

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 209**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C12N 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.04.2009 E 09735168 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2270133**

54 Título: **Método de obtención de una nueva cepa de Bifidobacterium bifidum con actividad frente a la infección por Helicobacter pylori**

30 Prioridad:

22.04.2008 ES 200801154

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

09.09.2015

73 Titular/es:

CORPORACIÓN ALIMENTARIA PEÑASANTA (CAPSA) (100.0%)

Sierra de Granda, s/n

33199 Granda - Siero, Asturias, ES

72 Inventor/es:

ECHEVARRIA, FRANCISCO JAVIER;

IGLESIAS BARCIA, JOSÉ RAMÓN;

BALBARIE, PHILIPPE;

CASINOS RAMO, BEATRIZ;

CHENOLL CUADROS, EMPAR;

ENRIQUE LÓPEZ, MARÍA;

BATALLER LEIVA, ESTHER;

GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR y

RAMÓN VIDAL, DANIEL

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 545 209 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).

Método de obtención de una nueva cepa de *Bifidobacterium bifidum* con actividad frente a la infección por *Helicobacter pylori*

DESCRIPCIÓN

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de una nueva cepa de la especie *Bifidobacterium bifidum* que es capaz de inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) por un mecanismo molecular presente en esta cepa y ausente en otras cepas del mismo género. La utilización de este microorganismo puede aplicarse en los sectores agroalimentario y farmacéutico.

10

Estado de la técnica

La primera descripción de la bacteria patógena *Helicobacter pylori* la dio Giulio Bizzozero¹ en 1892 al detectar la presencia de los llamados gérmenes espirales en la mucosa gástrica de perros. Hubo que esperar casi noventa años para que Robin Warren y Barry Marshall^{2,3} logaran en 1983 cultivar por primera vez esta bacteria patógena y relacionaran su presencia con la gastritis y la úlcera péptica, aunque no se ha detectado su presencia en los jugos pancreáticos de pacientes afectados por pancreatitis crónica (Gasbarrini *et al.*, 2000)⁴. Dicho descubrimiento fue recibido con escepticismo por la clase médica, pero dos décadas después, Warren y Marshall demostraron de forma concluyente esta relación obteniendo el premio Nobel de medicina en 2005 por sus trabajos (Gisbert *et al.*, 2004)⁵. Desde entonces *H. pylori* se ha convertido en uno de los microorganismos cuyo nombre es reconocido por gran parte de la población. La razón para esta fama se debe a la gran prevalencia de la infección por dicho patógeno. Se considera que el 50 % de la población mundial es portadora de *H. pylori*. En países desarrollados esta cifra se sitúa entre el 15 y el 40 % de la población pero en países en desarrollo aumenta hasta el 80 %, al llegar a implicar al 80 % de los niños menores de diez años (Taylor y Blazer, 1991)⁶.

15

20

25

Desde el punto de vista clínico, *H. pylori* es importante por tres motivos (Gisbert *et al.*, 2004)⁵. Su infección es la causa más frecuente de úlcera péptica, de forma que se estima que el 20 % de los individuos infectados con este patógeno desarrollan una úlcera en algún momento de su vida (Peterson, 1991⁷; Solnick y Tompkins, 1992⁸). Además, en 1994, la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer establecieron que existía una evidencia epidemiológica e histológica suficiente para concluir que *H. pylori* es el principal factor de riesgo para la aparición de cáncer gástrico (Eurogast Study Group, 1993⁹; Chong *et al.*, 1994¹⁰). Estudios posteriores han reafirmado esta aseveración hasta el extremo que se sugiere que el incremento de riesgo de cáncer gástrico que implica la infección por *H. pylori* es equiparable al que conlleva el consumo de tabaco en la neoplasia de pulmón. Finalmente, se considera que *H. pylori* es responsable de un tipo poco frecuente de linfoma, el denominado linfoma tipo MALT gástrico, al provocar la inflamación crónica del tejido linfoide que da lugar al desarrollo de la enfermedad (Vilella *et al.*, 2003)¹¹. Por todo ello son muchos los autores que recomiendan eliminar la infección por *H. pylori* siempre que se detecte (Fox y Wang, 2001)¹².

30

35

40

En la actualidad no existe tratamiento frente a la infección por *H. pylori* que asegure una tasa de curación completa (Gasbarrini *et al.*, 2000)⁴. Por ello se habla de "estrategia terapéutica" para combatir el patógeno. La más usada es la llamada triple terapia que consiste en dar un tratamiento entre 7 y 10 días con amoxicilina, claritromicina e inhibidores de la bomba de protones que tiene una eficacia en el entorno del 70-80 % (Lind *et al.*, 1996¹³; The *Helicobacter pylori* Study Group, 1997¹⁴). Las causas principales de fracaso en el tratamiento son la falta de interés del paciente (hay que tomar muchas pastillas por día y hay efectos secundarios desagradables), la prescripción inapropiada y la presencia de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos utilizados (Deltenre *et al.*, 1998)¹⁵. Cuando fracasa se hace preciso acudir a un tratamiento denominado "pauta cuádruple" que combina un inhibidor de la bomba de protones, metronidazol, subcitato de bismuto y tetraciclina durante 7 a 14 días (Graham *et al.*, 1991)¹⁶. Aún así continúa habiendo fracasos, por lo que sería deseable la existencia de nuevas terapias o, sobre todo, de mecanismos preventivos de la infección por *H. pylori*.

45

50

En 1989, Bhatia y colaboradores demostraron en experimentos con cocultivos que un aislado comercial de *Lactobacillus acidophilus* era capaz de competir e inhibir el crecimiento *in vitro* de *H. pylori* (Bhatia *et al.*, 1989)¹⁷. Posteriormente se han podido comprobar inhibiciones similares, si bien utilizando sobrenadantes de cultivo libres de células de una cepa concreta que se añadían a un cultivo de *H. pylori*. Esta aproximación ha sido exitosa con *Lactobacillus acidophilus* (Mrda *et al.* 1998¹⁸, Gasbarrini *et al.* 2004¹⁹), en concreto con las cepas denominadas CRL639 (Lorca *et al.*, 2001)²⁰, LB (Coconnier *et al.*, 1998)²¹, La1 (Michetti *et al.*, 1999)²² y *Shirota* (Sgouras *et al.*, 2004)²³, y también con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Mrda *et al.* 1998)¹⁸ y con mezclas de las cepas *L. acidophilus* R0052 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 (Johnson-Henry *et al.*, 2004)²⁴. En todos los casos existe una especificidad de cepa muy considerable (Hamilton-Miller, 2003)²⁵. También se ha detectado actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori* con sobrenadantes libres de células de *Bacillus subtilis* (Pinchuk *et al.*, 2001)²⁶ y *Weissella confusa* (Nam *et al.*, 2002)²⁷, y con el de varias bacterias propias de la cavidad oral como *Fuseobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella oris*, *Streptococcus*

55

60

mitis, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sobrinus* (Ishihara *et al.*, 1997)²⁸. Este último resultado podría explicar la falta de eficacia de *H. pylori* en la colonización de la cavidad oral.

Parecen existir varios motivos por los que bien estas bacterias, bien un metabolito secretado por las mismas al medio de cultivo, inhiben el crecimiento de *H. pylori*. Dado que muchas de las cepas seleccionadas son bacterias del ácido láctico se ha sugerido el posible efecto bactericida del ácido láctico o de algún otro ácido orgánico sobre *H. pylori* (Bathia *et al.*, 1989¹⁷; Aiba *et al.*, 1998²⁹; Hamilton-Miller, 2003²⁵). Sin embargo, en la mayoría de los casos se ha especificado que el efecto lítico se debe a un metabolito secretado al medio de cultivo distinto del ácido láctico, sugiriéndose en ocasiones la existencia de antibióticos (Pinchuk *et al.*, 2001)²⁶, autolisinas (Lorca *et al.*, 2001)²⁰ o bacteriocinas (Nam *et al.*, 2002)²⁷.

En experimentación con cultivos celulares *in vitro*, se ha podido comprobar la competencia por la unión a células de epitelio gástrico murino o células de carcinoma gástrico humano entre *H. pylori* y *L. acidophilus*, *L. brevis* o *L. salivarius* cepa WB1004 (Kabir *et al.*, 1997)³⁰. Como consecuencia, mediante el empleo de estas cepas de bacterias del ácido láctico se reduce la secreción de interleuquina-8 (Kabir *et al.*, 1997)³⁰. Se ha demostrado un efecto similar de reducción en la producción de interleuquina-8 usando la cepa *Lactobacillus gasseri* OLL2716 (Ushiyama *et al.*, 2003)³¹. Incluso se ha sugerido que la competencia por receptores glicolípidicos entre *H. pylori* y *Lactobacillus reuteri* podría ser una estrategia a partir de la cual usar esta última bacteria como probiótico eficaz contra *H. pylori* (Mukai *et al.*, 2002)³².

Todos estos resultados *in vitro* han sido refrendados con experimentación preclínica *in vivo* con modelos animales, sobre todo usando ratones libres de gérmenes (GF por las siglas en inglés de “germ-free”) o ratones libres de patógeno específico (SPF por las siglas en inglés de “specific pathogen free”). Kabir y colaboradores demostraron en 1997 que al alimentar ratones GM con la cepa *L. salivarius* WB1004 estos quedaban protegidos frente a una infección posterior por *H. pylori* (Kabir *et al.*, 1997)³⁰. Al hacer el experimento contrario, es decir, producir primero la infección por *H. pylori* y posteriormente alimentar los ratones con la cepa *L. salivarius* WB1004, los conteos del patógeno bajaban hasta el 1 % en comparación con los animales no alimentados con la bacteria del ácido láctico (Kabir *et al.*, 1997)³⁰. Estos experimentos han sido repetidos en otros laboratorios (Aiba *et al.*, 1998)²⁹. También se dispone de resultados similares usando frente a *H. pylori* la cepa *L. gasseri* OLL2716 (Ushiyama *et al.*, 2003)³¹ y utilizando una mezcla de las cepas prebióticas *L. acidophilus* R0052 y *Lactobacillus rhamnosus* R0011 (Johnson-Henry *et al.*, 2004)²⁴. Recientemente, Sgouras y colaboradores han demostrado la inhibición de *H. pylori* por *L. casei* cepa *Shirota* en experimentos similares pero utilizando ratones SPF (Sgouras *et al.*, 2004)²³. Hasta la fecha sólo existe un estudio de protección usando ratones convencionales que fue llevado a cabo con éxito utilizando la cepa *L. acidophilus* LB, si bien los animales de experimentación fueron infectados con *Helicobacter felis* en lugar de con *H. pylori* (Coconnier *et al.*, 1998)²¹.

