

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 643**

51 Int. Cl.:

A61K 36/899 (2006.01)

A23L 1/105 (2006.01)

A23L 1/03 (2006.01)

A61K 31/192 (2006.01)

A61K 33/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2002 E 02786306 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1450626**

54 Título: **Una nueva estrategia no antibiótica frente a infecciones de OGIP basada en un cereal activado**

30 Prioridad:

07.11.2001 SE 0103695

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.02.2014

73 Titular/es:

BORÉN, THOMAS (20.0%)

Björnvägen 400

906 43 Umeå, SE;

HALLMANS, GÖRAN (20.0%);

AMAN, PER (20.0%);

BÖRJESSON, INGMAR (20.0%) y

HOLMGREN, LEIF (20.0%)

72 Inventor/es:

BOREN, THOMAS;

HALLMANS, GÖRAN y

ÅMAN, PER

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 443 643 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

Una nueva estrategia no antibiótica frente a infecciones de OGIP basada en un cereal activado

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva estrategia preventiva y terapéutica para combatir trastornos provocados por microorganismos patógenos en el tracto oro-gastrointestinal humano y animal. Es un tratamiento contra patógenos infecciosos de la mucosa en seres humanos, por ejemplo *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* basándose en un producto de cereales de salvado de centeno fermentado. También es un tratamiento contra patógenos entéricos microbianos, tales como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* en el tracto gastrointestinal de animales domésticos tales como en vacas, cerdos y pollos y, además, en animales domésticos tales como perros y gatos. Además, la invención también comprende el procedimiento de fermentación que produce este producto de salvado de centeno. La invención se refiere además al área alimentaria funcional, ya que el producto de salvado de centeno fermentado se presenta al paciente como un producto alimentario o bebida apetitoso. Además, la invención se refiere a complementos de pienso activo promotor del crecimiento complementario para animales tales como cerdos y pollos.

Antecedentes de la invención

Helicobacter pylori, un patógeno gástrico específico humano, coloniza la mucosa gástrica humana y la consecuencia es una mayor prevalencia de enfermedades gástricas, tales como gastritis activa crónica y enfermedad de úlcera péptica. En el mundo industrializado, menos de 20 % de las personas jóvenes están infectadas, aumentando a aproximadamente la mitad de la población a los 50 años de edad. *H. pylori* se ha adaptado al ambiente hostil y ácido del estómago humano. La peristalsis y la alta tasa de renovación de las células mucosas y epiteliales presentan serios obstáculos para microbios que luchan por conservar una posición en el revestimiento epitelial gástrico. Aquí, *H. pylori* puede establecer una posición protegida para la supervivencia y colonización a largo plazo de la mucosa gástrica. Una vez establecidas en el hospedador, las bacterias pueden persistir durante el tiempo de vida del hospedador. La infección crónica se ha correlacionado con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico, una de las formas más comunes de cáncer en seres humano (revisado en Covert *et al.* 2001). Resulta interesante que la mayoría de los individuos infectados no muestran síntomas clínicos, lo que implica la influencia de factores adicionales en la patogénesis de la enfermedad tales como dieta, predisposición genética, edad de adquisición de la infección y el genotipo de la cepa infectante.

H. pylori coloniza la mucosa gástrica humana por adherencia tanto a las células epiteliales mucosas como al revestimiento de la capa mucosa del epitelio gástrico. *H. pylori* demuestra diversas propiedades de adhesión para adherencia con las glicoproteínas y glicolípidos de las células epiteliales y la capa mucosa. La afinidad microbiana por estructuras receptoras específicas, en combinación con distribución de receptores específica de tejido única, restringirá la colonización a la mucosa gástrica/duodenal. Se ha demostrado la adherencia de *H. pylori* a los antígenos de grupo sanguíneo fucosilados Lewis b y H-1 (descritos por Clausen, *et al.*, 1989) en mucosa gástrica humana (Boren, *et al.*, 1993). Recientemente se ha identificado la adhesina de unión a antígeno de grupo sanguíneo de *H. pylori* afín, Ba-bA (liver, *et al.*, 1998). Se analizó un panel de 95 aislados clínicos con respecto a propiedades de unión con antígeno Lewis b. Se descubrió que la mayoría de los aislados, 66 %, eran positivos para unión, lo que demuestra la alta prevalencia de actividad de unión a antígeno de grupo sanguíneo entre aislados clínicos (liver, *et al.*, 1998). Por exploración epidemiológica, se descubrió que la proteína de unión a antígeno Lewis B era prevalente entre las cepas virulentas que portaban la Isla de patogenicidad *cag* y la citotoxina de vacuolación, es decir las cepas triples positivas. Se propone por lo tanto que la adherencia mediada por antígeno Lewis b de *H. pylori* desempeña un papel crucial para el desarrollo de enfermedad gástrica grave (Gerhard, *et al.*, 1999).

La Solicitud de Patente Internacional N° PCT/SE97/01009 publicada como WO97/47647 se refiere al antígeno de grupo de unión a adhesina de *Helicobacter pylori*.

Una investigación de la influencia de *H. pylori* oral en el éxito de la terapia de erradicación sugiere que la presencia de *H. pylori* oral es un factor importante para la infección gástrica (debido a los números de pacientes que se demostró que eran recurrentes o refractarios después de terapias de erradicación). La explicación más plausible sería que estos pacientes se infectaron con *H. pylori* en la cavidad oral y placas dentales (Miyabayashi, *et al.*, 2000), lo que sugiere que las infecciones por *H. pylori* deberían erradicarse.

A partir del documento US 5.633.244 se sabe cómo tratar gastritis y úlcera péptica provocadas por *H. pylori* mediante la administración de un compuesto antibacteriano degradable en ácido en combinación con un compuesto bloqueador del receptor de histamina H₂. El compuesto antibacteriano degradable en ácido puede usarse también en combinación con un inhibidor de bomba de protones tal como omeprazol y lansoprazol (documento US 5.629.305). El compuesto antibacteriano es una penicilina, tal como benzil penicilina o un macrólido tal como eritromicina.

El documento EP 1 034 787 desvela una cepa de *Lactobacillus* (*L. paracasei*), y el uso de la misma, que tiene la capacidad de prevenir la colonización del intestino con bacterias patógenas que provoquen diarrea.

El documento WO 90/09398 desvela metabolitos de *Lactobacillus* (*L. crispatus*) que inhiben la adhesión, el

crecimiento y/o la supervivencia de ciertos patógenos tales como *Escherichia coli*.

De acuerdo con el documento US 5.578.302, las úlceras de estómago se tratan administrando un cultivo de una cepa de *Lactobacillus johnsonii* o una fase de sobrenadante aislada de dicho cultivo.

5 La resistencia antibiótica aumentada entre cepas bacterianas virulentas es una causa importante del desarrollo de estrategias anti-microbianas alternativas, tales como estrategias de alimentos funcionales. El conocimiento detallado acerca de los mecanismos que apoyan los procesos de adherencia de *H. pylori* es vital para el desarrollo de estrategias antimicrobianas alternativas, tales como la invención descrita y reivindicada en la presente patente.

Breve descripción de la invención

10 El objeto de la invención es proporcionar una alternativa terapéutica no antibiótica contra infección por *H. pylori* en el tracto gastroduodenal humano y, además, una alternativa terapéutica no antibiótica contra enfermedad oro-gastrointestinal tanto en seres humanos como en animales. El objeto de la invención se consigue usando producto/productos activados de salvado de centeno fermentado. El efecto del producto activo es una inhibición de la adherencia y colonización de *H. pylori* en el tracto gastrointestinal humano. Este efecto podría proteger contra *H. pylori* y otros patógenos tales como *Candida albicans* y *Streptococcus mutans* y de este modo reducir el riesgo de trastornos oro-gastrointestinales en seres humanos y, además, proteger contra patógenos entéricos microbianos tales como *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*, en el tracto gastrointestinal en animales de granja y mascotas. Una realización preferida es un producto de salvado de centeno activado (i-Bran™) del sobrenadante de un cultivo celular de salvado de centeno fermentado por *Lactobacillus curvatus*. El producto de salvado de centeno se presenta al paciente en forma de un producto alimentario o bebida apetitoso. Como alternativa, el producto se usa para tratamiento preventivo o terapéutico de vacas, cerdos y pollos domésticos y animales de compañía, y se presenta después en forma de alimento líquido o pienso complementario.

