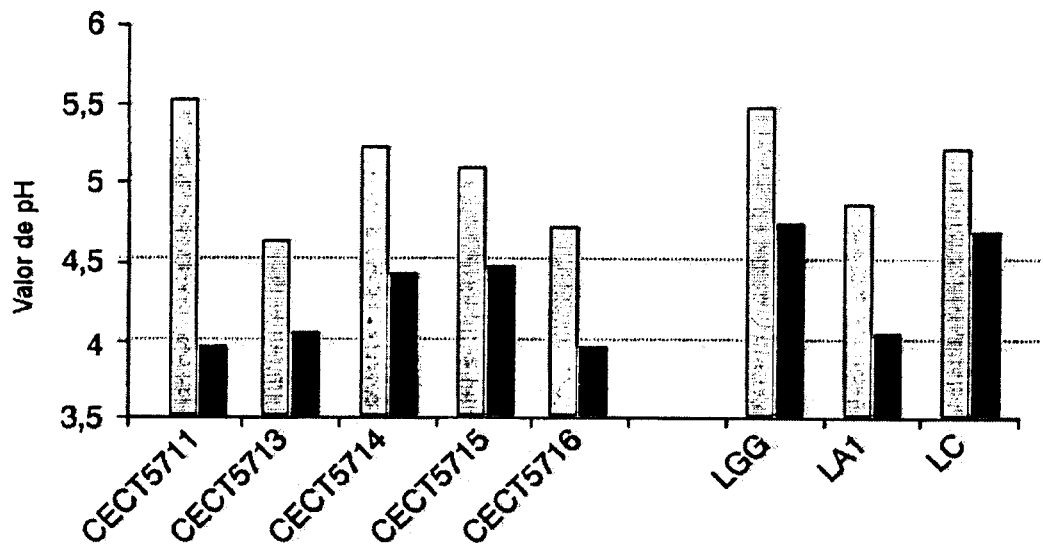


FIG.10