En cuanto a la investigación clínica con voluntarios humanos, conviene diferenciar los dos modelos experimentales utilizados hasta la fecha. El primero de ellos consiste en combinar el tratamiento probiótico con la administración de antibióticos eficaces contra *H. pylori* (para una revisión consultar Hamilton-Miller, 2003)²⁵. En el segundo la bacteria con el posible efecto probiótico se ingiere de forma aislada, ya sea como liofilizado o en un derivado lácteo. Con respecto al tratamiento combinado, hasta la fecha se han llevado a cabo siete ensayos, cuatro de ellos con sujetos asintomáticos utilizando *Lactobacillus* GG o *L. johnsonii* cepa La1 (Armuzzi *et al.*, 2001a³³ y b³⁴; Felley *et al.*, 2001³⁵; Cremonini *et al.*, 2001³⁶) y el resto con pacientes dispépticos usando *L. acidophilus* (Canducci *et al.*, 2000³⁷; De Francesco *et al.*, 2000³⁸; Sheu *et al.*, 2002³⁹). La dificultad de estos ensayos es determinar hasta qué grado el efecto detectado se debe al probiótico o al tratamiento farmacológico. Aun así, en seis de los siete ensayos se concluye un efecto positivo de la adición del probiótico (Canducci *et al.*, 2000³⁷; Armuzzi *et al.*, 2001a³³ y b³⁴; Felley *et al.*, 2001³⁵; Cremonini *et al.*, 2002³⁶; Sheu *et al.*, 2002³⁹). En el caso de usar sólo el probiótico se han llevado a cabo ocho ensayos clínicos. En un ensayo se ingirieron sobrenadantes de cultivo de *L. johnsonii* (Michetti *et al.*, 1999²²). En el resto, se formularon distintos derivados lácteos que contenían la cepa objeto de estudio (Mrda *et al.*, 1993⁴⁰; Scholz-Ahrens & Schrezenmeir, 2000⁴¹; Nakaji *et al.*, 2001⁴²; Wendakoon *et al.*, 2002⁴³). Sólo tres de estos ensayos fueron aleatorios y con un control con placebo lo que dificulta el análisis de los resultados. Tan sólo en uno de los ocho ensayos clínicos no se detectó efecto positivo (Wendakoon *et al.*, 2002⁴³). En el resto, en mayor o menor medida, se obtuvieron mejoras significativas en el estado general de los individuos.

En el campo de la invención existen diversos documentos que utilizan antibióticos para erradicar *H. pylori* en el caso de trastornos intestinales como por ejemplo la patente EP 0787494 A1 en el que se describe el uso de derivados de rifamicina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades causadas por infecciones de *H. pylori*. Igualmente, en el documento EP 0866793 A1 se describen compuestos antibacterianos de nitroimidazol y su uso contra *H. pylori* y *Mycobacterium tuberculosis*.

El documento EP 1092040 A1 se refiere a un procedimiento para seleccionar moléculas capaces de inhibir *in vivo* la supervivencia de *Helicobacter*, en particular de *H. pylori*, mediante la inhibición específica de la actividad ureasa codificada en el gen *UreI* y al uso de estas moléculas para tratar o prevenir la infección por *H. pylori*.

Algunos documentos utilizan probióticos para erradicar el *H. pylori* en caso de trastornos gastrointestinales. El

documento JP 2002322086 se refiere a un agente activo, concretamente la lactoferrina, que se utiliza como agente profiláctico o terapéutico contra la infección de *H. pylori*. Para ello, se incorpora a bebidas o comidas para tratar la infección de *H. pylori*. Además de la lactoferrina, dicho agente profiláctico o terapéutico contra la infección de *H. pylori* comprende al menos un microorganismo perteneciente al género *Bifidobacterium*.

5 El documento de patente US 6329002 B1 se refiere a un alimento para inhibir la infección y tratar la gastritis y las úlceras gástricas y de duodeno, que sea efectivo contra *H. pylori* no solo *in vitro* sino también *in vivo* y que comprenda una cantidad efectiva de un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en cepas vivas de *Lactococcus* sp. HY49, *Lactobacillus casei* HY 2782 y *Bifidobacterium longum* BY 8001. Las propiedades de dichas bacterias se incrementan por la adición de yema de huevo que contiene anticuerpos específicos contra *H. pylori*.
10 Igualmente, en el documento de patente JP 2001258549 se han seleccionado los probióticos *L. acidophilus* HY2177 y *L. casei* 274 que tienen actividad contra *H. pylori* K551, obtenido de la úlcera del estómago de un paciente, para hacer preparaciones contra *H. pylori*.

15 En el documento de patente KR 20020061040 se describen productos lácticos para la inhibición del crecimiento de *H. pylori* que contienen *L. gasseri*, *L. acidophilus* M y *Bifidobacterium lactis* Bb-12, o sus productos de cultivo. Dichos productos se utilizan para prevenir y tratar la gastritis y las úlceras duodenales, entre otras, minimizando los efectos secundarios de los antibióticos que se utilizan en el tratamiento contra *H. pylori*.

20 En el documento de patente WO 03/051132 A1 la invención se refiere a un método para preparar alimentos fermentados que eliminan *H. pylori* y/o bacilos que envenenan los alimentos. Dicho método comprende los pasos de: a) inocular fermentos lácticos en los alimentos, seleccionados dichos fermentos lácticos del grupo que consiste en el género *Lactobacillus*, el género *Bifidobacterium*, preferiblemente la especie *B. infantis*, el género *Streptococcus* y sus mezclas, siendo seleccionados dichos alimentos del grupo que consiste en granos, fruta, vegetales, y sus mezclas; y b) incubando dichas mezclas inoculadas a 15-35 °C durante 12-48 horas.

25 El documento de patente WO 00/74712 A2 se refiere a una composición dietética, nutritiva o farmacéutica que comprende esfingomielinasa alcalina en una cantidad suficiente para ejercer un efecto dietético, nutricional o terapéutico en un individuo que lo necesite, como por ejemplo para prevenir o tratar distintas condiciones patológicas que incluyen procesos cancerígenos, inflamación del intestino, hipercolesterolemia e infecciones por *H. pylori*. La esfingomielinasa puede ser de origen bacteriano, y las bacterias que la contienen se eligen entre Gram-positivas, Gram-negativas y bacterias del ácido láctico, o de mezclas de las mismas. Entre las bacterias del ácido láctico se mencionan 16 cepas del género *Lactobacillus*, 12 del género *Bifidobacterium* como la especie *B. bifidum*, y 3 del género *Streptococcus*.

30 En el documento de patente WO 2007/01097 A1 se describe una cepa de la especie *Bifidobacterium bifidum* que posee las características siguientes: (1) produce el efecto de matar *Helicobacter pylori*, y (2) muestra una supervivencia de un 10 % o más en el caso de estar almacenado en una bebida de leche fermentada o alimentos en condiciones aeróbicas a 10 °C durante 14 días.

40 Sin embargo, todavía existe una necesidad urgente, tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo, de productos y métodos efectivos tanto en la prevención como en el tratamiento contra las infecciones causadas por *H. pylori*, de forma aislada o bien asociada con la terapia de antibióticos u otros agentes activos.

45 Buena parte de los trabajos mencionados en los párrafos anteriores describen la inhibición *in vitro* del crecimiento de *H. pylori*, pero no progresan en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a dicho fenómeno y al uso industrial de esta propiedad. En este documento se describe la obtención de una cepa de la especie *Bifidobacterium bifidum*, aislada de heces de un niño sano menor de un año, alimentado con leche materna. Dicha cepa es capaz de inhibir el crecimiento de distintos aislados clínicos de *H. pylori*. Sin descartar que dicha inhibición sea debida en parte a un fenómeno de competencia natural, los resultados que se presentan en esta invención demuestran de forma concluyente que diversos metabolitos de naturaleza peptídica presentes en el medio de cultivo de la cepa *B. bifidum* objeto de estudio son los responsables de dicha inhibición. Otras cepas de diferentes especies del género *Bifidobacterium*, e incluso otras cepas de la especie *B. bifidum*, no presentan este fenotipo de producción de dicho complejo peptídico. Dichos péptidos han sido identificados como productos de la degradación enzimática de la caseína. Como consecuencia, resulta posible formular diversos alimentos y bebidas que contengan dicho microorganismo y caseína, de forma que el microorganismo al crecer y secretar una proteasa libere el complejo peptídico inhibidor de *H. pylori*, o bien añadir directamente al alimento o bebida el complejo peptídico obtenido por otros medios industriales.

60 Descripción de la invención

La presente invención describe un procedimiento para la obtención de agentes con actividad anti-*H. pylori*, y por tanto efectivos en el tratamiento de la úlcera. Durante la presente invención, los inventores han investigado el efecto inhibidor de *H. pylori* por parte de diferentes bacterias aisladas de heces. Esta invención se basa en la utilización de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo como CECT 7366 el 28 de

enero de 2008. El efecto inhibitor se ha observado con el sobrenadante de cultivo de la cepa CP5 crecida en presencia de cisteína. La cepa de la invención es activa frente a la infección por *H. pylori* tal y como se demuestra en las pruebas de adhesión *in vitro*. Los inventores han encontrado que el sobrenadante de esta cepa, posee probada actividad anti-*H. pylori*.

5 La cepa CP5 mantiene una viabilidad del 88 % al menos durante un periodo de 15 días cuando se añade a un derivado lácteo mantenido a 5 °C.

