



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 496**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A23L 1/03 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04705562 .9**

96 Fecha de presentación : **27.01.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1587913**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.10.2005**

54

Título: **Nuevas cepas de bifidobacterium que tienen la capacidad para producir glutamina.**

30

Prioridad: **31.01.2003 SE 0300245**
14.02.2003 US 447274 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2011

73

Titular/es: **PROBI AB.**
Sölvegatan 41
223 70 Lünd, SE

72

Inventor/es: **Molin, Göran;**
Ahrn, Siv y
Jeppsson, Bengt

74

Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 362 496 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).

DESCRIPCION

Nuevas cepas de bifidobacterium que tienen la capacidad para producir glutamina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevas cepas de *Bifidobacterium infantis* que tiene la capacidad para producir glutamina y opcionalmente arginina *in vivo*.

10 **Antecedentes de la invención**

La glutamina es el aminoácido más abundante en el organismo. Es un “transportador de nitrógeno” entre tejidos y un combustible para enterocitos, colonocitos, linfocitos y células en proliferación. La función del intestino está deteriorada en pacientes con deficiencia de glutamina, particularmente debido a la pérdida de protección frente a la translocación de bacterias y/o endotoxina desde la luz intestinal hacia la circulación portal. El agotamiento de glutamina se produce en pacientes críticamente enfermos y lesionados, y puede contribuir a la alta tasa de infección y agotamiento muscular.

La administración enteral de glutamina ha conferido efectos beneficiosos para la salud en pacientes con indicaciones diferentes. En pacientes en la unidad de cuidados intensivos con disfunción orgánica múltiple, la administración de glutamina redujo las complicaciones infecciosas en los pacientes (Houdijk *et al.*, Lancet, 352:772-776, 1998). Se observaron efectos similares en pacientes que se sometieron a trasplante de médula ósea que recibieron nutrición parenteral complementada con glutamina (Ziegler *et al.*, Annals Internal Medicine, 116:821-828, 1992). Otro ejemplo son los pacientes con síndrome del intestino corto, que tuvieron una mejora sustancial de su capacidad de absorción tras la complementación con glutamina (Byrne *et al.*, Annals of Surgery, 222:243-255, 1995). Se ha demostrado también que la complementación con glutamina oral durante y tras la quimioterapia reduce significativamente tanto la duración como la gravedad de la estomatitis asociada a quimioterapia. Se concluyó que la glutamina oral parecía ser una medida simple y útil para aumentar la comodidad de muchos pacientes en alto riesgo de desarrollar úlceras bucales como consecuencia de quimioterapia contra el cáncer intensiva (Anderson *et al.*, Cancer 1998; 83:1433-9). La complementación nutricional de glutamina tras el ejercicio intenso ha reducido también la incidencia de infecciones, particularmente de infecciones del tracto respiratorio superior (Castell, Amino acids 2001; 20(1):49-61). Sin embargo, no se ha establecido aún el efecto preciso de glutamina sobre la inmunodepresión.

Una dificultad técnica importante con glutamina es que durante el procesamiento y almacenamiento, la glutamina se convierte fácilmente en ácido glutámico (glutamato), es decir la glutamina es un compuesto relativamente inestable que es difícil de incorporar en fórmulas destinadas para la administración oral. Además, la glutamina administrada por vía oral se convertirá en el entorno ácido del estómago hasta un alto grado en ácido glutámico y nunca alcanzará el intestino y no será absorbida como glutamina.

La arginina potencia la función inmunitaria y promueve la cicatrización de heridas. La administración de arginina se ha usado en pacientes postoperatorios y pacientes en cuidados intensivos. En la mayoría de estudios clínicos se ha administrado arginina junto con otras sustancias tal como ARN y aceite de pescado. Existen indicaciones de que la administración de arginina modula la respuesta inmunitaria postoperatoria. Daly, John E., *et al.*, Surgery 112:55-67, 1992 demuestran que la nutrición enteral con complemento de arginina, ARN y ácidos grasos omega-3 en pacientes tras la operación mejora la defensa inmunitaria a través de diferentes mecanismos. La arginina reduce las complicaciones en pacientes que se someten a quimiorradiación y cirugía (Tepaske *et al.*, 2001; Lancet 358: 696-701), y reduce la duración de permanencia para pacientes en la unidad de cuidados intensivos (Bauer *et al.*, 1995, Critical Case Medicine 23: 436-449).

Un aumento de la supervivencia pudo observarse en animales alimentados con una dieta complementada con arginina. Los recuentos de colonias cuantitativos y el porcentaje calculado de bacterias que seguían siendo viables mostraron que la capacidad para destruir organismos translocados estaba potenciada significativamente en animales que recibieron arginina (Adawi, D., *et al.*, 1997, Hepatology 25: 642-647).

Las cepas de *Bifidobacterium spp.*, es decir bifidobacterias, están presentes con frecuencia en números altos en el colon humano, especialmente en bebés alimentados con leche materna. Las bacterias de *Bifidobacterium spp.* están consideradas como probióticos, es decir bacterias vivas que tras la ingestión proporcionan efectos beneficiosos para la salud al huésped. Se ha reivindicado que el alto número de *Bifidobacterium spp.* en el colon tiene efectos beneficiosos para la salud. Sin embargo, el curso de acción de dichos efectos beneficiosos es desconocido en gran medida.

Técnica anterior

5 Matteuzzi *et al.* [Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1978;129 B, 175-181] investigaron un gran número de bifidobacterias de diferentes hábitats para determinar su capacidad para liberar aminoácidos libres en caldos de cultivo. Los datos obtenidos indicaban que varias especies de bifidobacterias podían sintetizar todos los aminoácidos necesarios para el crecimiento y también para liberar dichos compuestos en los caldos de cultivo. Se encontró que *B. thermophilum*, *B. bifidum* y *B. adolescentis* eran los mejores productores, y los aminoácidos más comúnmente encontrados en los caldos de cultivo fueron principalmente alanina, valina y ácido aspártico. Se especuló que *Bifidobacterium spp.* desempeña un papel en el metabolismo de aminoácidos del tracto gastrointestinal (véase también Toshihiro Yano *et al.*, Database CAPLUS [Online], AN 1991:554686; US-B1-6 203 797; US-B1-6 468 525; US 2002 006 432 A1; Masayuki Hatanaka *et al.*, Agric. Biol. Chem. 51(1):251-252, 1987).