Breve descripción de los dibujos

25 **La Figura 1A** muestra un ensayo de inhibición con la cepa de *H. pylori* CCUG17875, pretratada con salvado de centeno fermentado durante 1 hora y después analizada con respecto a unión con conjugado de Lewis b marcado con 125I. Los productos de salvado de centeno usados para los experimentos de unión bacteriana se proporcionan en la figura y las barras proporcionan la unión bacteriana correspondiente. Las barras: I: salvado de centeno, II: salvado de centeno fermentado por *L. curvatus*. El porcentaje de reducción en la unión se proporciona en la figura.

30 **La Figura 1B** muestra un ensayo de inhibición con la cepa de *H. pylori* CCUG17875, pretratada con ácido quínico férrico 2 mM (Fe-QA) durante 1 hora y después analizada con respecto a unión con conjugado de Lewis b marcado con 125I. También se muestra el pretratamiento con ácido quínico (no férrico) 2 mM (QA). Ambos experimentos se muestran junto con su control no tratado correspondiente (Control I y II, respectivamente).

35 **La Figura 2** muestra un ensayo de inhibición en el que se incubó en primer lugar la cepa de *H. pylori* CCUG17875 con el conjugado de Lewis b marcado con 125I durante 2 horas para permitir la unión completa. Las células de *H. pylori* se incubaron después con productos de salvado de centeno durante 2 horas adicionales para analizar con respecto a la separación de unión bacteriana. También se muestra la reducción de la unión de un producto de salvado de centeno no fermentado con *L. curvatus*. Las barras: I: salvado de centeno, II: salvado de centeno fermentado por *L. curvatus*.

La Figura 3A muestra análisis de adherencia *in vitro* de la unión de *H. pylori* con histosecciones de mucosa gástrica humana, y el efecto del pretratamiento bacteriano con salvado de centeno fermentado y ácido quínico férrico 2 mM.

40 **La Figura 3B** muestra la cuantificación de *H. pylori* restantes unidas con las histosecciones de mucosa gástrica humana. Se muestra el pretratamiento de la cepa CCUG 17875 con antígeno Lewis b soluble, con salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* y con quinato férrico. Aquí, se estimó la unión bacteriana con 10 regiones de epitelio de superficie gástrica diferentes (p valor <0,001 (***), p valor <0,01 (**), p valor <0,05 (*)).

45 **La Figura 4** muestra la inhibición de unión de *H. pylori* con el antígeno Lewis b por pretratamiento con salvado de centeno fermentado tratado por calor (analizado por RIA). El salvado de centeno fermentado se hirvió a 100 °C durante 3 horas. El volumen de producto tratado por calor se ajustó después para el análisis posterior de la actividad de inhibición. La reducción de la unión de *H. pylori* CCUG17875 se midió como se describe en la Fig. 1

50 **La Figura 5** muestra la inhibición de unión de *H. pylori* con el antígeno Lewis b por pretratamiento con diversos cereales fermentados (analizado por RIA). Se estudiaron varios cereales (semillas y fracciones de semilla) con respecto a inhibición de la unión de *H. pylori*.

55 **Las Figuras 6A-F** muestran los resultados del tratamiento de voluntarios humanos con producto de salvado de centeno fermentado potable. Se proporciona a un paciente y 5 voluntarios con infecciones de *H. pylori* el producto de salvado de centeno fermentado con *L. curvatus*, iBran™, tres veces al día (véase "Descripción de realización preferida"). El nivel de infección de *H. pylori* se analizó por ensayo de 13C-urea en aire aspirado. Las muestras se recogieron durante y después del periodo de tratamiento completo, como se indica en la figura.

La Figura 7A muestra la adhesión de *C. albicans* (cepa GDH18) mediada por saliva parótida a células epiteliales bucales y la influencia de diversos cereales fermentados. Las células epiteliales bucales humanas se trataron en primer lugar con saliva parótida (diluida 1:1 con tampón de PBS), y después se añadieron células de *Candida albicans* marcadas con 35S.

5 **La Figura 7B** muestra la adhesión de *Streptococcus mutans* con hidroxiapatita tratada con saliva y la reducción en la unión conferida por el producto de salvado de centeno.

10 **La Figura 8** muestra la comparación de síntomas clínicos entre ratones expuestos a DSS o una mezcla de DSS y el producto de centeno fermentado. Ambos grupos pierden peso a una velocidad similar (A y B). La mortalidad de los ratones en ambos grupos es similar y la divergencia de las curvas se debe al número relativamente pequeño de ratones analizados (C). Ambos grupos muestran sangrado general como una señal del daño epitelial (D) pero los ratones expuestos al producto de centeno fermentado claramente presenta menos síntomas intestinales tales como heces sueltas y diarrea (E y F).

15 **La Figura 9** muestra la comparación de histología de un control no tratado (A), un ratón expuesto a una mezcla de DSS y el producto de centeno fermentado (B) y un ratón expuesto solamente a DSS (C). Puede observarse daño epitelial en ambos grupos de ratones expuestos a DSS (B y C), pero la inflamación es más grave en los ratones expuestos solamente a DSS (C) en comparación con los ratones expuestos a una mezcla de DSS y el producto de centeno fermentado (B).

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la colonización de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) en el canal gastrointestinal humano y otros patógenos oro-gastrointestinales (OGIP) en seres humanos y animales se inhibe por ciertos productos de fermentación derivados del salvado de centeno tras la fermentación del mismo.

25 Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la invención se refiere a un producto de salvado de centeno fermentado, caracterizado por obtenerse por fermentación de salvado de centeno con cepa de *Lactobacillus curvatus* Lb14 (DSMZ N° de depósito 13890) que tiene la capacidad para producir, tras la fermentación, un producto de centeno de salvado activado que tiene la capacidad de inhibir por competición, tras su consumo, la adherencia y colonización de patógenos oro-gastrointestinales (OGIP) en seres humanos y animales, particularmente *H. pylori* en seres humanos.

30 La cepa de *Lactobacillus curvatus* (*L. curvatus*) se ha depositado, según los términos del Tratado de Budapest, en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen y Zellkulturen (DSMZ) el 7 de diciembre de 2000 y ha recibido el número de referencia DSMZ 13890.

La cepa Lb 14 usada forma colonias blancas pequeñas en placas de "Agar BLL Rogosa SL" que es típico de cepas de *Lactobacillus*. Esta cepa se aisló originalmente de orina humana y se identificó como *Lactobacillus curvatus* mediante el uso del ensayo de "API-50 CHL".

35 Las infecciones de OGIP distintas de infecciones por *H. pylori* para tratar son infecciones por *Candida albicans* y patógenos dentales, tales como *Streptococcus mutans*, en seres humanos y *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* en animales domésticos, por ejemplo, vacas, cerdos y aves de corral, y mascotas, por ejemplo perros y gatos.

40 También se ha mostrado en la presente memoria que el producto de cereal de salvado de centeno de la invención también tiene la capacidad para bloquear la adhesión de la bacteria de la "caries dental" *Streptococcus mutans* con hidroxiapatita cubierta por saliva (HA), es decir, el material de las superficies de los dientes.

Durante el proceso de fermentación se liberan componentes activos del producto de salvado de centeno debido a los procesos enzimáticos de *Lactobacillus*. Estos componentes son responsables de la actividad inhibidora en la colonización de *H. pylori*. Consúltese el Ejemplo 6 en la Sección Experimental posterior.

45 Una realización preferida de este aspecto es un producto de salvado de centeno activo (iBran™) que es el sobrenadante del caldo de fermentación obtenido cuando se fermenta salvado de centeno por *L. curvatus* Lb14 (DSMZ 13890). Se ha descubierto que actúa como un inhibidor de la colonización de *H. pylori* en el canal gastrointestinal humano. Un componente/componentes del producto de salvado de centeno activo (iBran™) evita la adhesión de *H. pylori* con la mucosa gástrica y el revestimiento epitelial inhibiendo la unión entre BabA (adhesión de unión de antígeno de grupo sanguíneo) en la superficie de *H. pylori* y el antígeno Lewis b fucosilado en la superficie epitelial gástrica. Estas propiedades inhibidoras contra la adherencia de *H. pylori* se analizaron experimentalmente *in vitro*, *in situ* y *in vivo* (consúltese la Sección Experimental posterior). Además, las propiedades inhibidoras contra la adherencia de *Candida albicans* se analizaron experimentalmente por células epiteliales bucales recubiertas con saliva (Ejemplo 9, Fig. 7A), así como las propiedades inhibidoras contra la adherencia de *Streptococcus mutans* que se analizó experimentalmente por hidroxiapatita recubierta de saliva (HA) (Ejemplo 9, Fig. 7B).