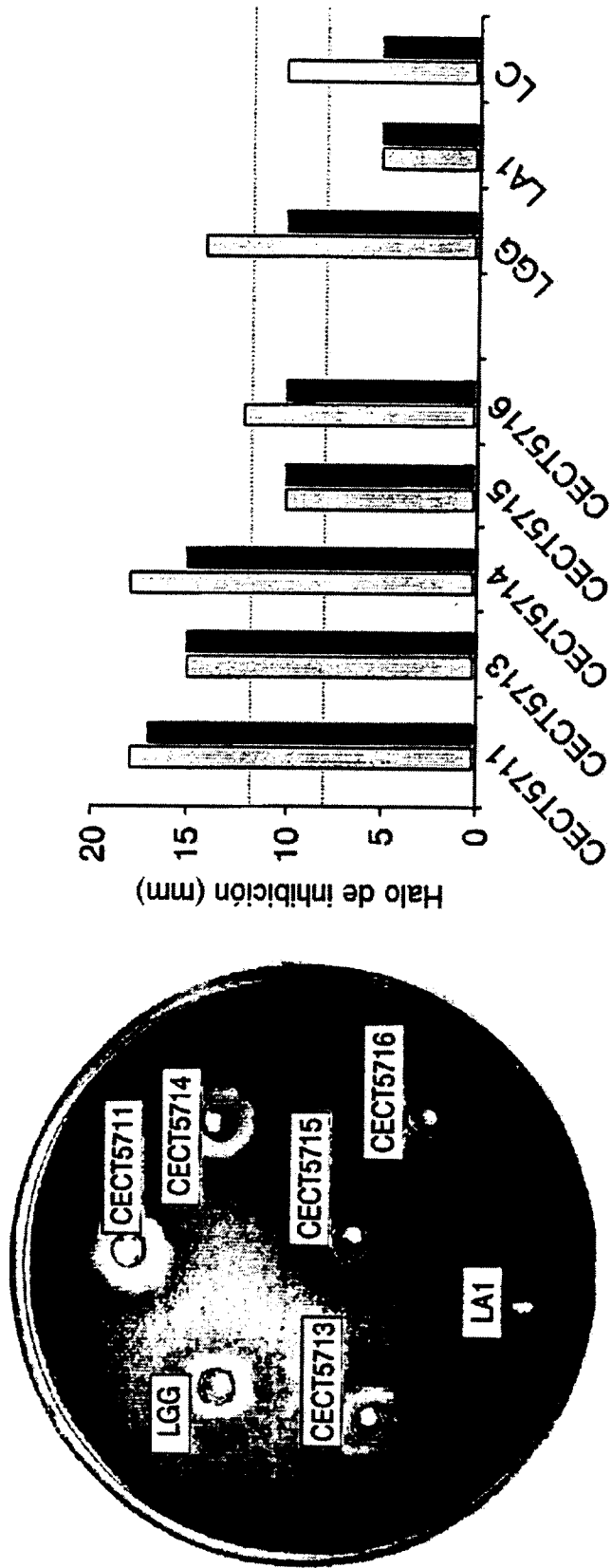


FIG.11

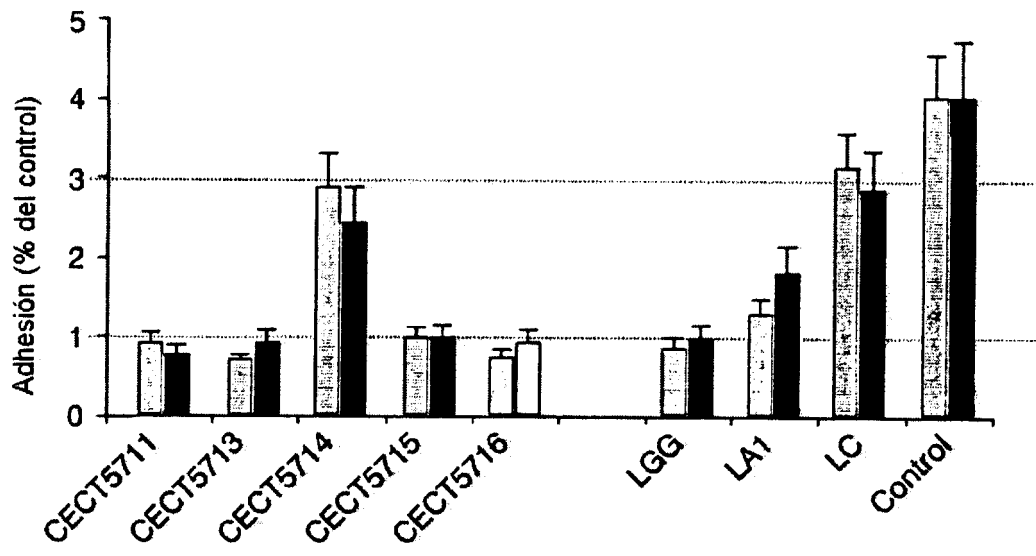