15 El documento WO 01/83700 (Universidad de Maryland) da a conocer una composición y un método para tratar y prevenir la lesión gastrointestinal, enterocolitis necrosante neonatal (ECN) y septicemia bacteriana. La composición incluye una combinación de bacterias Gram (+), en particular *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y glutamina, y deben administrarse por vía oral o por vía naso-oral. Se dice que la composición bloquea la translocación de agentes bacterianos tales como bacterias Gram (-).

20 La glutamina administrada por vía intravenosa es muy eficaz pero cara y complicada. Un mejor modo para administrar glutamina sería, desde luego, usar una cepa bacteriana que tuviera la capacidad para producir cantidades sustanciales de glutamina en el intestino. Hasta ahora, sin embargo, no se han descrito tales cepas.

Sumario de la invención

25 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que cepas específicas de *Bifidobacterium infantis* pueden producir glutamina en un medio de crecimiento que imita el entorno en el colon humano. Dichas cepas pueden usarse, por tanto, para producir glutamina *in vivo* tras la administración oral o enteral a un mamífero, especialmente un ser humano. Algunas de las cepas también puede producir arginina.

Breve descripción de los dibujos

35 La figura 1 es una representación esquemática de los patrones electroforéticos obtenidos con polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PLFR) para las cepas CURE 19, CURE 21, CURE 26, CURE 28 y CURE 29, obtenidas mediante escisión de ADN cromosómico con EcoRI y Hind III, respectivamente, seguido de hibridación con una sonda de fragmento de 420 pb marcada con DIG (posición 506 a 926, numeración de *E. coli*) del gen de ARNr 16S de *L. casei* subespecie *pseudoplantarum* DSM 20008 usando hibridación con transferencia tipo Southern. Se usaron como patrones el marcador II de ADN de peso molecular marcado con Dig (Roche) y el marcador VI de ADN de peso molecular (Roche).

40 La figura 2 muestra una fotografía de fragmentos de ADN separados obtenidos mediante escisión de ADN cromosómico de cepas CURE 19 (carril 1), CURE 29 (carril 2) y CURE 28 (carril 3) con la enzima de restricción EcoRI (análisis de endonucleasas de restricción, AER). Se usaron como patrones el marcador de ADN de alto peso molecular (BRL) y el marcador VI de peso molecular de ADN (Roche) (carril 4).

45 La figura 3 muestra una fotografía de fragmentos de ADN separados obtenidos mediante escisión de ADN cromosómico de cepas CURE 19 (carril 2), CURE 28 (carril 3) y CURE 29 (carril 4) con la enzima de restricción Hind III. Se usaron como patrones el marcador de ADN de alto peso molecular (BRL) y el marcador VI de peso molecular de ADN (Roche) (carriles 1 y 5).

50 La figura 4 muestra una fotografía de fragmentos de ADN separados obtenidos mediante escisión de ADN cromosómico de cepas CURE 21 (carril 1) y CURE 26 (carril 2) con la enzima de restricción EcoRI. Se usaron como patrones el marcador de ADN de alto peso molecular (MD, EE.UU.) y el marcador VI de peso molecular de ADN (Roche) (carril 3).

55 La figura 5 muestra una fotografía de fragmentos de ADN separados obtenidos mediante escisión de ADN cromosómico de cepas CURE 21 (carril 2) y CURE 26 (carril 3) con la enzima de restricción Hind III. Se usaron como patrones el marcador de ADN de alto peso molecular (MD, EE.UU.) y el marcador VI de peso molecular de ADN (Roche) (carriles 1 y 4).

60 La figura 6. Índice de actividad de la enfermedad el día 4, 5, 6 y 7. * significa $p < 0,05$ en comparación con el control de colitis, \square significa $p < 0,05$ en comparación con *L. gasseri*, # significa $p < 0,05$ en comparación con *L. paracasiae*.

Descripción de la invención

5 La invención tal como se define en las reivindicaciones se refiere a una cepa de *Bifidobacterium infantis* que tiene la capacidad para sobrevivir en el tracto intestinal y para producir glutamina *in vivo*. Especialmente se produce glutamina en el colon humano. En este contexto, sobrevivir significa que las cepas bacterianas se han aislado en ocasiones de muestreo diferentes en heces de un individuo. Así, las bacterias crecen y sobreviven obviamente durante un tiempo. Las cepas de bifidobacterias de la invención pueden crecer en medios nutrientes que tienen un pH inferior a 7, especialmente 5,5-6,5. El agar Rogosa es un ejemplo de un medio de este tipo, otro es MRS.

10 Según un aspecto preferido, las nuevas cepas también tienen la capacidad para asimilar amoníaco.

15 Las cepas de la invención son *Bifidobacterium infantis* CURE 19 (DSM 15158); *Bifidobacterium infantis* CURE 21 (DSM 15159); *Bifidobacterium infantis* CURE 26 (DSM 15160); *Bifidobacterium infantis* CURE 28 (DSM 15161); *Bifidobacterium infantis* CURE 29 (DSM 15162), depositadas en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y cultivos celulares) el 23 de agosto de 2002.

20 Según un aspecto preferido dicha cepa puede producir glutamina sin reducir el ácido glutámico.

La invención se refiere especialmente a las cepas *Bifidobacterium infantis* CURE 21 y *Bifidobacterium infantis* CURE 26, que se depositaron en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 23 de agosto de 2002 y se les dio los números de acceso DSM 15159 y DSM 15160, respectivamente, o variantes de las mismas. Dichas cepas pueden producir glutamina sin reducir el ácido glutámico.

25 Según un aspecto preferido, dicha cepa tiene la capacidad para producir arginina.

30 La invención también se refiere especialmente a las siguientes cepas, que se han depositado todas en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH el 23 de agosto de 2002, y se les dio un número de depósito, es decir *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161, y *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, y a variantes de las mismas. Dichas cepas pueden producir además de glutamina también arginina.