55

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso del producto de salvado de centeno fermentado de la invención para la preparación de un producto alimentario funcional que tiene la propiedad, tras el consumo del mismo, de inhibir de forma competitiva la colonización de OGIP en seres humanos y animales, particularmente *H. pylori* en el canal gastrointestinal humano.

- 5 Una realización preferida de este segundo aspecto es el uso del sobrenadante del caldo de fermentación obtenido por fermentación de salvado de centeno por la cepa de *L. curvatus* Lb 14 (DSMZ 13890).

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un producto alimentario funcional que es útil para el tratamiento de seres humanos y animales que padecen infecciones por OGIP y particularmente seres humanos que padecen infecciones por *H. pylori* y enfermedad gástrica asociada.

- 10 Una realización preferida de este tercer aspecto es un producto alimentario funcional que comprende el sobrenadante del caldo de fermentación obtenido por fermentación de salvado de centeno por la cepa de *L. curvatus* Lb 14 (DSMZ 13890).

El producto de salvado de centeno fermentado, preferentemente el sobrenadante de su caldo de fermentación, se mezcla con otros ingredientes para formar un producto alimentario apetitoso, por ejemplo una bebida, pan o muesli.

- 15 Una realización preferida es añadir zumo de arándano rojo 10 % y glucosa 10 % para formar una bebida sabrosa. Se mezclaron noventa litros del sobrenadante obtenido del centeno fermentado (de acuerdo con el protocolo posterior) con 10 kg de glucosa (Sigma, St. Louis, Estados Unidos) y 10 litros de zumo de arándano rojo (de 17 kg de bayas prensadas frías). La dosificación de tratamiento es de 10-500 ml de producto, preferentemente 100 ml, tomado 1-5 veces al día, preferentemente tres veces al día, lo que corresponde a 10-2500 ml de salvado de centeno fermentado al día, preferentemente 300 ml.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar el producto de salvado de centeno fermentado sometiendo el salvado de centeno a fermentación por la cepa de *Lactobacillus curvatus* Lb14 (DSMZ N° de Depósito 13890) y recogiendo el producto del caldo de fermentación.

- 25 La sustancia o las sustancias activas del producto de salvado de centeno fermentado pueden concentrarse o aislarse mediante el uso de diferentes métodos, tales como extracción selectiva, precipitación, ultrafiltración, tratamiento enzimático o cromatografía.

Una realización preferida del método comprende someter el salvado de centeno a fermentación por la cepa de *L. curvatus* Lb 14 (DSMZ 13890). En el método preferido, las células bacterianas y el salvado de centeno se incuban a 37 °C durante aproximadamente 24 horas.

- 30 Una realización particular se refiere a un producto en forma de un enjuague bucal para el tratamiento de caries dental, enfermedad periodontal y mal olor oral/halitosis.

Una realización particular adicional se refiere al tratamiento de inflamación intestinal humana, tal como colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, con el producto de salvado de centeno fermentado.

- 35 La presente invención se ilustra adicionalmente por los Ejemplos no limitantes a continuación en la siguiente Sección Experimental.

Sección Experimental

Descripción de realización preferida

- 40 Esta sección describe el procedimiento de fermentación de salvado de centeno, el producto de cereal activado preferido y caracterización del efecto del producto de cereal activado, preferentemente el efecto de salvado de centeno en la adhesión de *Helicobacter pylori* y la adhesión de *Candida albicans*.

Ejemplo 1

Cultivo de *Lactobacillus curvatus* Lb14

Para fermentación de salvado de centeno, se cultivó *Lactobacillus curvatus* (*L. curvatus*) Lb14 en caldo MRS (Difco) a 37 °C con agitación suave durante 24 horas.

- 45 **Ejemplo 2**

Procedimiento de fermentación de salvado de centeno

- 50 Se suspendió un gramo de salvado de centeno (Nordmills, Uppsala) en 10 ml de agua destilada y se mezcló 1:1000x de cultivo de *L. curvatus* (véase anteriormente) para formar la suspensión de salvado de centeno fermentable. La suspensión fermentada de células bacterianas y salvado de centeno se incubó después a 37 °C con agitación suave durante 24 horas en atmósfera normal. Después el material se sedimentó y, de este modo, se eliminó mediante

centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm. Para almacenamiento a largo plazo y para uso en ensayos clínicos, el sobrenadante se esterilizó por autoclave durante 20 minutos, a 120 °C, se separó en alícuotas y se almacenó a -20 °C (véase posteriormente Figura 4).

Ejemplo 3

5 Cepa de *H. pylori* y condiciones de cultivo

La cepa CCUG17875 (cag+, toxina de vacuolación+) se obtuvo de la Colección de Cultivo de la Universidad de Göteborg (CCUG), Suecia. Se cultivaron bacterias a partir de reserva congelada en los medios que contenían agar "Brucella" (Difco, Estados Unidos) complementado con sangre bovina 10 %, "Enriquecimiento IsoVitox" (Svenska LabFab, Suecia) a 37 °C en condiciones micro-aerófilas durante 2 días. Las células bacterianas se recogieron y se lavaron en PBS dos veces. Después las células se resuspendieron hasta una densidad de 1×10^8 UFC/ml en PBS para análisis de los efectos biológicos del producto de salvado de centeno activado.

Ejemplo 4

Ensayo de inhibición con salvado de centeno fermentado usando glicoproteína semisintética radiomarcada, Lewis b

15 El antígeno del grupo sanguíneo de Lewis B usado fue glicoproteína semisintética construida por unión covalente de oligosacárido de Lewis b purificado con albúmina de suero humano (IsoSep, AB, Tullinge, Suecia). El ensayo de RIA se realizó de acuerdo con Ilver *et al.*, 1998; el conjugado de Lewis b se marcó con 125I por el método de "Cloramina T" como se usa en Ilver *et al.*, 1998. Brevemente, se incubó un 1 ml de bacterias a una densidad óptica de A600; (DO = 0,10), con 300 ng de conjugado de Lewis b marcado con 125I durante 2 horas en solución salina tamponada con fosfato (PBS), albúmina 1 %, "Tween 20" 0,05 % (tampón de bloqueo, (indicado BB)). Después de la
20 centrifugación, se midió el conjugado de Lewis b unido al sedimento bacteriano por recuento de centelleo gamma en el sedimento bacteriano. Para análisis de las actividades inhibitoras de la unión bacteriana, las bacterias se pretrataron o postrataron con producto de salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* para analizar con respecto a actividades inhibitoras hacia las propiedades de unión bacterianas. El potencial inhibitor del producto de salvado de centeno fermentado sobre la adherencia de *H. pylori* se analizó por ensayo de RIA usando antígeno Lewis b radiomarcado. Se preincubó *H. pylori* (como se ha descrito anteriormente) con 1 ml de productos de salvado de centeno fermentados por *L. curvatus* lo que dio como resultado >90 % de inhibición de unión con el antígeno Lewis b (Fig. 1A). Por el contrario, el producto de salvado de centeno no fermentado por *L. curvatus* proporciona solamente una reducción de 31 % en la unión de *H. pylori*. Los resultados también mostraron que el compuesto activado con un
30 efecto inhibitor en la unión bacteriana se libera debido al proceso de fermentación.

También se analizó la inhibición específica por el postratamiento con salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* de *H. pylori* con conjugado de Lewis b unido. Los resultados del enfoque de postratamiento también demostraron la importancia del proceso de fermentación para conseguir inhibición reducible de la adherencia microbiana. Los productos de salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* redujeron la unión bacteriana realizando 60-80 % de la separación bacteriana. Por el contrario, el salvado de centeno no fermentado por *L. curvatus* tuvo menos efecto en la unión bacteriana (Fig. 2).

Ejemplo 5

Adherencia de *H. pylori* *in situ* e inhibición de la unión mediante el uso del producto de salvado de centeno fermentado.