FIG.12

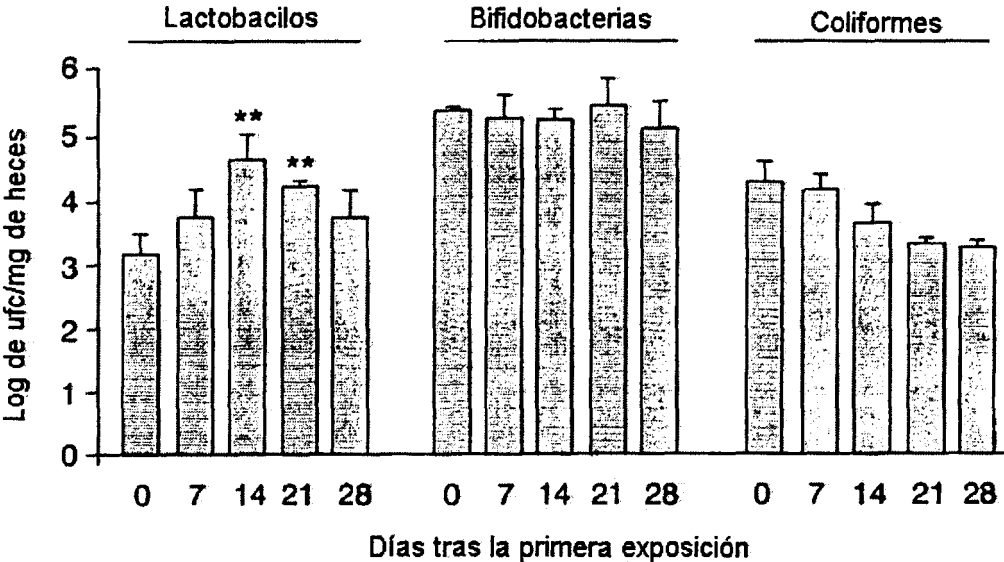


FIG.13