35 Las nuevas cepas se han aislado de heces de niños pequeños y se han seleccionado mediante cultivo en agar a un pH inferior a 7. Las cepas se han caracterizado posteriormente mediante ribotipado y AER.

40 Otro objeto de la invención es una composición que comprende una o más cepas de *Bifidobacterium infantis* de la invención en combinación con un vehículo. Ciertos ejemplos de vehículos son gachas de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, inulina, lactulosa, fructo-oligosacáridos, almidón resistente, β -glucanos y goma guar. Con el fin de mejorar la proliferación de las bifidobacterias y aumentar la producción de glutamina y arginina, respectivamente, y potenciar la asimilación de amoníaco en el colon, deberían añadirse fibras dietéticas a la composición. Las fibras dietéticas son por ejemplo inulina, fructo-oligosacáridos, maltodextrinas, β -glucanos y goma guar. Así, la invención también se refiere a una composición tal como se describe que comprende además fibras dietéticas.

45 Las composiciones de la invención, tales como suspensiones, comprimidos, cápsulas, polvos, pueden administrarse por vía oral. También pueden administrarse como un enema.

50 La composición de la invención puede ser una composición alimenticia en la que el vehículo es un producto alimenticio. Las cepas de *Bifidobacterium* que producen glutamina pueden administrarse a niños pequeños, personas ancianas, deportistas y consumidores ordinarios que desean mantenerse en forma para mejorar la función muscular y evitar la depresión inmunitaria después del ejercicio. Las cepas de *Bifidobacterium* que producen arginina pueden administrarse a consumidores ordinarios que quieren mantenerse en forma y evitar la influencia negativa sobre la función inmunitaria.

55 Según un aspecto especial, la composición de la invención puede comprender también una o más cepas de *Lactobacillus*.

60 Además de los efectos beneficiosos opcionales de los lactobacilos en sí, dichas bacterias pueden proteger a las bifidobacterias de la influencia nociva de oxígeno.

Según otro aspecto, la invención se refiere a una o más cepas que pertenecen a la especie de *Bifidobacterium infantis* para su uso en terapia.

5 La presente descripción se refiere al uso de una o más de las cepas *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158; *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159; *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160; *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161; *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162; o una variante de las mismas para la preparación de un fármaco para el tratamiento de pacientes en cuidados intensivos con disfunción orgánica múltiple e insuficiencia intestinal, para la profilaxis en pacientes de quimioterapia y pacientes con enfermedades inflamatorias y administración postoperatoria tras cirugía mayor.

Parte experimental

10 Aislamiento de cepas

15 Se aislaron todas las cepas de heces de niños pequeños, de una semana a un año de edad. Se diluyeron en serie las muestras de heces en una disolución de dilución (un 0,9% [p/v] de NaCl, un 0,1% [p/v] de peptona, un 0,1% [p/v] de Tween 80, un 0,02% [p/v] de HCl de cisteína) y se extendieron en placas de agar Rogosa. Se seleccionaron aislados con respecto a su capacidad para crecer en agar Rogosa, pH 5,4, y se repitió el aislamiento de un individuo. Se recogieron los aislados de las placas de agar Rogosa tras la incubación a 37°C durante 72 horas. Se identificaron a nivel de género mediante PCR específica de género (Roy *et al.*, 2000; FEMS Microbiological Letters 191:17-24) y a nivel de especies mediante secuenciación de ADNr 16S (Pettersson *et al.*, 2002; Systematic and Applied Microbiology 23:332-336). Las cepas pudieron aislarse al menos dos veces del mismo individuo con de una a cuatro semanas entre los muestreos, lo que indica fuertemente que las cepas tenían una cierta capacidad para colonizar el tracto GI. Se identificaron las cepas mediante ribotipado, es decir polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, PLFR, del gen de ARNr 16S, y mediante AER, es decir análisis de endonucleasas de restricción

25 Se aislaron las siguientes cepas:

- 1) *Bifidobacterium infantis* CURE 19; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena hasta cierto grado, olor "agrio" tras la fermentación.
- 30 2) *Bifidobacterium* CURE 20; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena hasta cierto grado, olor "agrio" tras la fermentación.
- 35 3) *Bifidobacterium infantis* CURE 21; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena hasta cierto grado, olor "agrio" tras la fermentación.
- 40 4) *Bifidobacterium* CURE 22; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena hasta cierto grado, olor "agradable" tras la fermentación.
- 45 5) *Bifidobacterium* CURE 23; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena hasta cierto grado, olor "agradable" tras la fermentación.
- 50 6) *Bifidobacterium infantis* CURE 24; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena hasta cierto grado, olor "agradable" tras la fermentación.
- 7) *Bifidobacterium* CURE 25; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena.
- 8) *Bifidobacterium infantis* CURE 26; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena.
- 9) *Bifidobacterium dentium* CURE 27; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena.
- 10) *Bifidobacterium infantis* CURE 28; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena.
- 55 11) *Bifidobacterium infantis* CURE 29; que puede crecer en agar Rogosa y fermentar gachas de avena.
- 12) *Bifidobacterium infantis* CURE 30; que puede crecer en agar Rogosa fermentar gachas de avena.

60 Producción de glutamina

Se sometieron a prueba las cepas aisladas 1-12 para la determinar la producción de glutamina en caldo mediante el siguiente procedimiento.

5 Se cultivaron las cepas de prueba a 37°C durante 4 días en un medio de cultivo (caldo) modificado a partir del medio descrito por Matteuzzi *et al.* (Ann. Microbil. (Inst. Pasteur, 1978, 129 B: 175-181). El caldo estaba compuesto de: acetato de sodio, 10 g/l; ácido ascórbico, 10 g/l; sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), 5 g/l; hidrogenofosfato de dipotasio (K₂HPO₄), 3 g/l; dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄), 3 g/l; MgSO₄ x 7H₂O, 0,32 g/l; FeSO₄ x 7H₂O, 0,01 g/l; MnSO₄H₂O, 0,007 g/l; NaCl, 0,01 g/l; extracto de levadura, 0,5 g/l; glucosa, 20 g/l; Tween 80, 1 ml/l. Se ajustó el pH con NaOH 1 M a 6,18-6,24 antes de someter a autoclave.