40 Se realizó adherencia bacteriana *in situ* como se describe en Falk *et al.*, 1993. Se obtuvieron muestras de biopsia humana de tejido gástrico sano de la División de Gastroenterología, Hospital Universitario de Norrland, Umea, Suecia. Las biopsias se tomaron de la parte del antro del estómago, después se fijaron en formalina tamponada 4 % y finalmente se incluyeron en cera de parafina. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina siguiendo procedimientos convencionales. Se marcó en primer lugar *H. pylori* con FITC, y se analizó después la adherencia bacteriana con la mucosa gástrica mediante la capacidad del salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* para
45 inhibir la adherencia bacteriana a histosecciones rehidratadas de células epiteliales gástricas humanas *in situ*. Para análisis de inhibición comparativa, se preincubó *H. pylori* con conjugado de Lewis b (10 µg/ml) y salvado de centeno fermentado (1 ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, como se ha descrito anteriormente, se aplicaron las células bacterianas *H. pylori* a las histosecciones. El pretratamiento de la cepa de *H. pylori* CCUG17875 con el producto de salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* evitó la adherencia (reducción > 75 %) a la mucosa gástrica humana, *in situ*. Por lo tanto, se demostró una correlación inversa entre *H. pylori* preincubada con producto de salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* y *H. pylori* no tratada unida con las células gástricas (Figs. 3A y 3B).

55 La reducción de la unión bacteriana se estimó contando el número de bacterias específicamente adheridas a la región de la fosa gástrica con un aumento 200 X. Cada valor es la media +/- ETM de 10 campos diferentes. En los experimentos de control, las bacterias no se preincubaron con conjugado de Lewis b, o salvado de centeno fermentado, y esa se definió como la referencia de unión 100 %. Se usó ensayo de t de Student para evaluar la

importancia de las diferencias entre las medias en análisis de unión no inhibida e inhibición.

Para resumir, se confirmó lo siguiente:

La cepa de *H. pylori* CCUG17875 se adhiere eficazmente al epitelio gástrico *in vitro* (control no tratado).

5 La adherencia de la cepa CCUG17875 con el epitelio de sección tisular gástrica después de pretratamiento con el producto de salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* se redujo mucho.

Ejemplo 6

Efecto de inhibición del salvado de centeno fermentado tratado con calor en la adherencia de *H. pylori*

10 Para analizar las propiedades termoestables de los compuestos antiadhesivos del producto de salvado de centeno fermentado, y además de inactivar las actividades enzimáticas potenciales y/o estructuras termolábiles liberadas durante la fermentación por *L. curvatus*, el producto se hirvió (a 100 °C) durante 3 horas o se esterilizó por autoclave durante 20 min, a 120 °C. El análisis de RIA mostró que el producto de salvado de centeno fermentado, con o sin diversos tratamientos por calor, inhibe la unión de *H. pylori* con el antígeno Lewis b (Fig. 4). Estos resultados sugieren que la actividad de inhibición mediada por el salvado de centeno no resultaba de la degradación de la proteína adhesina BabA de unión a antígeno Lewis b por enzimas de *L. curvatus*, tales como proteasas. En su lugar, 15 las actividades inhibitoras de unión podrían deberse a análogos o miméticos de receptores, liberados durante los procedimientos de fermentación del salvado de centeno.

Ejemplo 7

Pretratamiento con diversos cereales fermentados

20 Se estudiaron varios cereales (semillas y fracciones de semillas) con respecto a inhibición de la unión de *H. pylori*. Cuando se representó la inhibición frente a la densidad bacteriana se encontró una relación para la mayoría de las muestras, lo que indica que un aumento de la densidad bacteriana en el extracto da como resultado un aumento de la actividad de inhibición. El salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* claramente demuestra la inhibición más eficaz de la unión de *H. pylori*. Consúltese Fig. 5.

Ejemplo 8

25 Efecto terapéutico del producto del salvado de centeno fermentado, iBran™

Se usaron en este estudio un paciente voluntario del Hospital Universitario de Umea con gastritis activa crónica (se realizó diagnóstico clínico por exámenes endoscópico e histológico rutinarios), y además 5 voluntarios sanos. La serie de voluntarios se examinaron en primer lugar con respecto a la presencia de *H. pylori* gástrica por un ensayo de ureasa, ensayo de Urea-13-C en aire espirado de *Helicobacter pylori* (Utandningstester i Sverige AB, Suecia), 30 una semana antes del tratamiento con salvado de centeno fermentado. Los voluntarios positivos se volvieron a examinar por el ensayo de Urea-13C en aire aspirado para calibrar y verificar el valor de partida (valor "antes del tratamiento"), y los resultados individuales demostraron variación <5 % en análisis de 13C en aire aspirado. Durante el siguiente periodo de dos semanas, se proporcionó a los pacientes el salvado de centeno fermentado de acuerdo con el siguiente protocolo:

35 Se cultivaron muestras de salvado de centeno fermentado y se examinaron con respecto a detección de posibles contaminantes y después, además, se esterizaron por autoclave antes de su consumo oral. El producto de salvado de centeno se complementó con zumo de arándano rojo 10 % y glucosa 10 % para mejorar el sabor de la bebida fermentada. Ambos complementos se analizaron en primer lugar *in vitro* (por el ensayo de unión de RIA basado en conjugado de Lewis b), para no mostrar interferencia con el efecto supresor del producto de salvado de centeno en la adhesión de *H. pylori*. La dosificación fue de 100 ml de producto, tres veces al día, correspondiente a 300 ml/día 40 de salvado de centeno fermentado durante 2 semanas (véase "Descripción Detallada de la Invención"). Los pacientes se examinaron con respecto a la presencia de *H. pylori* gástrica por el ensayo de 13C-ureasa durante el periodo de tratamiento completo (día 3, día 7 y día 14). Además, se proporcionó a dos voluntarios, consúltese Figs. 6 C y D, el producto durante 30 días y se analizaron. Después, una semana después del final del tratamiento y además 30 días después del final del tratamiento (Figs. 6 E, F), el paciente y los voluntarios se examinaron con 45 respecto a la presencia de *H. pylori* gástrico por el ensayo de 13C-ureasa. Los resultados mostraron que la actividad biológica de la infección por *H. pylori* se redujo durante terapia en una mayoría de los individuos, pero vuelve al nivel del original después del final del tratamiento.

Ejemplo 9**Efecto de inhibición del salvado de centeno fermentado y otros cereales fermentados en adherencia de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*****Adherencia de *Candida albicans* con células epiteliales bucales tratadas con saliva**

- 5 Se mezclaron en primer lugar células epiteliales bucales humanas con saliva parótida (diluida 1:1 con tampón de PBS). Después se mezclaron 250 μ l (2×10^7 células/ml) de *Candida albicans* marcada con ³⁵S con 250 μ l ($1,75 \times 10^5$ células/ml) de las células epiteliales bucales tratadas con saliva y, finalmente, se añadieron 250 μ l de las diversas muestras (una cada vez) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. El pretratamiento por el producto de salvado de centeno fermentado por *L. curvatus* (Fig. 7A, muestra 2) redujo la unión por *Candida albicans* a las
- 10 células epiteliales bucales tratadas con saliva, mientras que muchos otros productos de cereales no tuvieron efectos, o incluso apoyaron la unión por *Candida albicans* (Fig. 7A).

Adherencia de *Streptococcus mutans* con hidroxiapatita tratada con saliva

- Se midió la unión bacteriana con películas salivares experimentales por el "ensayo de hidroxiapatita". Se midió la adherencia de bacterias *Streptococcus mutans* marcadas con [³⁵S]-metionina (5×10^4 a 15×10^4 cpm/ml; 1×10^8 bacterias/ml) con muestras proteicas salivales individuales adsorbidas en perlas de hidroxiapatita (Fluka, Chemie AG, Buchs, Suiza). Por lo tanto, se adsorbió saliva parótida no fraccionada (completa) en perlas de hidroxiapatita (BHD Chemicals Ltd., Poole, Reino Unido) y se incubaron posteriormente con bacterias *S. mutans* marcadas de forma metabólica con S (68 μ l) junto con un volumen igual del producto de salvado de centeno fermentado por *L. curvatus*. Las bacterias unidas a las perlas después de dos lavados se determinaron por recuento de centelleo
- 15 líquido. El producto de salvado de centeno casi eliminó la unión de células bacterianas de *S. mutans* (Fig. 7B).
- 20

Ejemplo 10**Atenuación de la colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) en ratones por producto de centeno fermentado****Introducción**

- 25 La colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (DSS) es un modelo experimental de inflamación colónica en la que el daño epitelial provocado químicamente a la mucosa colónica conduce a una reacción inflamatoria posterior altamente similar a la colitis ulcerosa humana (Cooper *et al.* 1993). Para estudiar si un producto de centeno fermentado puede proteger contra colitis los inventores han inducido inflamación en ratones por exposición solamente a DSS o a una mezcla de DSS y dicho producto de centeno fermentado. En un experimento se
- 30 seleccionó DSS 3,5 % (p/v) como datos previos de otros laboratorios (Okayasu *et al.* 1990, Cooper *et al.* 1993, Mahler *et al.* 1998) y el estudio piloto de los inventores indicó que esta concentración conduciría al desarrollo de colitis aguda en un periodo de 4-5 días de exposición permitiendo un buen control de los síntomas clínicos.