10 Además, es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones dietéticas, nutricionales y/o farmacéuticas que sean efectivas en la profilaxis de una infección por *H. pylori*. Son composiciones farmacéuticas aquellas que son útiles únicamente por sus efectos terapéuticos o profilácticos, y que generalmente se componen solo del principio activo (en este caso un liofilizado de la cepa CP5 de *B. bifidum*) con uno o más vehículos apropiados que dependen de la forma galénica del medicamento. Son composiciones dietéticas aquellas que comprenden además del agente activo materias nutritivas y otros suplementos nutricionales.

15 Objeto de la invención

La presente invención describe un procedimiento para la obtención de agentes con actividad anti-*H. pylori*, y por tanto efectivos en el tratamiento de la úlcera. Durante la presente invención, se ha investigado el efecto inhibitor de *H. pylori* por parte de diferentes bacterias aisladas de heces. Una de ellas es la cepa de *B. bifidum*, denominada CP5, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo de Microorganismos (CECT) con el número de acceso CECT 7366. El efecto inhibitor se ha observado con el sobrenadante de cultivo de la cepa CP5 crecida en presencia de cisteína, que posee probada actividad anti-*H. pylori*, así como con la fracción de fase inversa que contiene los péptidos SEC ID Nº: 1-6, obtenida a partir de dicha cepa bacteriana.

25 La presente invención describe la caracterización detallada de la cepa CP5, objeto de la presente invención, así como la obtención de los péptidos activos del sobrenadante de la cepa después de su fermentación, y su actividad anti-*H. pylori*.

30 En la presente solicitud se describe la obtención de una cepa de la especie *B. bifidum*, aislada de heces de un niño sano menor de un año, alimentado con leche materna. Dicha cepa es capaz de inhibir el crecimiento de distintos aislados clínicos de *H. pylori* y de varias cepas de referencia. Sin descartar que dicha inhibición sea debida en parte a un fenómeno de competencia natural, los resultados que se presentan en esta invención demuestran de forma concluyente que diversos metabolitos de naturaleza peptídica presentes en el medio de cultivo de la cepa *B. bifidum* objeto de estudio son los responsables de dicha inhibición. Otras cepas de diferentes especies del género *Bifidobacterium*, e incluso otras cepas de la especie *B. bifidum*, no presentan este fenotipo de producción de dicho complejo peptídico. Dichos péptidos han sido identificados como productos de la degradación enzimática de la caseína. Como consecuencia, resulta posible formular diversos alimentos y bebidas que contengan dicho microorganismo y caseína, de forma que el microorganismo al crecer y secretar una proteasa libere el complejo peptídico inhibitor de *H. pylori*, o bien añadir directamente al alimento o bebida el complejo peptídico obtenido por otros medios industriales, es decir, su utilización como agente probiótico en alimentos.

Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 muestra una comparación de los perfiles electroforéticos obtenidos de la amplificación de la cepa CP5 con los cebadores BIF (A) y RFL-2 (B) en comparación con otras cepas de *Bifidobacterium* spp. y bacterias del ácido láctico.

En la figura 1A, las distintas calles corresponden a:

50 1. *B. longum* CECT 7210; 2. *B. gallicum* CECT 5778; 3. *B. angulatum* CECT 5775; 4. *B. dentium* CECT 687; 5. *Lactobacillus rhamnosus* BP2; 6. Marcador Peso Molecular 100 pb; 7. *Enterococcus faecalis* BP1; 8. *B. longum* CECT 4503; 9. *B. adolescentis* 5781; 10. *E. faecalis* BP17; 11. *B. infantis* CECT 4552; 12. *B. cuniculi* DSM 20435; 13. Marcador Peso Molecular 100 pb; 14. *B. breve* CECT 4839; 15. *B. bifidum* CECT 7366.

En la figura 1B, las distintas calles corresponden a:

55 1. *B. longum* CECT 7210; 2. *B. gallicum* CECT 5778; 3. *B. angulatum* CECT 5775; 4. *B. dentium* CECT 687; 5. *L. rhamnosus* BP2; 6. *E. faecalis* BP1; 7. Marcador Peso Molecular 100 pb; 8. *B. longum* CECT 4503; 9. *B. adolescentis* 5781; 10. *E. faecalis* BP17; 11. *B. breve* CECT 4839; 12. *B. bifidum* CECT 7366; 13. Marcador Peso Molecular 100 pb

La Figura 2 muestra el ensayo de la resistencia a sales biliares de las cepas seleccionadas con crecimiento a 37 °C durante 24 horas en anaerobiosis.

60 La figura 3 muestra el efecto de las distintas concentraciones de NaCl sobre el crecimiento de las cepas seleccionadas con crecimiento a 37 °C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis.

La Figura 4 muestra la producción en sobrenadante de cultivo de ácido láctico (D/L) por la cepa CP-5.

Descripción detallada de la invención

La cepa de la invención es activa frente a la infección por *H. pylori* tal y como se demuestra con el sobrenadante resultante de la fermentación de la cepa en las pruebas de adhesión *in vitro*. Se han aislado distintas fracciones conteniendo al menos uno de los péptidos SEC ID N°: 1 a 6 que inhiben el crecimiento de *H. pylori* en al menos un 70 %, preferiblemente un 80 % y más preferiblemente un 90 %. Concretamente se ha aislado una fracción de dicho sobrenadante que posee un valor de inhibición de *H. pylori* del 94,77 % probablemente debido a la presencia de todos los péptidos específicos que se han identificado como SEC ID N°: 1 a 6.

La utilización de la cepa CP5 se lleva a cabo en forma de células viables y no-viables. Las células viables se utilizan introduciendo las bacterias vivas en una composición sin fermentar. De esta forma la administración de tales composiciones permite que la actividad anti-*Helicobacter pylori* tenga lugar en el tracto gastrointestinal.

Las células viables y no-viables resultan de la exposición de la cepa CP5 a fermentación en un medio adecuado, como por ejemplo un medio lácteo, para que se produzcan los polipéptidos denominados SEC ID N°: 1 a 6.

Igualmente forman parte de la invención cultivos bacterianos obtenidos a partir de la cepa CP5 que comprenden células viables y/o células no viables que contienen al menos uno de los péptidos SEC ID N°: 1 a 6.

También es un objeto de la presente invención proporcionar composiciones dietéticas o nutricionales y/o farmacéuticas que sean efectivas en la profilaxis de una infección por *H. pylori*. La cepa CP5 se puede utilizar en forma de células viables y actúa como probiótico. De acuerdo con la definición adoptada por la FAO, probióticos son "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas proporcionan un beneficio a la salud del hospedador" y generalmente se utilizan como tal algunas levaduras y bacterias, siendo las más utilizadas las bacterias del género *Lactobacillus*.

Son composiciones dietéticas aquellas que comprenden además del agente activo otras materias y suplementos nutricionales. El sobrenadante de la cepa CP5 tiene una viabilidad del 88 % al menos durante un periodo de 15 días cuando se añade a un derivado lácteo mantenido a 5 °C. Dichas composiciones se pueden mezclar con otros probióticos, por ejemplo en yogures.

Son composiciones farmacéuticas aquellas que son útiles únicamente por sus efectos terapéuticos y/o profilácticos, y que generalmente se componen solo del principio activo (en este caso un cultivo o un liofilizado de la cepa CP5 de *B. bifidum* o péptidos obtenidos del sobrenadante de la fermentación de dicha cepa con uno o más adyuvantes y/o vehículos apropiados que dependen de la forma galénica del medicamento.

Dependiendo del tipo de composición, nutritiva o farmacéutica, y de la forma física o galénica de la misma, el experto en la materia sabe elegir los excipientes y vehículos apropiados.

En dichas composiciones, la cepa CP5 está presente en una cantidad de aproximadamente 10^5 a 10^{11} ufc/g, siendo "ufc" unidad formadora de colonias (en inglés "cfu") que se define como "el número de células bacterianas que se detectan por contaje microbiológico en placas de agar por gramo de composición".

A continuación se describe la caracterización de la cepa CP5, así como los péptidos aislados del sobrenadante después de la fermentación de dicha cepa y su actividad anti-*H. pylori*.

Los péptidos de la invención se pueden utilizar en las composiciones mencionadas con bacterias de la invención.

A continuación se describe la caracterización detallada de la cepa de la presente invención, así como la obtención del sobrenadante de la cepa después de su fermentación y su actividad anti-*H. pylori*.

EJEMPLOS

1. Aislamiento de microorganismos.

Para el aislamiento de las cepas de *Bifidobacterium*, se disolvió 1 g de heces en tampón PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,0) homogeneizando la muestra mediante maceración durante 3 minutos en un Stomacher (Bagmiser 400P, Interscience Worldwide, Francia). Se inoculó una alícuota de 1 ml del homogeneizado en agar Man Rogosa Sharpe (MRS) ajustado a pH 3,0 con HCl suplementado con 0,05 % (p/v) de cisteína (MRS-C; Sigma, St. Louis, Mo.). Se incubó durante 17 horas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis y diferentes diluciones de este medio de preincubación fueron sembradas en placas de medio MRS-C y medio selectivo de *Bifidobacterium* (BSM, Fluka, Buchs, Suiza) y agar de medio de *Bifidobacterium* (BFM; Nebra, 1999¹) y se incubaron durante 36 a 72 horas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis. La morfología de colonia y el tipo de pared celular de las cepas obtenidas se determinó por tinción de Gram. Se observó que un 70 % del total de cepas analizadas pertenecían al género *Bifidobacterium*.

2. Ensayos *in vitro* de actividad frente a *H. pylori* de las distintas bifidobacterias y sus sobrenadantes de cultivo.

Se analizó la actividad de los sobrenadantes de cultivo de seis bifidobacterias (CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 y CP6) frente a dos cepas de referencia de *H. pylori* (NCTC 11637 y NCTC 11638) y seis aislados de *H. pylori* de origen clínico (A1, A2, A3, A4, A5 y A6). En un primer ensayo se evaluó la actividad antibacteriana por técnicas de difusión en agar de los sobrenadantes de cultivo de las bifidobacterias seleccionadas frente a las cepas de referencia *H. pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638.