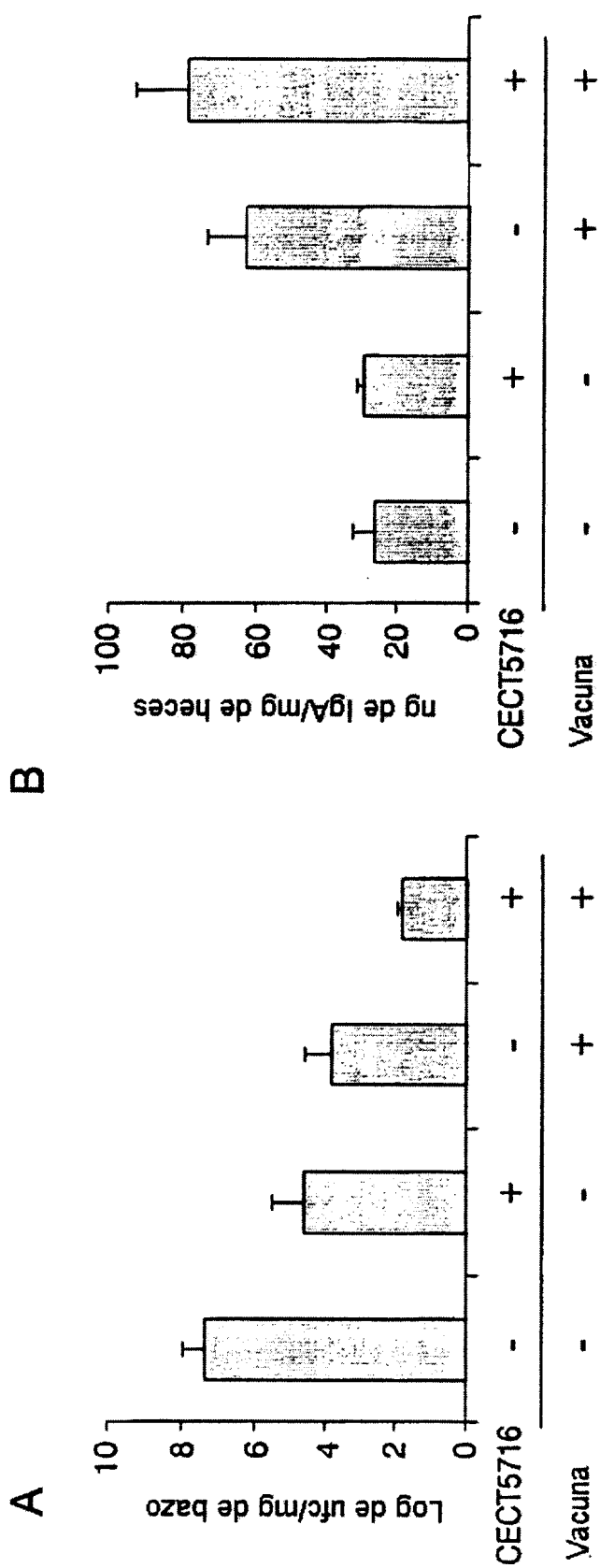


FIG.14

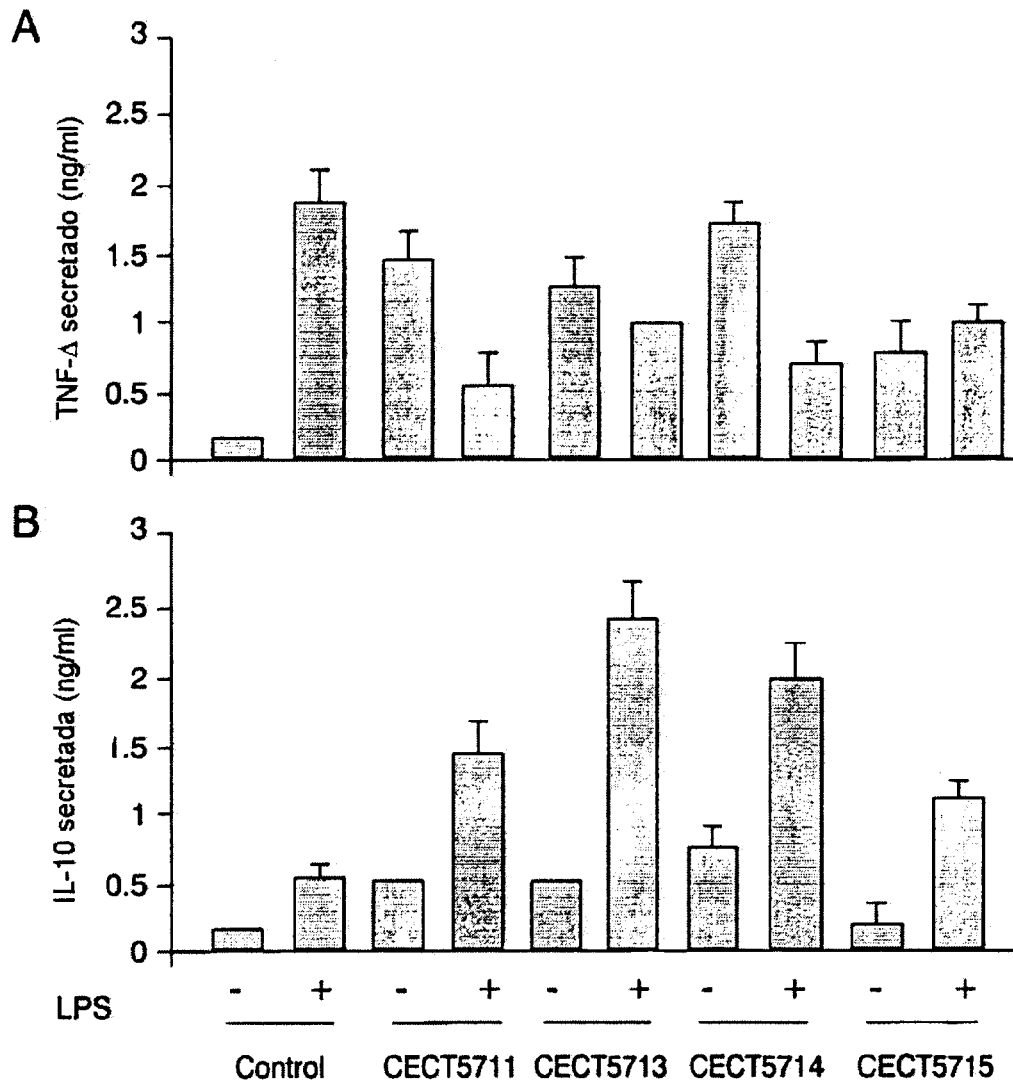