Preparación experimental

- 35 Se expusieron dos grupos de ratones de sexo y edad coincidentes, conteniendo cada grupo ocho ratones, a DSS 3,5 % (p/v) o una mezcla de DSS 3,5 % (p/v) y el producto de centeno fermentado en su agua para beber a voluntad. Todos los ratones se controlaron diariamente con respecto a los siguientes parámetros clínicos, peso, consistencia de las heces y hemorragia rectal. El punto final del análisis fue muerte el día 10 o antes durante el periodo de análisis. Se midió la longitud del colon y el intestino delgado y se recogieron muestras tisulares del intestino delgado proximal y distal, colon distal y bazo para histología.

40 Resultados

- Durante el periodo de análisis, resultó evidente que ambos grupos de ratones presentaban pérdida de peso bastante similar (Figuras 8A y B) así como mortalidad (Figura 8C). Se indujo daño epitelial en ambos grupos, lo que resultó evidente en el punto temporal similar de hemorragia general (Figura 8D) observada en ellos. Sin embargo, los ratones que recibieron una mezcla de DSS y el producto de centeno fermentado claramente presentaron menor
- 45 incidencia de heces sueltas así como diarrea (Figs. 8E y F). Esto indica que el producto de centeno fermentado protege de algún modo contra estos síntomas. Los inventores también han analizado la histología del colon distal por tinción con hematoxilina-eosina de secciones tisulares y han observado que la colitis en ratones que recibieron DSS y el producto de centeno fermentado es claramente más leve que los ratones expuestos solamente a DSS (Figuras 9B y C).

50 Conclusión

Los hallazgos anteriores indican que el producto de centeno fermentado de la invención puede atenuar la colitis en ratones expuestos a DSS. La implicación puede ser que el tratamiento con salvado de centeno fermentado también reduce la inflamación en seres humanos con inflamación intestinal tal como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn.

Compendio

Un producto activado de un cereal fermentado, concretamente salvado de centeno fermentado usando *Lactobacillus curvatus*, demuestra propiedades como un inhibidor de la adherencia de *H. pylori* a la mucosa epitelial gástrica. Por lo tanto, esta nueva estrategia antimicrobiana podría proteger contra patógenos oro-gastrointestinales (OGIP), por ejemplo, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en seres humanos, y patógenos oro-gastrointestinales, por ejemplo, *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens*, en animales domésticos, tales como vacas, cerdos y aves de corral y mascotas, tales como perros y gatos. Además, la invención se refiere a la actividad estabilizadora de la flora microbiana como un agente de pienso activo promotor del crecimiento complementario para animales tales como cerdos y pollos.

10 Referencias

1. Cover, T.L., Berg, D.E., Blaser, M.J., y Mobley, H.L.T. (2001), "*H. pylori* pathogenesis. In Principles of bacterial pathogenesis", E.A. Groisman, ed. (Nueva York, Academic Press), pp. 509-558.
2. H. Clausen y S. Hakomori, 1989, *Vox Sang*, 56, 1-20.
3. T. Boren, P. Falk, K. A. Roth, G. Larson y S. Nonnark, "Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens", *Science*. 262, 1892, 1993.
4. D. Ilver, A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand y T. Boren, "*H. pylori* Adhesin Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging", *Science*, 279, 373-377, 1998.
5. M. Gehard, N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen y C. Prinz, "Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesion", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 96, 12778-12783, 1999.
6. H. Miyabayashi, K. Furihata, T. Shimizu, I. Ueno, T. Akamatsu, "Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*", *Helicobacter*, 5, 30-37, 2000.
7. P. Falk, K. A. Roth, T. Boren, T. U. Westblom, J. I. Gordon y S. Normark, "An *in vitro* adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 2035, 1993.
8. Cooper H.S., Murthy S.N.S., Shah R.S. y Sedergran D.J. (1993): Clinico- pathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69: 238-249.
9. Mahler M., Bristol I. J., Leiter E.H., Workman A.E., Birkenmeier E.H., Elson CO. y Sundberg J.P. (1998): Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol.* 274: G544-551.
10. Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y. y Nakaya R. (1990): A novel method in the induction of reliable experimental and acute chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98: 694-702.

REIVINDICACIONES

1. Un producto de salvado de centeno fermentado, caracterizado por obtenerse por fermentación de salvado de centeno con cepa de *Lactobacillus curvatus* Lb14 (DSMZ N° de depósito 13890) que tiene la capacidad de producir, tras la fermentación, un producto de salvado de centeno activado que tiene la capacidad de inhibir por competición, tras su consumo, la adherencia y colonización de patógenos oro-gastrointestinales (OGIP) en seres humanos y animales.
2. El producto de salvado de centeno fermentado de la reivindicación 1, caracterizado por comprender el sobrenadante del caldo de fermentación obtenido por fermentación del salvado de centeno con la cepa de *Lactobacillus curvatus* Lb14 (DSMZ N° de depósito 13890).
3. Uso del producto de salvado de centeno fermentado de la reivindicación 1 y 2 para la preparación de un producto alimentario que tenga la propiedad, tras el consumo del mismo, de inhibir por competición la adherencia y colonización de OGIP en seres humanos y animales.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, para la preparación de un producto alimentario apetitoso en forma de una bebida, pan o muesli.
5. Un producto alimentario para uso en el tratamiento de seres humanos y animales que padecen infecciones por OGIP, caracterizado por comprender el producto de salvado de centeno fermentado de la reivindicación 1 y opcionalmente otros ingredientes aceptables para formar un producto alimentario apetitoso.
6. El producto alimentario de la reivindicación 5 para uso en el tratamiento de infecciones por *Helicobacter pylori*, *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en seres humanos e infecciones por *Escherichia coli* y *Clostridium perfringens* en animales domésticos y mascotas.
7. Un método para preparar el producto de salvado de centeno fermentado de la reivindicación 1, caracterizado por someter el salvado de centeno a fermentación por la cepa de *Lactobacillus curvatus* Lb14 (DSMZ N° de depósito 13890) y recoger el producto del caldo de fermentación.