Se realizaron dos subcultivos de las bacterias del ácido láctico con un inóculo al 1 % (p/v) en 3 ml de medio MRS (Pronadisa) suplementado con 0,05 % (p/v) de L-cisteína (Scharlau) e incubando en condiciones anaeróbicas durante 24 horas a 37 °C. Las bacterias del ácido láctico así cultivadas fueron nuevamente inoculadas en las mismas condiciones en 50 ml de MRS-C y MRS-C suplementado con Tween 80 1 % (v/v), respectivamente, e incubadas durante 17 horas tras lo cual se obtuvieron por centrifugación los sobrenadantes de cultivo. Estos sobrenadantes fueron neutralizados con NaOH 1 N a pH 6,5 y esterilizados por filtración a través de filtros de tamaño de poro 0,22 µm (Sartorius). Posteriormente se concentraron diez veces por liofilización y se resuspendieron en tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Se realizaron ensayos en medio líquido de la capacidad antibacteriana de los sobrenadantes de las 6 cepas de bifidobacterias anteriormente mencionadas frente a la cepa *H. pylori* NCTC 11637. Utilizando como base el medio de infusión cardiaca cerebral suplementado con suero bovino fetal 5 % (v/v) (Invitrogen), se realizó en placas de poliestireno de 96 pocillos, un inóculo del 1 % (p/v) de la cepa indicadora a partir de una suspensión bacteriana de densidad óptica a 600 nm igual a $2,5 \pm 0,05$ con el fin de estandarizar el número de microorganismos a 10^4 ufc/ml. A dicho medio se le añadieron 25 µL de los sobrenadantes (SBN) para un volumen final de ensayo de 200 µL por pocillo. La mezcla fue incubada a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante 3-4 días tras los cuales se realizó la medición de su densidad óptica a 600 nm. El ensayo incluyó controles de medio de cultivo inoculado sin sobrenadante y de medio de cultivo con sobrenadante sin inocular. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Utilizando esta metodología se observó un efecto inhibitorio de la proliferación por la adición al medio de todos los sobrenadantes ensayados.

Tabla 1. Inhibición de la proliferación de *H. pylori* NCTC 11637 por parte de los sobrenadantes de las bifidobacterias CP1, CP2, CP3, CP4, CP5 y CP6.

Sobrenadante	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6
% Inhibición	73,46	70,25	67,69	77,14	81,94	72,57

Al mismo tiempo se realizaron ensayos de inhibición mediante difusión en agar. Los sobrenadantes neutralizados (SBN) se emplearon en la determinación de la actividad antimicrobiana frente a las cepas *H. pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638. Para ello se inocularon $1,8 \times 10^8$ ufc/ml (McFarland = 6) de la cepa indicadora de *H. pylori* en 1 ml de solución salina y se extendió en la superficie de medio Trypticase Soy Agar suplementado con sangre de caballo 5 % (v/v) (Oxoid). Las muestras de sobrenadante neutralizado (50 µl) fueron depositadas en las distintas celdas (5 mm de diámetro) que se practicarán en el agar. Las zonas de inhibición se observaron tras 2-3 días de incubación a 37 °C en condiciones de microaerofilia (Campygen; Oxoid). En estas condiciones no se observó efecto de inhibición sobre los aislados de *H. pylori*. Para incrementar la inhibición se modificaron las condiciones del medio de cultivo de crecimiento de las bifidobacterias con el fin de mejorar la producción de los inhibidores. Así, las bifidobacterias crecieron en las mismas condiciones que en el caso anterior pero utilizando el medio MRS-C (Oxoid) al que se suplementó con 1 % (p/v) de Tween 80. Los sobrenadantes fueron tratados igual que en el caso anterior y su actividad fue analizada por el método de difusión en agar frente a las cepas de *H. pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638 (Tabla 2) y los seis aislados clínicos de *H. pylori* A1-A6 (Tabla 3). Como resultado del estudio se confirmó la presencia de mayores halos de inhibición frente a las cepas de *H. pylori* en todos los sobrenadantes de cultivo ensayados, aunque las cepas CP3, CP4 y CP5 mostraron la mayor actividad.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana en placa de los sobrenadantes de cultivo de cepas de *Bifidobacterium* crecidas durante 17 h en medio MRS-C frente a las cepas control de *H. pylori* NCTC 11637 y NCTC 11638 suplementado con 1 % (p/v) de Tween 80 frente a aislados de *H. pylori*.

Cepas <i>Bifidobacterium</i>	Diámetro de la zona de inhibición de crecimiento bacteriano (mm)	
	<i>H. pylori</i> NCTC 11637	<i>H. pylori</i> NCTC 11638
CP1	1	5,5
CP2	7,25	5
CP3	7,25	6
CP4	6,25	7,5
CP5	7,25	7
CP6	6	5,25

Tabla 3. Actividad antimicrobiana en placa de los sobrenadantes de cultivo de cepas de *Bifidobacterium* crecidas en medio MRS-C suplementado con 1 % (p/v) de Tween 80 frente a aislados de *H. pylori*.

Cepas <i>Bifidobacterium</i>	Diámetro de la zona de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>H. pylori</i> (mm)					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
CP1	5,2	6,7	2,5	5,7	2,7	4,5
CP2	6	6,5	4,5	5	6,2	5,5
CP3	6,6	6,3	5	5	5	4,5
CP4	6	6	4,7	6	6	6
CP5	6,7	7,8	5	5,8	6,7	6,5
CP6	5	7,2	2,5	5	6	4

3. Ensayos de inhibición de la adhesión del patógeno a mucus por competitividad con las bacterias del ácido láctico.

A la vista de los resultados obtenidos se llevó a cabo un estudio de inhibición de la adhesión de tres cepas de *H. pylori* (los aislados clínicos A1 y A2 y la cepa control NCTC 11637) por parte de las cepas en estudio.

10 Se utilizó mucina porcina tipo III (Sigma) a una concentración proteica de 0,5 mg/ml. Para ello se determinó la concentración de proteína total según el método Bradford (Biorad) empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

15 Las células de *H. pylori* crecidas en microaerofilia durante 36 horas a 37 °C fueron lavadas dos veces con tampón HEPES (N-2-hidroxietilpiperazine-N-2-ácido etanosulfónico) - Hanks (10 mM HEPES en sales equilibradas de Hank, pH 7,4; Sigma) tras lo cual se determinó la concentración de microorganismos mediante la medición de la absorbancia a 600 nm, ajustándose a una DO de 0,25 + 0,05 con el fin de estandarizar el número de microorganismos. Posteriormente las células fueron marcadas fluorescentemente añadiendo al tampón 10 µl/ml de diacetato de carboxifluoresceína 100 mM (CFDA; Calbiochem) y se incubaron a 37 °C durante 45 minutos, preservando la mezcla de la luz.

20 El ensayo consistió en la adición de 100 µl de las células probióticas sin marcar a pocillos de placas multipocillo de poliestireno (Maxisorp, Nunc) donde previamente se había fijado el mucus y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Para su fijación, el mucus se disolvió previamente en tampón HEPES- Hanks (HH) a la concentración deseada y fue inmovilizado en las placas Maxisorp-Nunc mediante la adición de 100 µl de esta solución a cada uno de los pocillos. Tras una incubación a 4 °C durante toda la noche, los restos de mucus no inmovilizados fueron retirados mediante dos lavados sucesivos de 200 µl de tampón HH. Tras el último de los lavados se añadieron 100 µl de tampón HH a cada pocillo. Las bacterias del ácido láctico no adheridas al mucus fueron eliminadas mediante dos lavados de 200 µl de tampón HH y 100 µl de células marcadas con CFDA del patógeno *H. pylori* se añadieron a los pocillos, incubándose a 37 °C durante 1 h. Los patógenos no adheridos a mucus fueron eliminados mediante dos lavados con tampón HH. Las células adheridas a mucus se liberaron mediante raspado y se lisaron con SDS 1 % (p/v) en 0,1 N de NaOH a 60 °C durante 1h. La fluorescencia liberada se midió a $\lambda_{ex}=485$ nm; $\lambda_{em}=518$ nm en el analizador Fluoreskan Ascent FL. Los resultados se expresaron en porcentaje de fluorescencia recuperado tras la adhesión, en relación con la fluorescencia de la suspensión bacteriana añadida a los pocillos. El porcentaje de inhibición de la adhesión se calculó como la diferencia entre la adhesión del patógeno en ausencia y en presencia de las bifidobacterias. Los ensayos se realizaron en tres experimentos independientes y cada uno de ellos se realizó por cuadruplicado. La media de los resultados se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la adhesión de tres cepas de *H. pylori* a mucus por cultivo conjunto con las bifidobacterias seleccionadas.

Cepas <i>Bifidobacterium</i>	% Inhibición de la adhesión a mucus		
	A1	A2	NCTC 11637
CP1	4,00±0,38	2,11±0,99	-0,52±1,65
CP2	-3,66±0,47	6,72±0,23	4,71±1,85
CP3	-4,00±5,61	3,80±1,15	4,84±0,54
CP4	-6,83±1,62	1,74±1,87	4,97±0,76
CP5	5,42±5,48	3,59±0,75	8,17±2,60
CP6	3,89±4,82	1,27±6,07	-7,46±0,08

Los valores negativos implican aumento de la adhesión

Para dos de las tres cepas de *H. pylori* analizadas, los resultados indicaron una destacable inhibición de la adhesión por parte de la cepa CP5.

Debido a estos resultados, junto con los obtenidos en los estudios *in vitro* de inhibición de la proliferación de *H. pylori*, se descartó la elección de la cepa CP5 para estudios posteriores junto con un control del probiótico comercial *Lactobacillus rhamnosus* GG.

5 4. Identificación y tipificación de la cepa CP5.