10 La concentración de glutamina en el caldo se midió antes de la inoculación con bacterias y tras el crecimiento de la cepa de prueba. Tras el crecimiento, se centrifugó el cultivo y se esterilizó por filtración, y posteriormente se congeló el sobrenadante libre de células a -80°C. Se analizaron los aminoácidos en un analizador automatizado (Biochrom 20, Pharmacia Biotech) tras la adición de ácido sulfo-salicílico y ajuste de pH con hidróxido de litio.

15 El aumento de la concentración de glutamina y ácido glutámico en el caldo tras el crecimiento de diferentes cepas de prueba se muestra en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1. Aumento de la concentración de glutamina y reducción/producción de ácido glutámico en el caldo de cultivo tras el crecimiento de las cepas de *Bifidobacterium* de prueba.

Cepa de prueba	Glutamina (μmol/l)	Ácido glutámico [reducción (R), producción (P) en μmol/l]
<i>B. infantis</i> CURE 19	53 (29-67) #	R
<i>Bifidobacterium</i> CURE 20	4,2 (3,5-4,8)§	R
<i>B. infantis</i> CURE 21	37 (36-38)#	P37 (31-41)
<i>Bifidobacterium</i> CURE 22	16 (14-18)§	R
<i>Bifidobacterium</i> CURE 23	8,9 (8,1-9,6)§	R
<i>B. infantis</i> CURE 24	3,0 (0-5,9)§	R
<i>B. infantis</i> CURE 25	35	R
<i>B. infantis</i> CURE 26	36	P 60
<i>B. dentium</i> CURE 27	7,4	R
<i>B. infantis</i> CURE 28	35	R
<i>B. infantis</i> CURE 29	28	R
<i>B. infantis</i> CURE 30	37	R

El valor medio de tres muestras derivadas de tres cultivos separados

§ El valor medio de dos muestras derivadas de dos cultivos separados

20 Todas las cepas de prueba producían algo de glutamina pero sólo siete de las 12 cepas sometidas a prueba tenían una producción relativamente grande de glutamina (>20 μmol/l). Para todas excepto dos cepas (CURE 21 y CURE 26), el aumento de glutamina se produjo junto con una fuerte reducción de ácido glutámico en el medio. El medio al que no se añadió ninguna bacteria tenía una concentración de inicio promedio de ácido glutámico de 223 μmol/l, mientras que el contenido de glutamina era cero. Las tres cepas CURE 20, CURE 23 y CURE 24 consumieron todo el ácido glutámico disponible en el medio mientras que CURE 28 redujo la concentración de ácido glutámico con 247 μmol/l, CURE 29 con 220 μmol/l, CURE 22 con 187 μmol/l, CURE 19 con 128 μmol/l, CURE 30 con 160 μmol/l, CURE 27 con 151 μmol/l, y CURE 25 con 47 μmol/l. Puede especularse si estas bacterias convierten el ácido glutámico en glutamina. Dos cepas, CURE 21 y CURE 26, producían glutamina sin ninguna reducción de la concentración de ácido glutámico en el medio. Al contrario de las otras cepas, aumentaron el nivel de ácido glutámico en el caldo.

35 *Producción de arginina*

Se midió la producción de aminoácidos de cada cepa de prueba tras el crecimiento de la cepa de prueba a 37°C durante 4 días en un medio de crecimiento (caldo) modificado a partir del medio descrito por Matteuzzi *et al.* (1978). El caldo estaba compuesto de: acetato de sodio, 10 g/l; ácido ascórbico, 10 g/l; sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), 5 g/l; hidrogenofosfato de dipotasio (K₂HPO₄), 3 g/l; dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄), 3 g/l; MgSO₄ x 7H₂O, 0,32 g/l; FeSO₄ x 7H₂O, 0,01 g/l; MnSO₄H₂O, 0,007 g/l; NaCl, 0,01 g/l; extracto de levadura, 0,5 g/l; glucosa, 20 g/l; Tween 80, 1 ml/l. Se ajustó el pH con NaOH 1 M a 6,18-6,24 antes de someter a autoclave.

45 La concentración de aminoácidos en el caldo se midió antes de la inoculación con bacterias y tras el crecimiento de la cepa de prueba. Tras el crecimiento, se centrifugó el cultivo y se esterilizó por filtración, y posteriormente se congeló el sobrenadante libre de células a -80°C. Se analizaron los aminoácidos en un analizador automatizado (Biochrom 20, Pharmacia Biotech) tras la adición de ácido sulfosalicílico y el ajuste de

pH con hidróxido de litio.

El aumento de la concentración de arginina y citrulina en el caldo tras el crecimiento de las diferentes cepas de prueba se muestra en la tabla 2.

5

Tabla 2. Aumento de la concentración de arginina y citrulina en el caldo tras el crecimiento de las cepas de prueba.

Cepa de prueba	Arginina ($\mu\text{mol/l}$)	Citrulina ($\mu\text{mol/l}$)
<i>B. infantis</i> CURE 19	11 (8,8-14) #	52(9,2-136)#
<i>Bifidobacterium</i> CURE 20	0§	4,1 (4,4-3,7)§
<i>B. infantis</i> CURE 21	0#	0#
<i>Bifidobacterium</i> CURE 22	0§	6,3 (5,8-6,7)§
<i>Bifidobacterium</i> CURE 23	2.0 (0-3.9)§	6,1 (5,4-6,8)
<i>B. infantis</i> CURE 24	0§	0§
<i>B. infantis</i> CURE 25	0	4,2
<i>B. infantis</i> CURE 26	2,6	0
<i>B. dentium</i> CURE 27	4,9	0,0
<i>B. infantis</i> CURE 28	37	202
<i>B. infantis</i> CURE 29	26	13
<i>B. infantis</i> CURE 30	2,0	5,7

El valor medio de tres muestras derivadas de tres cultivos separados
 § El valor medio de dos muestras derivadas de dos cultivos separados

10 Tres de las 12 cepas de prueba aumentaron la concentración de arginina con más de 10 $\mu\text{mol/l}$, es decir CURE 19 CURE 28 y CURE 29. Dos de dichas cepas también tenía una producción sorprendentemente fuerte de citrulina (>100 $\mu\text{mol/ml}$), es decir CURE 19 y CURE 28. Se produjo citrulina o bien mediante desaminación de arginina o a través de NO-sintasa y generación de NO. La producción de citrulina también refleja la producción de arginina en una etapa anterior.