Figura 1A

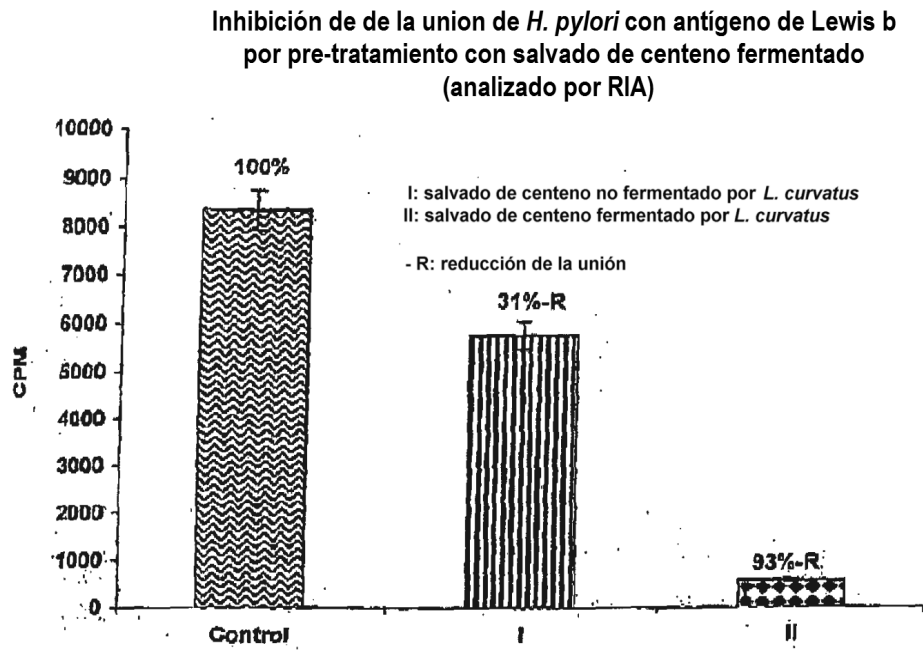


Figura 2

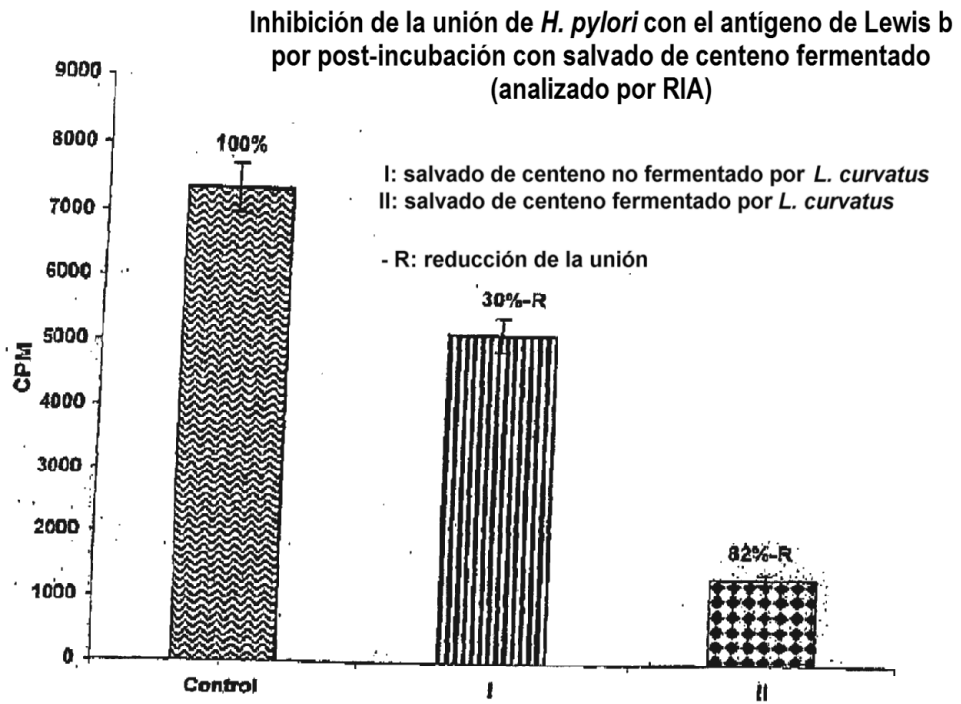


Figura 3A

Inhibición de la adherencia de *H. pylori* con epitelio gástrico, *In Situ*, por pre-tratamiento con salvado de centeno fermentado

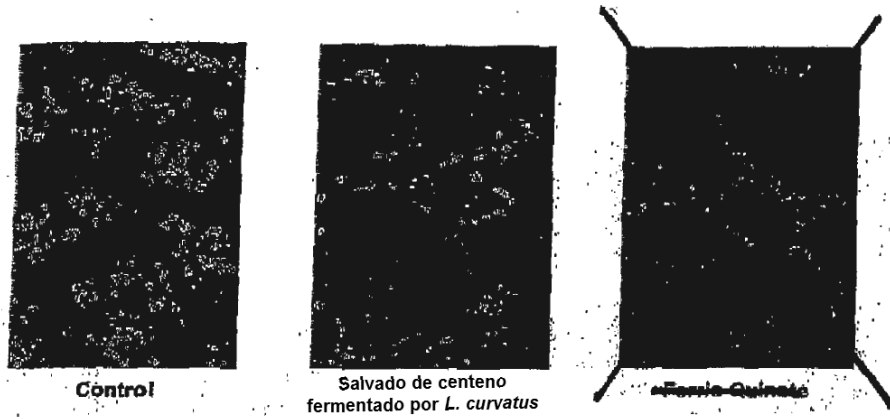


Figura 3B

Cuantificación de la adherencia de *H. pylori* con epitelio gástrico, *In situ*

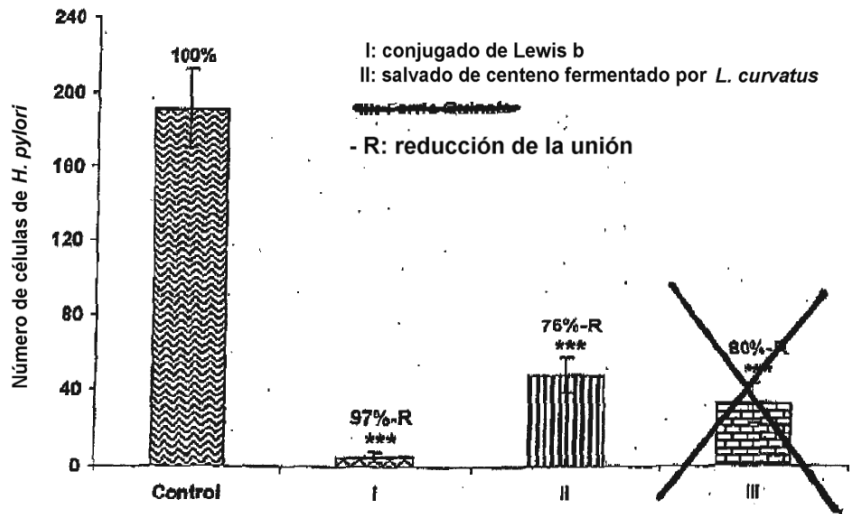


Figura 4

Inhibición de la unión de *H. pylori* con el antígeno de Lewis b por pre-tratamiento con salvado de centeno fermentado tratado por calor (analizados por RIA)

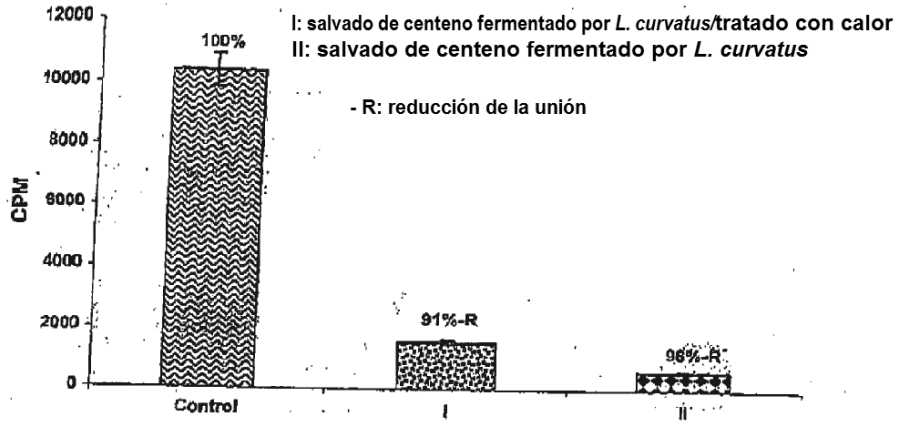


Figura 5

Inhibición de *H. pylori* para el antígeno de Lewis b por pre-tratamiento con diversos cereales fermentados (analizados por RIA)

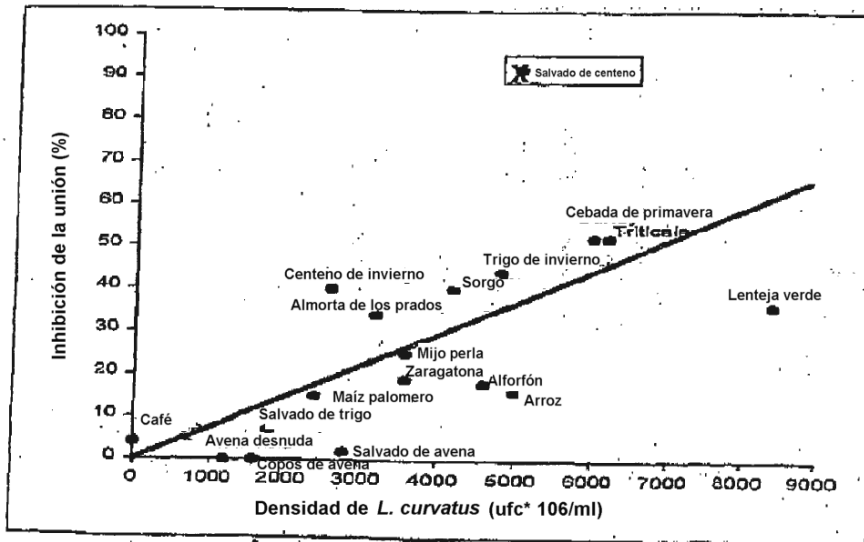


Figura 6A

Tratamiento de voluntarios humanos con
 producto de salvado de centeno
 fermentado potable IBran™