4.1 Extracción y purificación de ADN genómico.

10 El aislamiento del ADN genómico (ADNg) bacteriano se realizó a partir de un cultivo de células de CP5 en caldo MRS-C durante 17 horas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis. Estas células fueron recogidas, lavadas con tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM) y resuspendidas en 500 µl de tampón TE a los que se les añadieron 20 µl de una solución de lisozima (50 mg/ml). Esta mezcla fue incubada a 37 °C durante una hora y media. Tras esta incubación se añadieron 30 µl de SDS al 10 % (p/v) y 3 µl de una solución de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó 1 hora a 37 °C. La suspensión de ADN se limpió añadiendo a la muestra 100 µl de una solución de 5 M y 80 µl de una solución de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB) y NaCl (CTAB 10 % (p/v) y NaCl 0,7 M). Esta mezcla, bien disuelta, fue incubada a 65 °C durante 10 minutos.

15 La purificación del ADN se realizó mediante la técnica de extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Los ácidos nucleicos fueron precipitados mediante la adición de 500 µl de isopropanol, agitando y dejando a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo que se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. El ADN precipitado se lavó con etanol frío 70 % (v/v). El ADN precipitado y limpio fue secado a vacío y se resuspendió en 50 µl de tampón TE. A cada muestra se le añadieron 3 µl de solución de RNAsa (10 mg/ml) incubando la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. La concentración de ADN fue determinada en gel de agarosa del 0,7 % (p/v) en tampón TAE (242 g Tris base, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0).

25 4.2 Tipificación taxonómica de las cepas bacterianas.

La identificación de la cepa CP5 se realizó a nivel de género y especie por técnicas de PCR específicas y secuenciación de un segmento de aproximadamente 600 pb del ADN ribosómico (ADNr) 16S y a nivel de cepa por técnicas de PCR-RAPD utilizando los cebadores descritos en la Tabla 5.

30 En la PCR específica de género *Bifidobacterium* se utilizaron los cebadores Lm3 (SEC ID N°: 9) y Lm26 (SEC ID N°: 8). Para la PCR de especie se utilizaron los cebadores específicos detallados en la Tabla 5. Para la tipificación a nivel de cepa mediante PCR-RAPD se utilizaron los cebadores BIF (SEC ID N°: 16) y RFL-2 (SEC ID N°: 17). Para la amplificación y posterior secuenciación del ADNr 16S se utilizaron los cebadores 616V (SEC ID N°: 18) y 699R (SEC ID N°: 19).

Tabla 5. Secuencias de los distintos cebadores utilizados en las reacciones de PCR y RAPD.

40 Tabla 5. Secuencias de los distintos cebadores utilizados en las reacciones de PCR y RAPD.

Sec ID N°	Cebador	Secuencia	Diana	Tamaño Amplificado
8	Lm26	5'GATTCTGGCTCAGGATGAACG'3	<i>Bifidobacterium</i>	1350 pb
9	Lm3	5'CGGGTGCGTGCCCACTTTCATG'3		
10	BiBif-1	5'CCACATGATCGCATGTGATTG'3	<i>B. bifidum</i>	278 pb
11	BiBif-2	5'CCGAAGGCTTGCTCCCAA'3		
12	BiLON-1	5'TTCCAGTTGATCGCATGGTC'3	<i>B. infantis</i>	831 pb
13	BiLON-2	5'GGGAAGCCGTATCTCTACGA'3		
14	BiCAT-1	5'CGGATGCTCCGACTCCT'3	<i>B. catenulatum</i>	285 pb
15	BiCAT-2	5'CGAAGGCTTGCTCCCGAT'3		
16	BIF	5'AGTCAGCCAC'3	Universal	Varios
17	RFL-2	5'CGGCCCTGT'3	Universal	Varios
18	616V	5'AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG 3'	Bacterias	1500 pb
19	699R	5' RGG GTT GCG CTC GTT 3'		

La mezcla de reacción de PCR varió en función del tipo de análisis realizado. Las distintas concentraciones que se establecieron para un volumen de reacción de 50 µl se muestran en la Tabla 6.

45 Tabla 6. Distintas concentraciones de la mezcla de reacción para las reacciones de PCR y RAPD.

	PCR género	PCR especie	RAPD	PCR 16S
ADNg	200 ng	200 ng	200 ng	200 ng
Tampón 10 X	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Mg Cl ₂	1,5 mM	1,5 mM	4 mM	1,5 mM

Polimerasa	2 U	1,8 U	2,5 U	1 U
dNTP	300 µM	200 µM	200 µM	200 µM
Cebadores	1 µM	0,5 µM	1,5 µM	1 µM

Las condiciones en las que se realizó la polimerización también variaron en función del tipo de análisis y se muestran en la Tabla 7.

5

Tabla 7. Condiciones de reacción para las reacciones de PCR y RAPD.

Etapas	Ciclos	PCR género	PCR especie	RAPD	PCR 16S
Inicio	1		94 °C-5 min	94 °C-5 min	94 °C-5 min
Polimerización	35	94 °C-1 min	94 °C-20 s	94 °C-1 min	94 °C-20 s
		58 °C-3 min	58 °C-20 s	32 °C-2 min	56 °C-30 s
		72 °C-1 min	72 °C-30 s	72 °C-2 min	72 °C-1 min
Elongación	1	72 °C-4 min	72 °C-5 min	72 °C-2 min	72 °C-10 min

La cepa CP5 se identificó mediante PCR específica como perteneciente a la especie *Bifidobacterium bifidum* (Figura 1). Esta identificación se confirmó mediante la comparación de la secuencia del ADNr 16S de la cepa CP5 (SEC ID N°: 7) con el total de secuencias del gen recogidas en las bases de datos públicas, obteniéndose una homología de 98 % con las secuencias depositadas en bases de datos públicas pertenecientes a la especie *B. bifidum*.

10

5. Ensayos de resistencia al tránsito digestivo con sistemas simulados de fluidos gástricos e intestinales.

15

5.1. Resistencia a jugos gastrointestinales.

Los jugos gástricos y pancreáticos se prepararon en el mismo momento de su utilización resuspendiendo pepsina (Sigma) de mucosa estomacal porcina (3 g/l) y pancreatina (Sigma) de páncreas porcino (1 g/l) en solución salina estéril al 0,5 % (p/v).

20

Las cepas bacterianas se cultivaron a 37 °C y 24 h en anaerobiosis, se lavaron dos veces en solución salina al 0,5 % y se llevaron a un inóculo de 10^8 - 10^9 ufc/ml.

25

El ensayo emuló las condiciones y el tiempo de exposición al que están sometidas las bacterias durante su paso por el tracto gástrico e intestinal en dos etapas. La primera simuló el tracto gástrico, para lo que se realizó un inóculo del 1 % (v/v) de las bacterias en 10 ml de solución salina con pepsina ajustada a pH 3,0 con HCl e incubación a 37 °C en anaerobiosis durante 120 minutos. La segunda mimetizó el paso por el tracto intestinal, para lo cual se neutralizaron las células lavando con tampón fosfato (PBS) a pH 7,0 y se resuspendieron en la solución salina con pancreatina ajustada a pH 8,0 con NaOH, y se incubaron en anaerobiosis durante 240 minutos. Se tomaron muestras a los 0, 90 y 120 minutos en la primera etapa y a los 0, 60 y 240 minutos en la segunda etapa, realizando en cada caso diluciones seriadas y sembrando 100 µl de cada dilución por placa de medio sólido MRS-C e incubándolas durante dos días a 37 °C en anaerobiosis. Como control de viabilidad a lo largo del proceso se inocularon las mismas cepas en solución salina y se incubaron en las mismas condiciones tomando alícuotas al principio, a los 120 minutos y al final del ensayo.

35

Tras la incubación en presencia de jugos gástricos e intestinales, la cepa CP5 y el control *Lactobacillus* GG se recuperaron en placas de medio MRS-C y se realizaron los recuentos de células viables tras 48 horas de incubación. Ambas cepas mostraron una pérdida de viabilidad similar después de su exposición a los jugos, debida tanto a la acción directa de estos jugos como a los valores extremos de pH (Tabla 8). El porcentaje de viabilidad se calculó como la relación entre el número de células viables obtenidas en cada una de las etapas del ensayo frente al número de células viables a tiempo cero, que fue el inóculo (10^7 - 10^8 ufc/ml).

40

Tabla 8. Efecto *in vitro* de los jugos gastrointestinales en la viabilidad de las cepas seleccionadas.

Cepas	Inoculo ufc/ml	Pepsina pH 3, 120 min		Pancreatina pH 8, 240 min	
		inicial	Recuento	Recuento	% células viables
CP5	$2,7 \times 10^8$		$2,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	7,0 %
LGG	$3,4 \times 10^8$		$3,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	2,9 %

45

5.2. Resistencia a sales biliares y NaCl.

Se analizó la resistencia de las dos cepas bacterianas a distintas concentraciones de sales biliares Ox-gall y NaCl. El ensayo se basó en la monitorización del crecimiento de las bacterias en placas multipocillo para 96 muestras (Biorad). A cada pocillo se le añadieron 100 µl de un inóculo a una DO_{600nm} de 0,1 unidad y 175 µl de medio MRS-C suplementado con 0, 0,5, 1, 2 y 3 % de Oxgall (p/v) o medio MRS-C suplementado con 0, 2, 3, 6, 8 y 10 % NaCl (p/v). La densidad óptica de cultivos de 24 horas se analizó a una longitud de onda de 655 nm en un lector de microplacas (Microplate reader, Roche).

Se analizó la tolerancia de ambas cepas a concentraciones de 0,5, 1, 2 y 3 % (p/v) de sales biliares, monitorizando en placas de multipocillos el crecimiento en estas condiciones por la variación de la densidad óptica a 655 nm. Los resultados muestran que las dos cepas fueron capaces de crecer en presencia de las distintas concentraciones de sales biliares, aunque CP5 mostró una resistencia ligeramente mayor (Figura 2).

Se realizó un estudio para determinar si estas cepas eran resistentes a elevadas concentraciones de NaCl en el medio. Para ello se analizaron concentraciones de 2, 3, 6, 8 y 10 % (p/v). Los resultados indicaron que ambas cepas toleraban concentraciones de NaCl de hasta un 6 %, observándose una disminución del crecimiento a partir de un 8 % de NaCl con una inhibición del crecimiento al valor del 10 %. En este caso la cepa *Lactobacillus* GG fue ligeramente más resistente (Figura 3).