15

Además otros aminoácidos penetraron en el caldo durante el crecimiento de las cepas de prueba, véase la tabla 3. CURE 21 no producía ni citrulina ni arginina pero sí cantidades significativas de ácido aspártico y tirosina. CURE 26 no producía citrulina pero sí cantidades muy pequeñas de arginina y un amplio espectro de aminoácidos diferentes. Además, CURE 26 era la única cepa de prueba que aumentó la concentración de prolina en el caldo. Todas las cepas de prueba producían treonina.

20

TABLA 3. Aumento de concentraciones de aminoácidos ($\mu\text{mol/l}$), además de glutamina, ácido glutámico, arginina y citrulina en el caldo tras el crecimiento de las cepas de prueba.

Cepa	Thr	Tyr	Cys	Asp	Ala	Gly	Ile
CURE19	39	15	0	23	15	0	0
CURE21	51	21	0	96	0	0	0
CURE26	46	46	12	151	61	0	6
CURE28	44	12	14	0	0	0	0
CURE29	35	28	0	0	2	0	0

Thr-treonina; Tyr-tirosina; Cys-cisteína; Asp-aspártico; Ala-alanina; Gly-glicina; Ile-isoleucina

25

Los valores representan valores medios de tres o dos muestras derivadas de tres o dos cultivos separados.

Identificación genotípica

30 AER

Se examinaron las cepas en cuanto al patrón de escisión del ADN cromosómico, a través del método de análisis de endonucleasas de restricción (AER) según Ståhl M, Molin G, Persson A, Ahrné S & Ståhl S, International Journal of Systematic Bacteriology, 40:189-193, 1990, y desarrollado adicionalmente por Johansson, M-L, et al., International Journal of Systematic Bacteriology 45:670-675, 1995. De manera esquemática AER puede describirse tal como sigue: se preparó ADN cromosómico de las cepas implicadas en el estudio y se escindió mediante endonucleasas de restricción. Se digirieron por separado 0,75 μg de cada ADN a 37°C durante 4 h con 10 unidades de EcoRI y Hind III; se usó cada endonucleasa por separado. Se separan los fragmentos de ADN escindidos en cuanto al tamaño mediante electroforesis en gel usando geles en plancha de agarosa horizontales sumergidos. Los genes consistían en 150 ml de agarosa al 0,9% (calidad de ADN ultrapuro; baja electroendoosmosis; BioRad Laboratories, Richmond, EE.UU.) y se colaron como geles

40

en plancha (150 por 235 mm). Se usaron como patrones 0,2 µg del marcador de ADN de alto peso molecular (Bethesda Research Laboratories, MD, EE.UU.) junto con 0,5 µg de un marcador VI de peso molecular de ADN (Roche, Alemania). Se lograron una distorsión de banda mínima y una nitidez máxima aplicando el ADN de muestra en tampón de carga Ficoll (2 g de Ficoll, 8 ml de agua, bromofenol al 0,25%).

5

Se hicieron correr los geles a un voltaje constante de 40 V durante 18 h a aproximadamente 6-8°C. Se recirculó el tampón (Tris 89 mM, H₃PO₄ 23 mM, EDTA sódico 2 mM, pH 8,3) durante el periodo de corrida. Después de eso, se tiñeron los geles durante 20 minutos en bromuro de etidio (2 µg/ml) y se destiñeron en agua destilada, se visualizaron a 302 nm con un transiluminador UV (UVP Inc., San Gabriel, EE.UU.) y se fotografiaron. Este modo de correr el gel de electroforesis dio una banda bien distribuida y relativamente bien separada hasta un peso molecular de 1,2 x 10⁶.

10

PLFR del gen de ARNr 16S (ribotipado)

15

La preparación del análisis cromosómico y de endonucleasas de restricción de ADN cromosómico se realizó según se describió anteriormente (Ståhl *et al.*, 1990, Ståhl *et al.*, 1994).

20

La sonda era un fragmento de 420 pb (posición 506 a 926, numeración de *E. coli*) del gen ARNr 16S de *L. casei* ssp. *pseudoplantarum* DSM 20008, obtenida por PCR y marcada mediante la técnica de marcaje de ADN con DIG según las instrucciones suministradas por el fabricante (Boehringer Mannheim, Bromma, Suecia). La cantidad de sonda usada en las reacciones era de 50 ng.

25

Hibridación de transferencia tipo Southern. Se digirió un µg del ADN cromosómico con 10 U de EcoRI y HindIII (Boehringer Mannheim) durante 4 h a 37°C. Se realizó la separación de los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa según Ståhl *et al.*, 1994. Se usaron como patrones marcador II de ADN de peso molecular marcado con DIG y marcador VI de ADN de peso molecular (Roche, Alemania). Se inmovilizó el ADN en una membrana de nailon cargada positivamente (Roche) horneando durante 30 min. a 120°C. La Prehibridación, hibridación y la detección quimioluminiscente con el sustrato CSPD® (Roche) se realizaron según las instrucciones suministradas por el fabricante. La temperatura de hibridación era de 68°C. La prueba dio como resultado una única banda con un peso molecular de aproximadamente 2840 kb en todas las cepas (CURE 19, 21, 26, 28 y 29) cuando se escindió el ADN cromosómico mediante Hind III. Cuando se escindió el ADN cromosómico mediante EcoRI, los genes de ARNr 16S terminaron en un único fragmento con el peso molecular de aproximadamente 895 kb en cepas CURE 21 y 26, mientras que se obtuvo otra única banda con un peso molecular de aproximadamente 3420 kb para cepas CURE 19, 28 y 29.