FIG.15

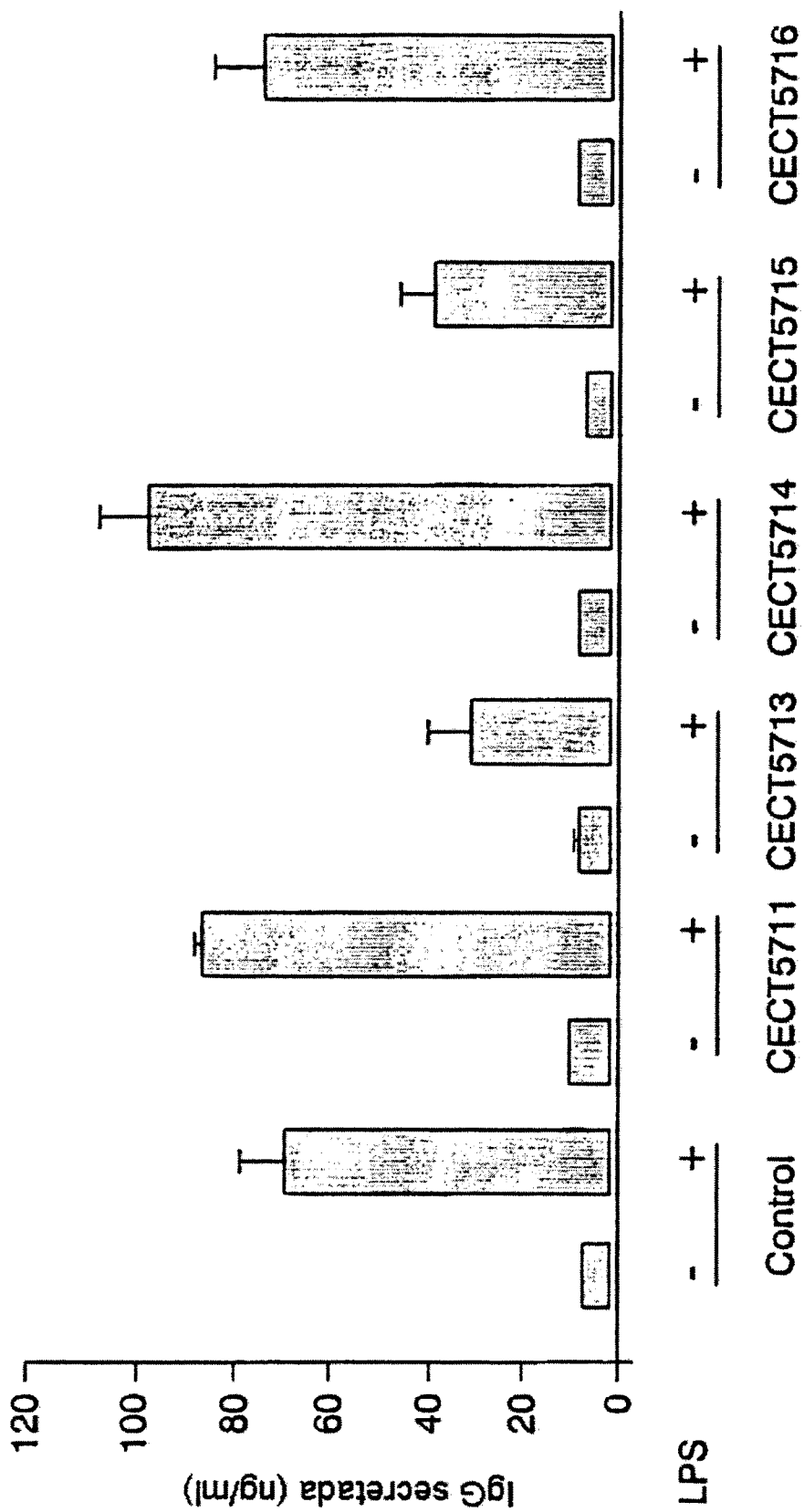


FIG.16