Se realizaron estudios de crecimiento bacteriano a valores de pH ácidos. Los pH ensayados fueron 1,5, 2,0 y 3,0 durante un periodo de incubación de 24 horas a 37 °C en condiciones de anaerobiosis. Los resultados indicaron que a estos pH se produjo una inhibición del crecimiento en las dos cepas ensayadas. Estos datos sirven como indicadores de la sensibilidad de las cepas a pH ácidos en ensayos *in vitro* durante largos periodos de tiempo (24 h). Sin embargo hay que considerar que las condiciones *in vivo* son otras. Por un lado, el tiempo de permanencia del probiótico en zonas del estómago donde se alcanzan estos pH no supera habitualmente las dos horas y rápidamente pasan al intestino delgado donde el pH se neutraliza permitiendo el crecimiento bacteriano. Además, junto al probiótico se ingieren otros compuestos provenientes de la matriz del alimento que pueden actuar amortiguando el efecto inhibitor del pH estomacal. Por todo ello, se realizó un estudio con un rango de pH mayor y a un tiempo de incubación de 2 horas, más próximo al tiempo teórico de permanencia del probiótico en el sistema gástrico. A partir de cultivos obtenidos en caldo a 17 h de crecimiento, se tomaron 3 ml de la suspensión y se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) ajustado a cada uno de los pH ensayados. Tras homogeneización, se incubaron durante 2 horas en estufa a 37 °C. Para cada cultivo se realizaron recuentos en medio MRS-C: i) del cultivo inicial; ii) de la mezcla una vez pasadas 2 horas a 37 °C y iii) de un control realizado de la misma forma que el resto de situaciones pero en condiciones fisiológicas para asegurar que no se producían pérdidas significativas de células tras la centrifugación y decantación del medio de cultivo. No se observaron diferencias en los resultados de recuento entre el cultivo inicial y el control tras 2 horas de incubación. Los resultados obtenidos (Tabla 9) indican una supervivencia de CP-5 muy próxima al 100 % a pH 4-7.

Tabla 9. Recuentos obtenidos de la cepa CP-5 tras 2 horas de incubación en tampón a distintos pH.

	Recuento (ufc/ml)
pH2	1,00 x10 ² ± 0,00
pH3	6,95 x10 ⁴ ± 4,17 x10 ⁴
pH4	2,67 x10 ⁷ ± 9,40 x10 ⁶
pH5	2,25 x10 ⁷ ± 7,07 x10 ⁵
pH6	2,08 x10 ⁷ ± 9,48 x10 ⁶
pH7	3,15 x10 ⁷ ± 2,83 x10 ⁶
Inicial	3,87 x10 ⁷ ± 1,41 x10 ⁶

6. Sensibilidad a antibióticos.

La sensibilidad de las cepas a los antibióticos se determinó mediante técnicas de difusión en agar utilizando discos impregnados con diversas concentraciones de antibióticos. Las bacterias crecidas en medio MRS-C líquido a 37 °C durante 24 horas fueron recogidas lavándolas varias veces con solución salina y ajustando el inóculo a 10⁹ ufc/ml (DO_{600nm} = 5). En estas condiciones se tomaron 100 µl de la suspensión celular y se sembraron en 10 ml de agar MRS-C semisólido al 0,7 % (p/v) atemperado a 50 °C. Este agar se vertió sobre una placa de medio MRS-C y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez seco, se colocaron los discos de antibiótico sobre la superficie. A las 24 horas de incubación en anaerobiosis se observó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

Se probaron un total de 17 antibióticos para ver la resistencia o sensibilidad de las distintas cepas bacterianas. Los antibióticos empleados fueron ácido nalidíxico (30 µg), amoxicilina (25 µg), carbenicilina (100 µg), claritromicina (15

μg), cloranfenicol (30 μg), eritromicina (15 μg), gentamicina (10 μg), kanamicina (30 μg), metronidazol (5 μg), oxacilina (1 μg), penicilina (6 μg), polimixina B (300 IU), rifampicina (5 μg), sulfamida (200 μg), tetraciclina (30 μg), trimetoprima (5 μg) y vancomicina (30 μg).

5 La sensibilidad de las dos cepas frente a distintos tipos de antibióticos se muestra en la Tabla 10. Este es uno de los criterios de selección de nuevas cepas de probióticos, ya que conociendo su perfil de resistencia se conocen datos de seguridad para su uso, lo que permite establecer las bases para una posible aplicación como complemento en el tratamiento antibiótico de infecciones como la úlcera péptica causada por *H. pylori*.

10 Las dos cepas mostraron resistencia a ocho de los diecisiete antibióticos ensayados entre los que se incluían el ácido nalidíxico, gentamicina, kanamicina, metronidazol, oxacilina, polimixina, sulfamida y vancomicina. Este perfil de sensibilidad a antibióticos es el descrito para otras cepas probióticas del género *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*).

15 Los datos de resistencias de las bifidobacterias frente a antibióticos como la gentamicina o el metronidazol, utilizados habitualmente en tratamientos de infecciones causadas por *H. pylori*, señalan la posibilidad de utilizar las bacterias del ácido láctico seleccionadas en terapias combinadas que incluirían el tratamiento probiótico con la administración de estos antibióticos.

Tabla 10. Resistencia a distintos antibióticos de las cepas seleccionadas.

Antibiótico	Diámetro de la inhibición de crecimiento bacteriano (mm)		
	μg	CP5	LGG
Amoxicilina	25	28	30
Carbenicilina	100	36	32
Oxacilina	1	0	0
Penicilina	6	34	32
Vancomicina	30	0	0
Cloranfenicol	30	20	27
Eritromicina	15	27	29
Gentamicina	10	0	0
Kanamicina	30	0	0
Tetraciclina	30	30	31
Metronidazol	5	0	0
Ácido nalidíxico	30	0	0
Rifampicina	5	34	32
Trimetoprim	5	0	0
Polimixina B	300 ^a	0	0
Sulfamida	200	0	0
Claritromicina	15	0	0

^a. valor expresado en IU

20 7. Ensayos de adhesión con respecto a la adhesión a mucus intestinal.

25 El ensayo se realizó utilizando la metodología empleada en el punto 3. Brevemente, las cepas CP5 y *Lactobacillus* GG crecidas en anaerobiosis durante 24 horas a 37 °C fueron lavadas dos veces con tampón HEPES - Hanks y se ajustó la concentración de microorganismos a DO_{600 nm} de 0,25 ± 0,05. Posteriormente las células fueron marcadas fluorescentemente con CFDA e incubadas a 37 °C durante 45 minutos, preservando la mezcla de la luz. Sobre el mucus inmovilizado en placas multipocillo de poliestireno (Maxisorp, Nunc), se añadieron 100 μl de células marcadas a cada uno de los pocillos y se incubaron durante 1 h a 37 °C. La eliminación de las bacterias no adheridas se realizó mediante dos lavados de 200 μl de tampón HH. Las bacterias que sí se adhirieron fueron liberadas mediante un raspado del mucus inmovilizado en cada pocillo y fueron posteriormente lisadas con 1 % (p/v) de SDS en NaOH 0,1 M (200 μl por pocillo) incubando las placas a 60 °C durante 1h. Los contenidos de las celdas fueron transferidos a una nueva placa multipocillo de poliestireno (Nunc) y la fluorescencia liberada se midió a λ_{ex}=485 nm; λ_{em}=518 nm en un aparato Fluoreskan Ascent FL (Thermo). La adhesión fue expresada como el porcentaje de fluorescencia recuperado después de la adhesión en relación a la fluorescencia de la suspensión bacteriana añadida al mucus inmovilizado. La adhesión bacteriana fue determinada en tres experimentos independientes y cada ensayo se realizó por cuadruplicado.

40 Las dos cepas se sometieron a un ensayo de adhesión con respecto a la adhesión a muestras de mucus porcino tipo III. La cepa CP5 mostró un 12 % de adhesión frente a un 10 % de la cepa *Lactobacillus* GG.

8. Producción y purificación del metabolito de interés.

Se llevó a cabo una fermentación de 10 litros con la cepa CP-5 en medio MRS suplementado con cisteína (0,05 % p/v) con la finalidad de obtener un sobrenadante rico en el metabolito responsable de la inhibición de *H. pylori*. La incubación se llevó a cabo a 37 °C durante 17 horas sin agitación y con un generador de anaerobiosis, obteniéndose una densidad celular del cultivo de $1,25 \cdot 10^8$ ufc/ml. La cantidad de inóculo fue del 1 % del volumen total de fermentación. Finalmente, el sobrenadante se obtuvo por centrifugación a 10000 rpm durante 15 min y se congeló a -80 °C hasta el proceso de purificación.

8.1. Purificación del metabolito de interés por cromatografía de intercambio catiónico seguido de otra etapa de cromatografía en fase inversa.