30

35

Prueba *in vivo*

Prueba 1. Efectos de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* sobre colitis inducida por DDS en rata

40

El objetivo de este estudio era comparar los efectos de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* sobre colitis inducida por DDS (dextranosulfato de sodio) en rata.

45

Se dividieron ratas Sprague Dawley en seis grupos, un grupo control (colitis sin administración de bacterias) y cinco grupos a los que se les administraron cepas bacterianas diferentes (*Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus gasseri* LG1, *Bifidobacterium* 3B1 y *Bifidobacterium infantis* CURE 19, respectivamente). Se administraron las cepas bacterianas por vía oral durante 7 días antes de la inducción de colitis (día 0) y se administraron continuamente durante 7 días en combinación con DDS (5% p/v disuelto en agua). Se determinó el grado de colitis diariamente con IAE (índice de actividad de la enfermedad). Se realizó el muestreo el día 14 y se determinó la translocación bacteriana y la cantidad en el intestino.

50

En los grupos que recibieron *Lactobacillus plantarum* 299v, *Bifidobacterium* 3B1 y *Bifidobacterium* CURE 19, el IAE disminuyó significativamente el día 4, 5, 6 y 7 en comparación con el grupo control. Además, el IAE era significativamente inferior en el grupo que recibió *B. infantis* CURE 19 en comparación con los grupos que recibieron *Lactobacillus paracasei* 8700:2 y *Lactobacillus gasseri* LG1 tras 6 y 7 días. En comparación con la colitis control, la translocación bacteriana a los nódulos linfáticos mesentéricos disminuyó significativamente en todos los grupos así como la translocación de *Enterobacteriaceae* al hígado.

55

60

En conclusión, las cepas bacterianas administradas por vía oral de *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus paracasei* 8700:2, *Lactobacillus gasseri* LG1, *Bifidobacterium* 3B1 y *Bifidobacterium infantis* CURE 19 pueden ejercer efectos positivos mediante la reducción de translocación en colitis experimental en ratas. *Lactobacillus plantarum* 299v, *Bifidobacterium* 3B1 y *Bifidobacterium infantis* CURE 19 mostraron los efectos más evidentes en el IAE mejorado en la rata con colitis inducida por DDS. *Bifidobacterium infantis* CURE 19 era algo más eficaz en contrarrestar la colitis que las otras después de 6 d y 7 d de tratamiento. Véase la figura 6.

Prueba 2. Supervivencia de *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium* en el tracto GI tras la administración oral

5 La administración oral de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* proporciona diferentes efectos positivos, por ejemplo previniendo la diarrea asociada con antibióticos (D'Souza *et al.*, 2002, BMJ 324:1361)

10 Pueden lograrse efectos positivos siempre que las bacterias sobrevivan a la administración oral y tengan la capacidad de sobrevivir y proliferar en el intestino. Para encontrar cepas adecuadas que pueden usarse como probióticos, varias cepas candidato posibles se administran por vía oral a sujetos sanos. La determinación de la frecuencia de las cepas administradas en las heces identifica cepas con alta capacidad de supervivencia. El objetivo de este estudio es encontrara cepas bacterianas que puedan administrarse por vía oral con una capacidad superior para sobrevivir y proliferar en el tracto GI humano.

15 *Diseño del estudio*

20 Durante cuatro semanas catorce sujetos voluntarios beben una mezcla de aproximadamente 20 diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Todas las cepas son representativa de cepas que se producen en seres humanos o en alimentos que producen ácido láctico. Se tomarán muestras de heces antes de la administración, después de tres 3 semanas de la administración y una semana tras la administración. Se determina la flora bacteriana mediante recuento viable y RAPD (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente; Johansson *et al.*, 1995).

25 Conclusión

30 Los resultados muestran que las cepas seleccionadas, es decir *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158; *Bifidobacterium* CURE 21, DSM 15159; *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160; *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161; y *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, pueden sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal tras la administración oral. Los estudios en ratas también muestran un potencial para ejercer efectos positivos en colitis experimental.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de *Bifidobacterium infantis* seleccionada de *Bifidobacterium infantis* CURE 21, DSM 15159, o *Bifidobacterium infantis* CURE 26, DSM 15160, que produce glutamina *in vivo* y que tiene la capacidad para sobrevivir en el tracto intestinal.
2. Cepa según la reivindicación 1, que tiene la capacidad para asimilar amoníaco.
- 10 3. Cepa de *Bifidobacterium infantis* seleccionada de *Bifidobacterium infantis* CURE 19, DSM 15158, *Bifidobacterium infantis* CURE 28, DSM 15161, o *Bifidobacterium infantis* CURE 29, DSM 15162, que produce glutamina *in vivo* y que tiene la capacidad para sobrevivir en el tracto intestinal.
4. Cepa según la reivindicación 3, que tiene la capacidad para asimilar amoníaco.
- 15 5. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, que tiene la capacidad para producir arginina.
6. Composición que comprende una o más cepas de *Bifidobacterium infantis* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en combinación con un vehículo.
- 20 7. Composición según la reivindicación 6, **caracterizada por que** el vehículo son gachas de avena.
8. Composición según la reivindicación 6 ó 7, **caracterizada por** comprender también fibras dietéticas.
- 25 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, **caracterizada por** ser una composición alimenticia.
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, **caracterizada por** comprender también una o más cepas de *Lactobacillus*.