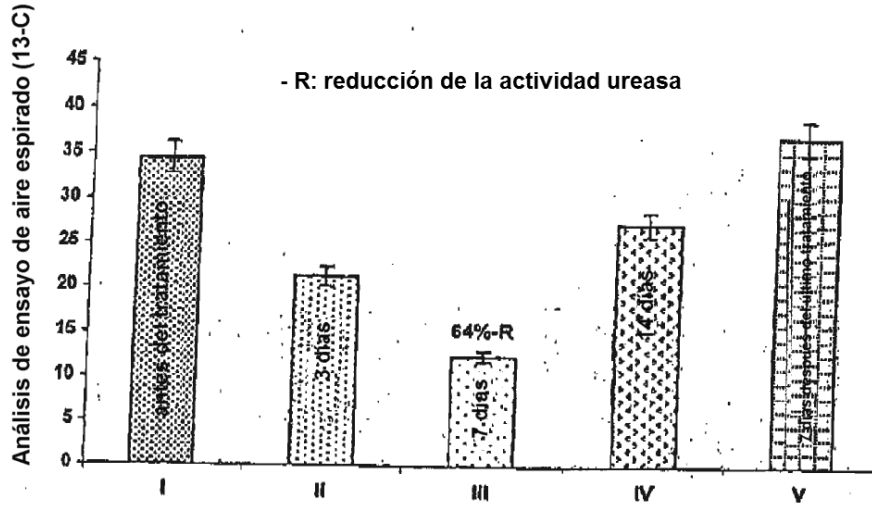


Figura 6B

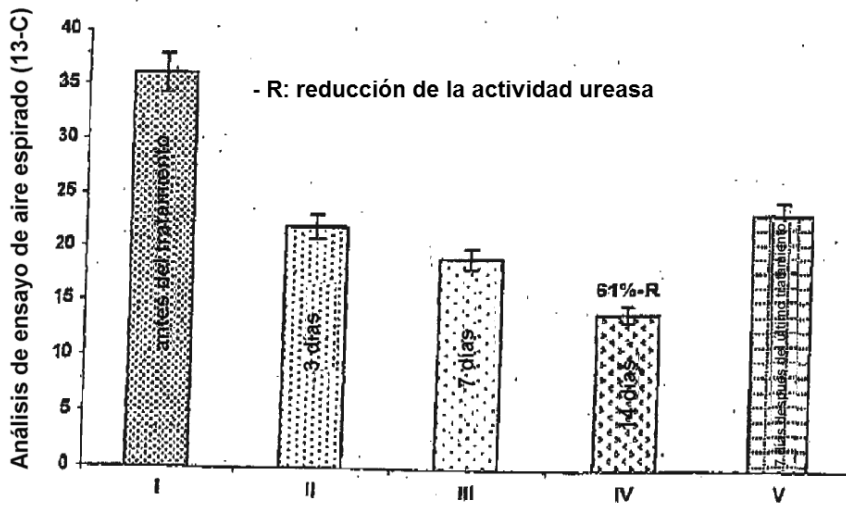


Figura 6C

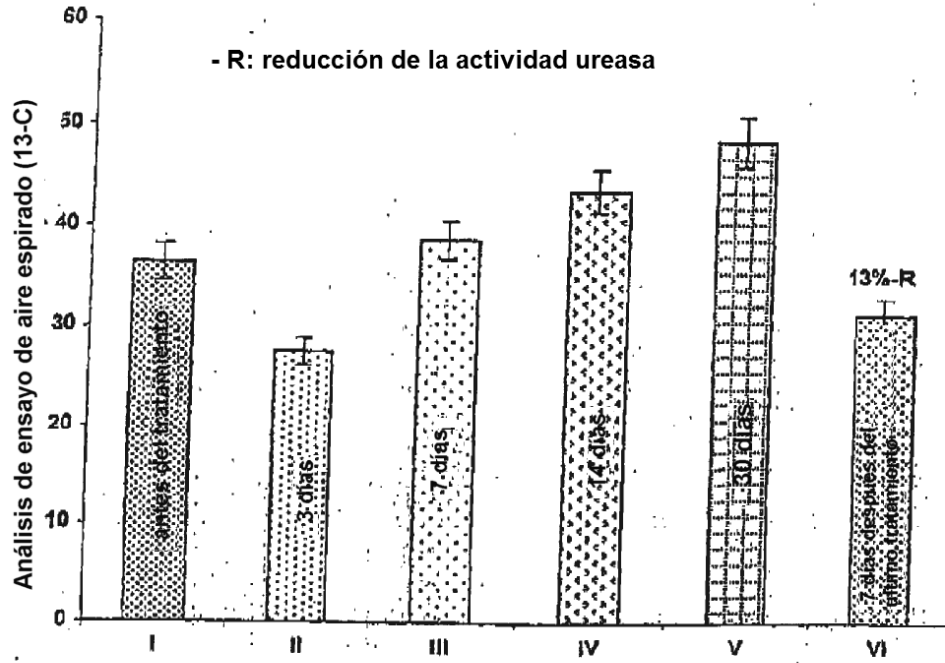


Figura 6D

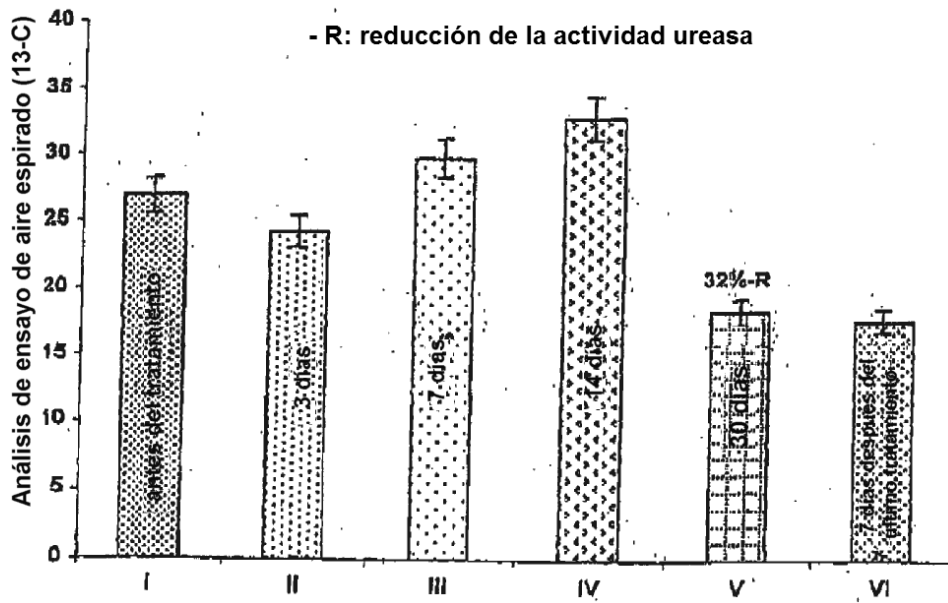


Figura 6E

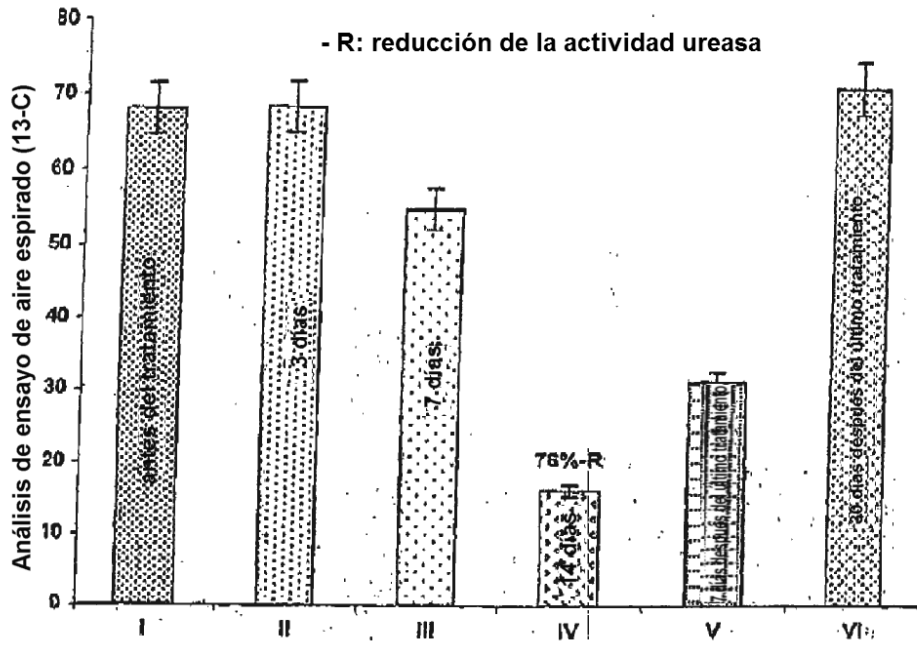