200 ml de sobrenadante se sometieron a una etapa de cromatografía de intercambio catiónico con la columna HiPrep 16/10 SP FF (GE Healthcare). En esta etapa, todas las proteínas y péptidos con naturaleza catiónica quedaron adsorbidos a la resina y finalmente se eluyeron con un tampón con NaCl 1M sin gradiente. Todas las proteínas de naturaleza catiónica se eluyeron simultáneamente en estas condiciones y se recogieron en pocas fracciones (fracciones 3, 4 y 5) y en un volumen mínimo para concentrar el metabolito de interés. El volumen de cada fracción fue de 10 ml. El porcentaje de inhibición de *H. pylori* en estas fracciones fue de 50,32 %, 81,29 % y 1,9 %, respectivamente. La fracción 4 de intercambio catiónico, que presentaba el valor de inhibición más elevado, fue sometida a un proceso de ultrafiltración con filtros de 5000 Da (Extreme Amicon, Millipore). El volumen filtrado de esta etapa contenía las proteínas inferiores a este peso molecular. Este volumen filtrado fue sometido a una etapa de cromatografía en fase inversa para purificar y posteriormente identificar por espectrometría de masas MALDI-TOF el metabolito responsable de la inhibición de *H. pylori*. Para esta etapa, se utilizó la columna RESOURCE RPC 3 ml (GE Healthcare) y se trabajó en gradiente con los siguientes eluyentes A) agua MiliQ + ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % y B) acetonitrilo + ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 %. En esta etapa cromatográfica se obtuvieron fracciones de 2 ml. Una alícuota de estas fracciones se secó para eliminar el disolvente y finalmente se resuspendió en agua destilada justo antes de testar la inhibición de *H. pylori* por estas fracciones. La fracción 11 obtenida por cromatografía de fase inversa presentó un valor de inhibición de *H. pylori* de 94,77 %, identificándose en esta fracción los siguientes péptidos, procedentes todos ellos de la β -caseína bovina:

SEC ID Nº: 1. VYFPGPIHN 1139,57 Da
 SEC ID Nº: 2 PPFLQPEVMGVSKVKE 1783,95 Da
 SEC ID Nº: 3 DKIHPPAQTSQSLVYPF 1889,97 Da
 SEC ID Nº: 4 PYPQRDMPIQAFLLYQ 1978,99 Da
 SEC ID Nº: 5 RDMPIQAFLLYQEPVLG 1978,99 Da
 SEC ID Nº: 6 PQNIPPLTQTPVVVPPFLQPE 2310,26 Da

9. Pruebas metabólicas.

9.1 Determinación de ácido láctico (D/L).

Para la cuantificación de ácido láctico (D/L) en el sobrenadante de cultivo de la cepa CP-5, se utilizó el Kit comercial D-Ácido láctico/L-Ácido láctico (Roche, Cat. No. 11 112 821 035). Esta determinación consiste en el análisis espectrofotométrico del producto generado por la acción específica de dos enzimas (D-Lactato deshidrogenasa y L-Lactato deshidrogenasa) sobre ambos isómeros del ácido láctico. La cuantificación de ácido láctico (D/L) se llevó a cabo en sobrenadantes de cultivo de la cepa CP-5 crecida a 37 °C en condiciones de microaerobiosis y de anaerobiosis. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 4.

9.2 Desconjugación de sales biliares.

La hidrólisis de las sales biliares liberando aminoácidos libres y colesterol se llevó a cabo por la acción de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH, EC 3.5.1.24). El ensayo de actividad de la enzima BSH se llevó a cabo según se describe en el artículo de Kumar *et al.* (2006)⁴⁴. Este artículo propone la determinación de la actividad de la enzima BSH sobre dos sustratos diferentes, dos sales biliares cuyos aminoácidos son glicina y taurina. La reacción de estos aminoácidos con una solución de ninhidrina da un compuesto coloreado que se determina espectrofotométricamente a 570 nm. Previamente se llevó a cabo una curva patrón tanto para glicina como para taurina.

La actividad BSH se determinó en sobrenadantes de cultivo de la cepa CP-5 crecida en condiciones de microaerobiosis y anaerobiosis. Previamente a la determinación de la actividad BSH se realizaron las curvas patrón de glicina y taurina. En la Tabla 11 se muestran los valores de actividad BSH de la cepa CP-5.

Tabla 11. Actividad BSH de la cepa CP-5 frente a diferentes sustratos.

	BSH-Taurina (mU.I./ml)	BSH-Glicina (mU.I./ml)
Microaerobiosis	5,25 ± 0,12	4,45 ± 0,40
Anaerobiosis	N.D.	N.D.

N.D.: No se detectó actividad BSH en las condiciones del ensayo.

9.3 Determinación de aminos biógenas.

Para la cuantificación de aminos biógenas en el sobrenadante de cultivo de la cepa CP-5 se utilizó un método cromatográfico (HPLC) descrito por Eerola *et al.* (1993)⁴⁵ en el que previamente se derivatizaron las aminos biógenas presentes en el sobrenadante con una solución de cloruro de dansilo. Las aminos biógenas determinadas fueron tiramina, histamina, cadaverina y putrescina. Previamente se ha llevado a cabo una curva patrón con las cuatro aminos biógenas analizadas.

Para la cuantificación de aminos biógenas en el sobrenadante de cultivo de la cepa CP-5, se realizaron curvas patrón de las aminos tiramina, histamina, cadaverina y putrescina. En la Tabla 12 se muestra la cantidad de aminos biógenas producidas en los sobrenadantes de cultivo de la cepa CP-5 cultivada en condiciones de microaerobiosis y anaerobiosis.

Tabla 12. Aminos biógenas producidas por la cepa CP-5.

	Putrescina (μM)	Cadaverina (μM)	Histamina (μM)	Tiramina (μM)
Microaerobiosis	N.D.	0,0656 \pm 0,0000	N.D.	0,7815 \pm 0,0816
Anaerobiosis	N.D.	0,0851 \pm 0,0382	N.D.	0,8179 \pm 0,0904

N.D.: No se detectó en el sobrenadante ensayado.

Los resultados indican que estos parámetros se encuentran en los niveles normales y admitidos para el resto de bacterias probióticas.

10. Usos de la nueva cepa de CP5 de *Bifidobacterium bifidum*

10.1 Obtención de sobrenadante de cultivo de la bifidobacteria CP5.

Partiendo de extracto de glicerinado de bifidobacteria CP5, se obtiene un producto denominado sobrenadante de células de bifidobacteria CP5 en aproximadamente 5 días.

Día 1: Siembra de extracto de glicerinado con un asa (10 μl) de bifidobacteria en 10 ml de caldo MRS-C (Anexo 1) y placa MRS-C. Crecimiento durante 17 horas (caldo) y 30 horas (placa) en estufa de laboratorio a 37 °C con un generador de anaerobiosis.

Día 2: Comprobación de la pureza y estado del cultivo a partir de visualización macroscópica de colonias y microscópica de las células. Pase 1 del cultivo (pre-inóculo). Siembra en 100 ml de caldo MRS-C de 100 μl del cultivo (1 % v/v). Crecimiento durante 17 h en una estufa de laboratorio a 37 °C.

Día 3: Pase 2 del cultivo (inóculo). Siembra en un matraz de 200 ml de MRS-C de 2 ml del cultivo de pase 1. Crecimiento durante 17 horas en una estufa de laboratorio a 37 °C. Preparación de una bombona de 20 l en medio MRS-C no comercial y esterilización en autoclave.

Día 4: Toma de muestra del inóculo. Recuentos en placas MRS-C a partir de siembra de al menos tres diluciones decimales seriadas (-6, -7 y -8) en solución salina NaCl 0,09 % pH 7,0. Crecimiento durante 30 h en una estufa de laboratorio a 37 °C con un generador de anaerobiosis. Medida de DO y peso seco (Anexo 1). Inoculación de la bombona. Se inocula en las máximas condiciones de esterilidad (en llama) 200 ml de inóculo (1 %). Crecimiento durante 17 horas en cámara de temperatura controlada a 37 °C.

Día 5: Toma de muestra de la producción en esterilidad. Comprobación de la pureza y estado del cultivo a partir de visualización microscópica de las células. Medida de DO y peso seco (Anexo 1). Recuentos del producto en placas MRS-C a partir de siembra de al menos tres diluciones decimales seriadas (-6, -7 y -8) en solución salina NaCl 0,09 % pH 7,0. Crecimiento durante 30 h en una estufa de laboratorio a 37 °C con un generador de anaerobiosis. Recuperación de las células mediante centrifugación en una centrífuga Westfalia (Caudal de entrada de 48 litros/hora). Las células recogidas se resuspenden en 400 ml de solución salina NaCl 0,09 % pH 7,0. El producto se centrifuga a 4000 rpm durante 30 minutos aproximadamente (dependiendo del estado de la sedimentación, la centrifugación se aumentará 15 minutos). Se decanta la solución salina. Este paso se realiza por duplicado.

Las células lavadas se resuspenden en un volumen de 1500 ml de solución crioprotectora.

Anexo 1:

A. Composición del medio MRS-C (pH = 6,5).

- Peptona de caseína 10,00 g/l (Fluka)
- Extracto de carne 10,00 g/l (Pronadisa)

- Extracto de levadura 5,00 g/l (Pronadisa)
- Glucosa 20,00 g/l (Merck)
- Tween 80 1,00 g/l (Fluka)
- K_2HPO_4 2,00 g/l (Panreac)
- 5 • Acetato sódico 5,00 g/l (Scharlau)
- $(NH_4)_2$ citrato 2,00 g/l (Fluka)
- $MgSO_4 \times 7 H_2O$ 0,20 g/l (Panreac)
- $MnSO_4 \times H_2O$ 0,05 g/l (Merck)
- Cisteína 0,05 g/l* (Panreac)
- 10 • Agar industrial 15 g/l (Pronadisa)

Autoclave: 121 °C durante 20 min en autoclave de producción.

15 La cisteína se prepara por separado en una solución 100x y se añade al medio ya esterilizado.

El agar tan sólo se añade en el caso de medio sólido.

10.2. Obtención de un liofilizado de la nueva cepa CP5 de *Bifidobacterium bifidum*

20 El objetivo es la obtención de un producto liofilizado de bifidobacteria con una concentración igual o superior a 10^{10} ufc/g.

25 Día 6: Partiendo de las células lavadas obtenidas de la producción (véase el punto 10), las células se resuspenden en la solución crioprotectora, compuesta de 1500 ml de leche desnatada líquida UHT y de 5 % de sacarosa alimentaria. El producto se reparte en bandejas de liofilización y se congelan a -80 °C.

Día 7: Liofilización. La deshidratación por sublimación se realiza en un liofilizador Christ, modelo Beta 2-16, en dos fases:

30 A) Secado principal: Temperatura del condensador: - 80 °C. Temperatura de la bandeja: 0 °C. Presión en la cámara de secado: 25 Pa. Presión de seguridad: 42 Pa. Tiempo de secado: 66 horas.

35 B) Secado final: Temperatura del condensador: - 80 °C. Temperatura de la bandeja: igual a la temperatura ambiental, entre 20 °C y 25 °C. Presión en la cámara de secado: 50 Pa. Tiempo de secado: 2 horas.