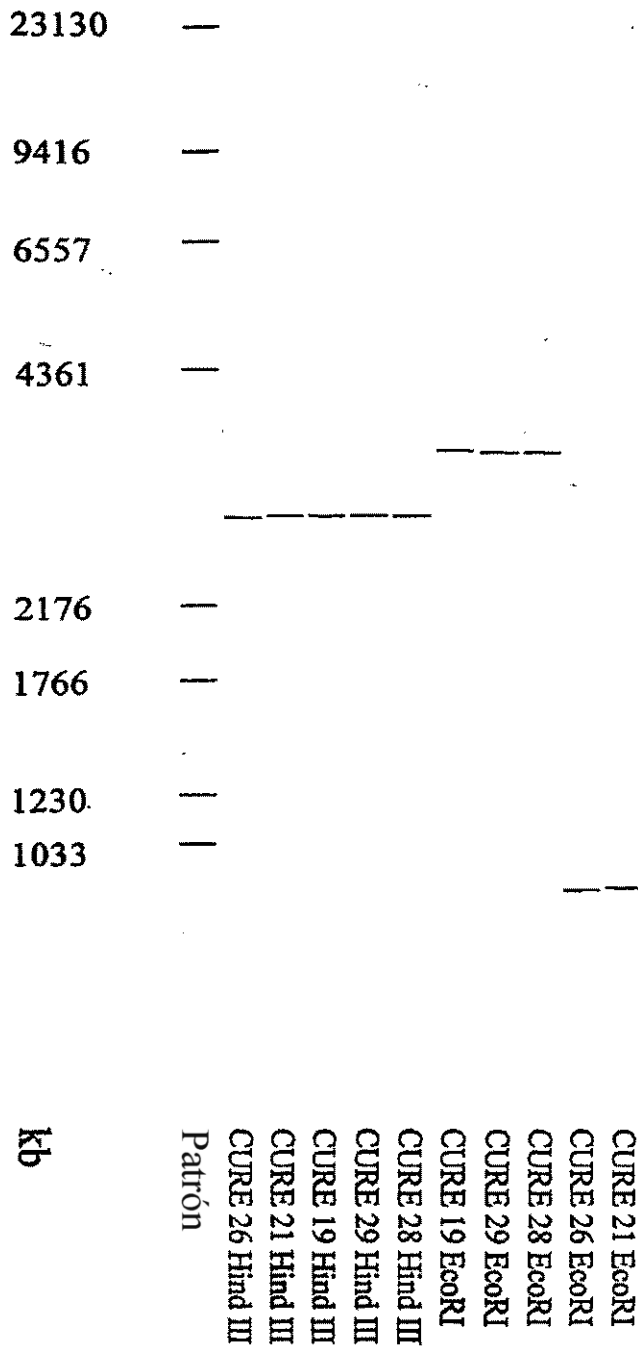


FIGURA 1



1 2 3 4

FIGURA 2

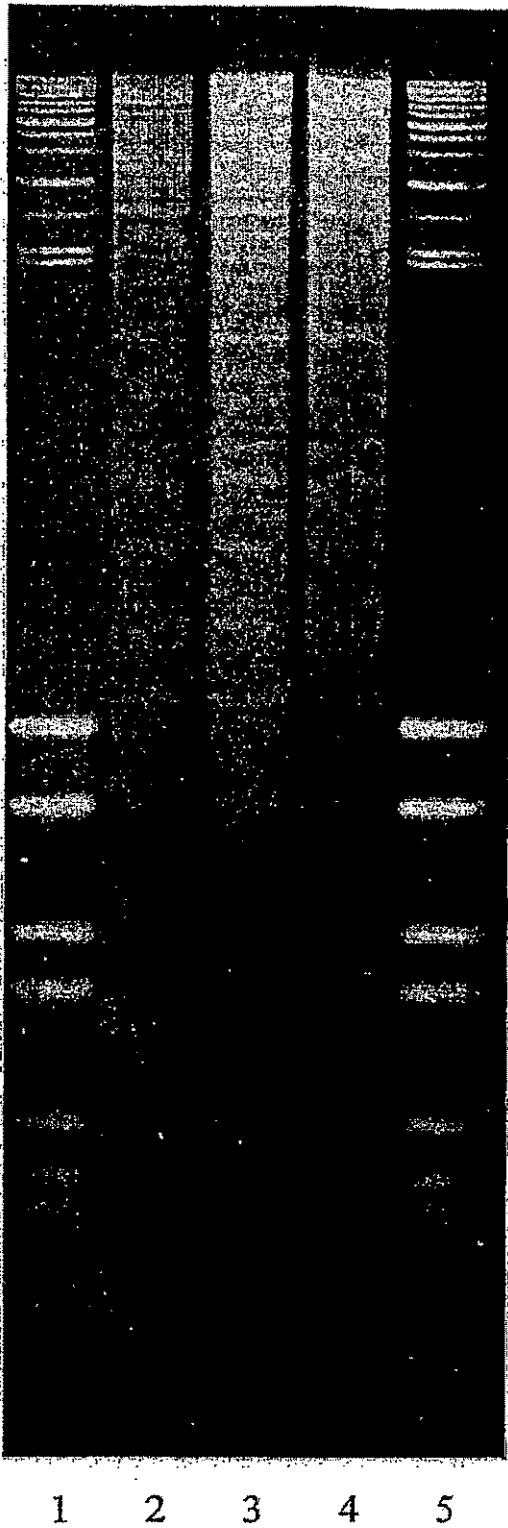


FIGURA 3