Figura 6F

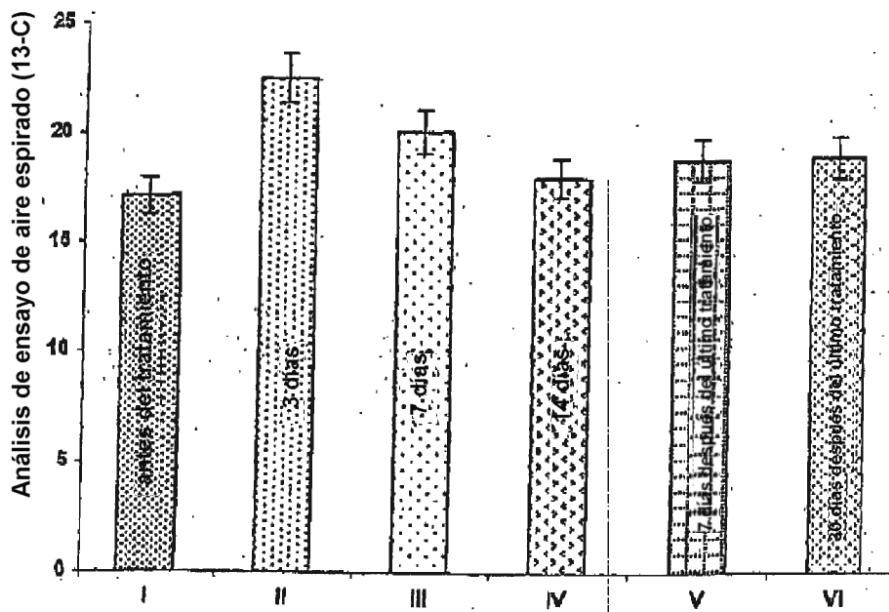


Figura 7A

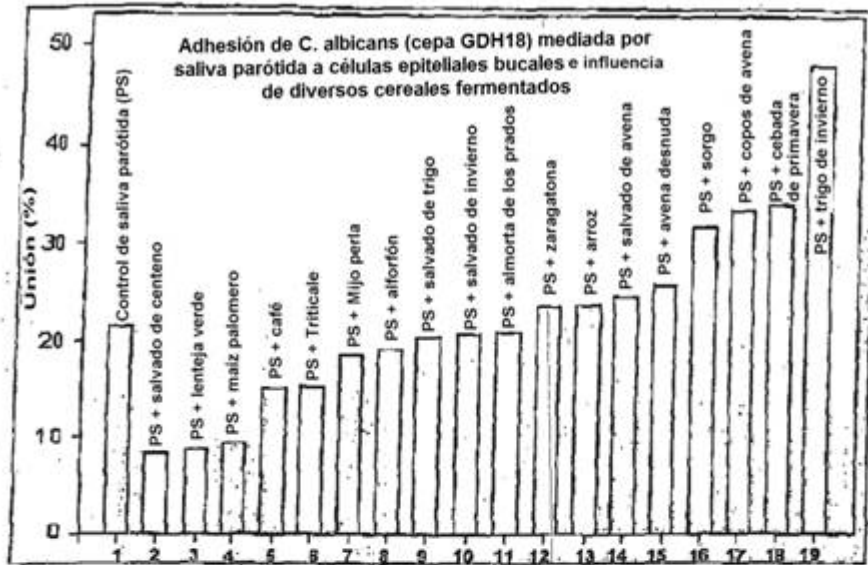


Figura 7B

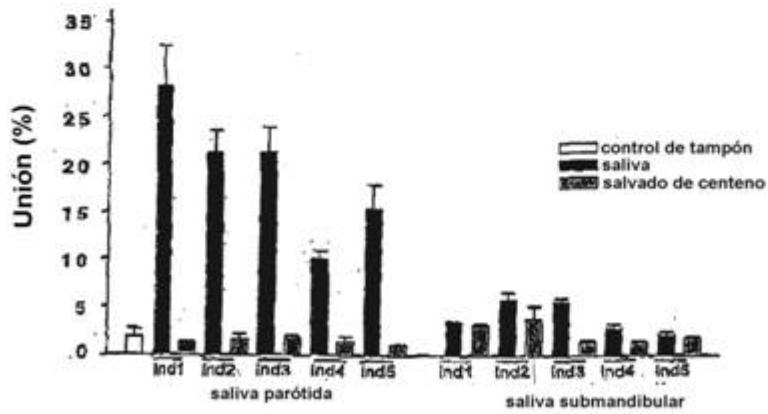


Figura 8

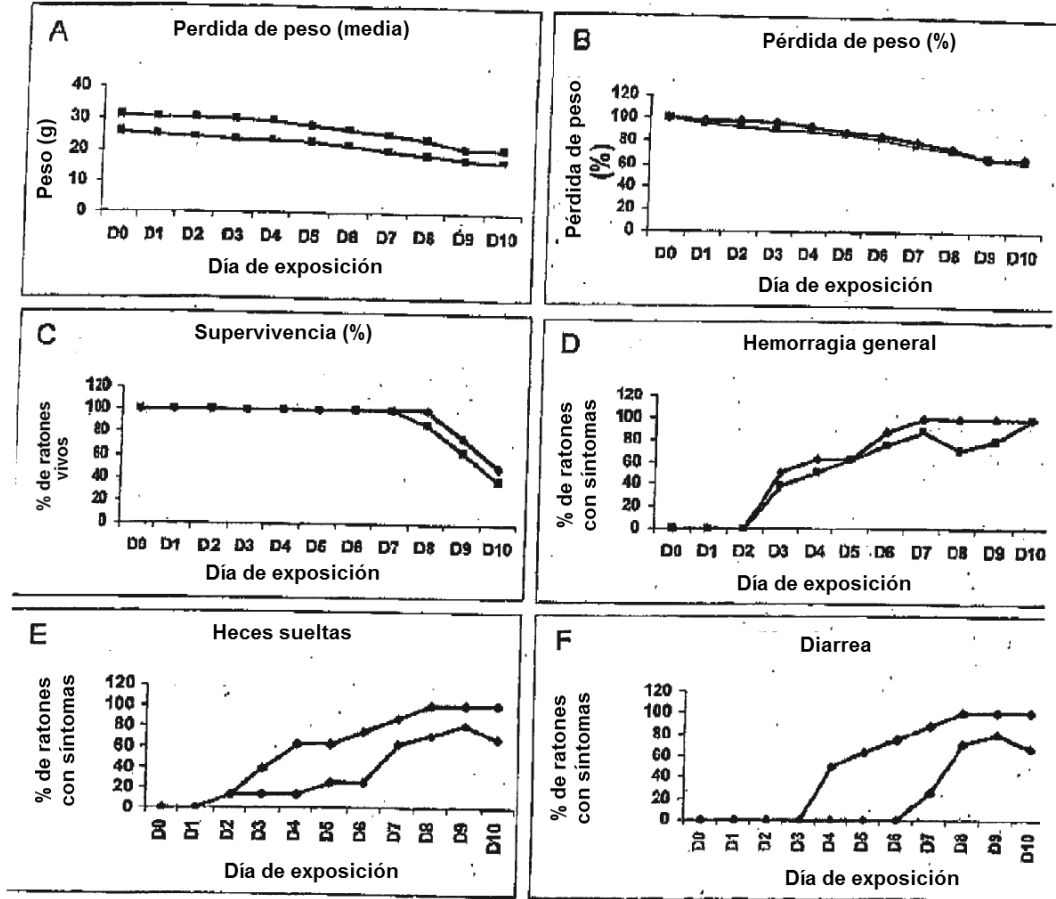


Figura 9