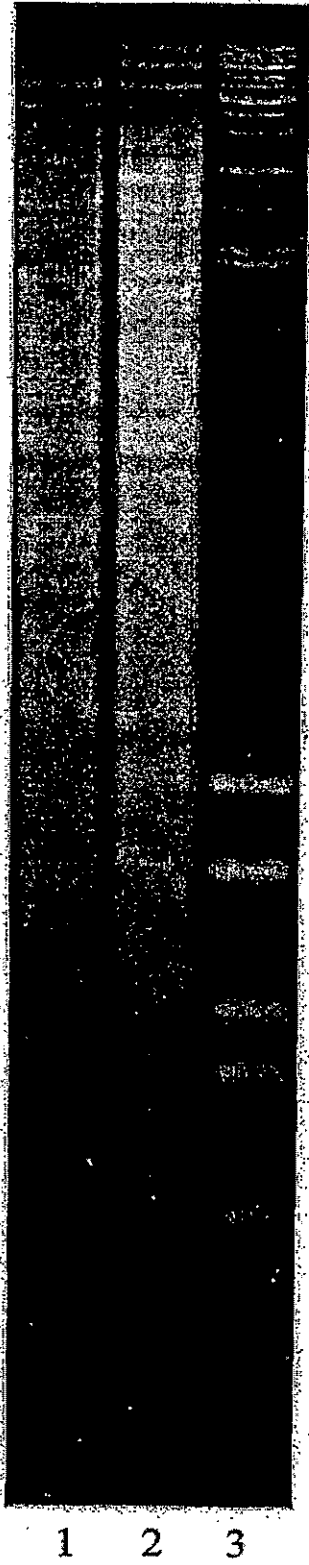


FIGURA 4

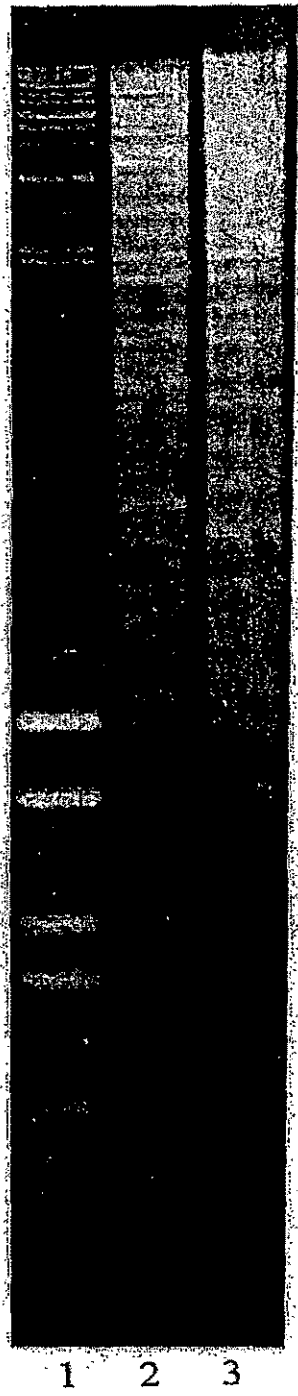


FIGURA 5

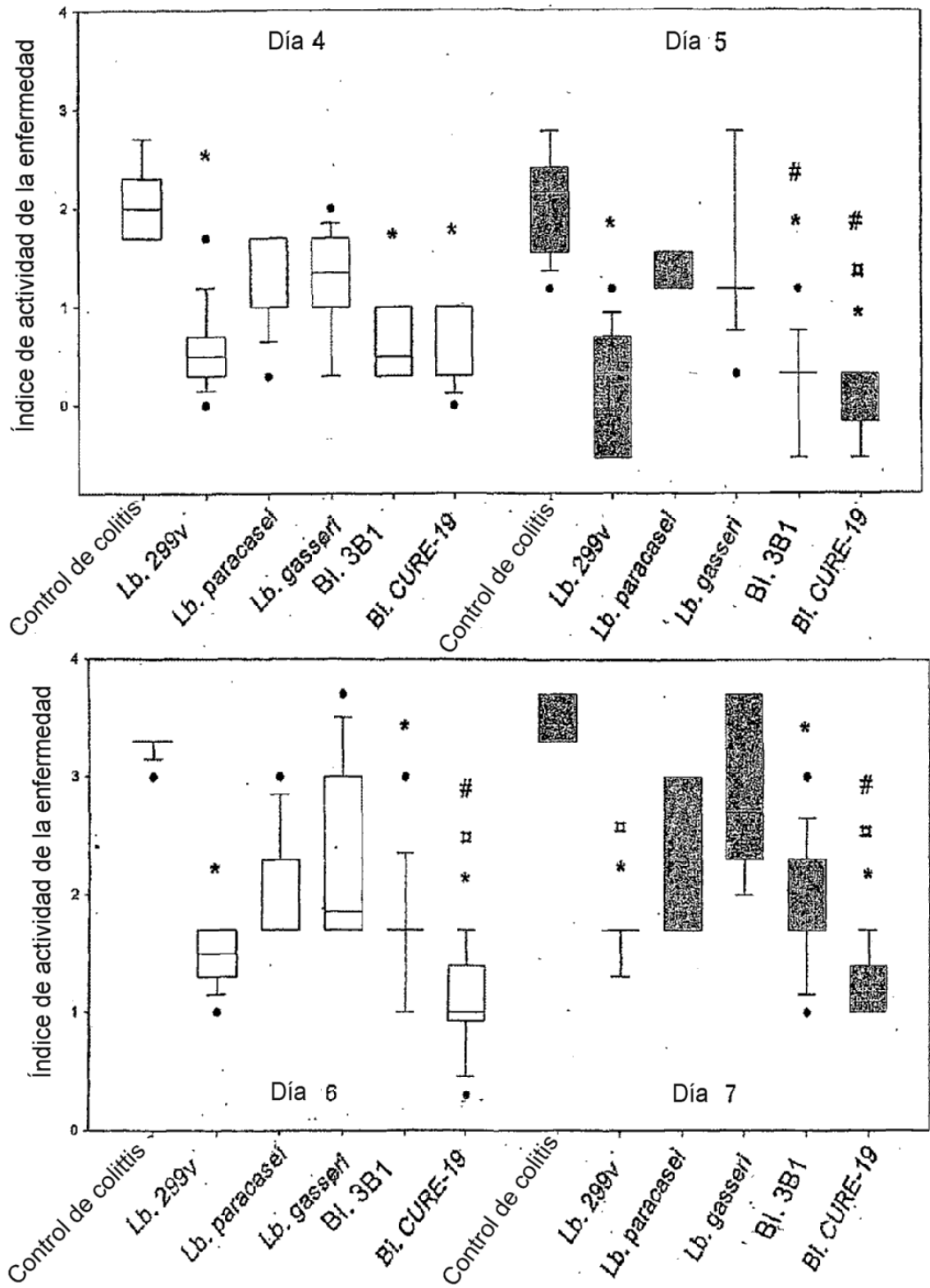


FIGURA 6