Día 8: Recogida del producto de liofilización. Pesado y medida de Aw y humedad. Recuentos del producto en placas MRS-C a partir de siembra de al menos tres diluciones decimales seriadas (-6, -7 y -8) en solución salina NaCl 0,09 % pH 7,0. Crecimiento durante 30 h en una estufa de laboratorio a 37 °C con un generador de anaerobiosis. Envasado al vacío del producto en el menor tiempo posible. Conservación a 4 °C hasta el envío.

40 10.3. Utilización de CP5 como probiótico.

-Utilización de CP5 en alimentos.

45 Se considera como alimento probiótico aquel que contiene microorganismos vivos presentes en un alimento que permanecen activos en el intestino y ejercen importantes efectos fisiológicos. Ingeridos en cantidades suficientes, tienen un efecto muy beneficioso, como contribuir al equilibrio de la flora bacteriana intestinal del hospedador y potenciar el sistema inmunológico del hospedador. No son patógenos. Contienen esta clase de microorganismos y por tanto son alimentos probióticos, los yogures frescos, otras leches fermentadas, etc.

50 Uno de los beneficios de los alimentos probióticos es la mejora del equilibrio de la flora intestinal. Los alimentos denominados probióticos son cultivos simples o mezclados de las bacterias probióticas, las cuales al ser consumidas tanto por seres humanos como por animales, sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y se implantan (no necesariamente) en el colon o intestino delgado, siendo capaces de adherirse a la mucosa intestinal, afectando favorablemente al hospedador en términos de mejora de salud. El consumo reiterado de yogur probiótico en cantidades relativamente abundantes, tiene un efecto terapéutico contra *H. pylori* (Guilliland, 1998)⁴⁶.

55 En la actualidad, los probióticos se utilizan tanto en leche como en quesos, zumos pasteurizados, helados, yogures, cereales y barritas de nutrición. Debido a que los probióticos son organismos vivos, su viabilidad es un punto clave para su éxito.

60 Las células de la cepa CP5 mantienen una viabilidad del 88 % al menos durante un periodo de 15 días a 5 °C cuando se añade a un derivado lácteo.

La cepa CP5 se puede utilizar como un probiótico añadiéndola a alimentos en general y particularmente a productos lácteos y yogures, tanto directamente como fermentados y en este caso de forma directa como un liofilizado.

Un ejemplo de la utilización de CP5 en la forma de un liofilizado obtenido en el punto 11 sería en la obtención de una composición dietética, por ejemplo a partir de leche pasteurizada, a la que se añade el liofilizado que contiene preferiblemente 10^5 - 10^{11} ufc/g de células de CP5, que se mezclan con la leche pasteurizada, y se homogeneiza la mezcla a aproximadamente 5 °C y la leche así homogeneizada se embotella y empaqueta de la forma habitual para su consumo. En este caso el producto tiene una duración de como mínimo 15 días a 5 °C.

10 -Utilización de CP5 en composiciones farmacéuticas

Se utiliza el liofilizado de CP5 obtenido en el punto 11 y se muele a un tamaño máximo de partícula de 1 mm de diámetro y se mezcla en una cantidad fisiológicamente efectiva que en general contendrá 10^9 - 10^{11} ufc/g de células de CP5, con las sustancias necesarias para formar pastillas, cápsulas, etc. Una cantidad fisiológicamente efectiva es la cantidad necesaria de un agente activo para conseguir el efecto deseado, bien sea para prevenir o para curar, siendo este último el caso de la infección por *H. pylori*.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, diluyentes o vehículos que son generalmente conocidos por el experto en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser preparadas en forma sólida, como por ejemplo, píldoras, microgránulos, comprimidos, polvos, etc; en forma líquida, como por ejemplo mezclando el principio activo con agua, aceites o mezclas de ambos, en suspensiones o dispersiones mezclada con agentes dispersantes y/o de suspensión, como por ejemplo gomas, etc.

El liofilizado de CP5 también puede administrarse en composiciones farmacéuticas junto con antibióticos para tratar la úlcera gástrica y prevenir el cáncer de estómago.

En ambos casos, tanto en composiciones farmacéuticas como dietéticas o nutricionales, la utilización de dichas composiciones será para prevenir o combatir las infecciones causadas por *H. pylori* en enfermedades gastrointestinales, entre otros, úlceras estomacales y cáncer estomacal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bizzozero, G. (1892). "Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut". *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 42: 82-152.
2. Marshall BJ (1983). "Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis". *Lancet* 1 (8336): 1273-75.
3. Marshall BJ y Warren JR (1984). "Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration". *Lancet* 1 (8390): 1311-1315
4. Gasbarrini, G. et al. (2000) "No evidence of *Helicobacter pylori* sequences in pancreatic juices of patients affected by chronic pancreatitis" *Int J Pancreatol*. 28 (3): 181-5.
5. Gisbert, S. et al. (2004) "Meta-analysis: *Helicobacter pylori* eradication therapy vs. antisecretory non-eradication therapy for the prevention of recurrent bleeding from peptic ulcer" *Aliment Pharmacol Ther*. 19: 617-29.
6. Taylor DN y Blazer MJ (1991) "The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection" *Epidemiol Rev*. 13: 42-59.
7. Peterson WL (1991) "Pathogenesis and therapy of peptic ulcer disease" *J Clin Gastroenterol*. 12 supl 2: S1-6.
8. Solnick JV, Tompkins LS (1992) "*Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease: pathogenesis and host-parasite interaction" *Infect Agents Dis*. 1(6): 294-309.
9. The EUROGAST Study Group "An international association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer". (1993) *Lancet* 341: 1359-62.
10. Chong J et al. (1994) "Occupational exposure to *Helicobacter pylori* for the endoscopy professional: a sera epidemiological study" *Am J Gastroenterol*. 89 (11): 1987-92.
11. Vilella, A. et al. (2003) "Linfoma gástrico tipo MALT" *Med Clin (Barc)* 120 (9): 349-52.
12. Fox, J.G. y Wang, T.C. (2001) "*Helicobacter pylori*-not a good bug after all!" *New Engl. J. Med*. 345:829-832.
13. Lind T., et al. (1996) "Eradication of *Helicobacter pylori* using one-week triple therapies combining omeprazole with two antimicrobials: the MACH I Study" *Helicobacter*. 1 (3): 138-44.
14. The European *Helicobacter pylori* Study Group (1997) "The year in *Helicobacter pylori* 1997: Current Opinion in Gastroenterology" (Book) vol. 13, suplemento 1.
15. Deltenre M. et al. (1998) "Eradication of *Helicobacter pylori*: why does it fail?" *Ital J Gastroenterol Hepatol*. 30 Suplemento 3: 326-8.
16. Graham DY, Lew GM, Evans DG, Evans DJ, Klein PD (1991). "Effect of triple therapy (antibiotics plus bismuth) on duodenal ulcer healing. A randomized controlled trial". *Ann. Intern. Med*. 115 (4): 266-9.
17. Bhatia SJ et al. (1989) "Lactobacillus acidophilus Inhibits Growth of Campylobacter pylori In Vitro" *Journal of*

Clinical Microbiology p.2328-2330.

18. Mrda, Z *et al.* (1998) "Therapy of *Helicobacter pylori* infection using *Lactobacillus acidophilus*" *Med Pregl.* 51 (7-8): 343-5.
19. Gasbarrini *et al.* (2004) "A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates"
- 5 20. Lorca, GL *et al.* (2001) "Lactobacillus acidophilus Autolysins Inhibit *Helicobacter pylori* In Vitro" *Current microbiology* vol.42, 39-44.
21. Coconnier M-H *et al.* (1998) "Antagonistic Activity against *Helicobacter* infection In Vitro and In Vivo by the Human *Lactobacillus acidophilus* Strain LB" *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4573-80.
- 10 22. Michetti P. *et al.* (1999) "Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans" *Digestion* 60 (3): 203-9.
23. Sgouras D. *et al.* (2004) "In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota" *Appl Environ Microbiol.* 70 (1): 518-26.
- 15 24. Johnson-Henry KC *et al.* (2004) "Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in H. pylori-infected mice" *Dig Dis Sci.* 49 (7-8): 1095-102.
25. Hamilton-Miller JM (2003) "The role of probiotics in the pretreatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection" *Int J Antimicrob Agents* 22 (4): 360-6.
26. Pinchuk IV. *et al.*, (2001) "In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* is due to secretion of antibiotics" *Antimicrob Agents Chemother.* 45 (11): 3156-61.
- 20 27. Nam *et al.* (2002) "Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*" *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4642-4645.
28. Ishihara K *et al.* (1997) "Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth" *FEMS Microbiol Lett.* 15:152(2):355-61.
- 25 29. Aiba Y. *et al.* (1998) "Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model" *Am J Gastroenterol.* 93 (11): 2097-101.
30. Kabir AM *et al.* (1997) "Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model" *Gut.* Jul. 41(1):49-55.
31. Ushiyama A. *et al.* (2003) "Lactobacillus gasseri OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection" *J Gastroenterol Hepatol.* 18 (8): 986-91.
- 30 32. Mukai M. *et al.* (2002) "*Helicobacter pylori* associated with idiopathic thrombocytopenic purpura" *Am J Med* 113(2): 169-71.
33. Armuzzi A. *et al.* (2001) "Effect of *Lactobacillus GG* supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study" *Digestion* 63 (1): 1-7.
- 35 34. Armuzzi A. *et al.* (2001) "The effect of oral administration of *Lactobacillus GG* on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy" *Aliment Pharmacol Ther.* 15 (2): 163-9.
35. Felley CP. *et al.* (2001) "Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man" *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 13 (1): 25-9.
36. Cremonini F. *et al.* (2001) "Effect of different probiotic preparations on anti- *Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study" *Am J Gastroenerol.* 97 (11): 2744-9.
- 40 37. Canducci F. *et al.* (2000) "A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates" *Aliment Pharmacol Ther.* 14 (12): 1625-9.
38. De Francesco V. *et al.* (2000) "Lactobacillus acidophilus administration added to omeprazole/amoxicillin-based double therapy in *Helicobacter pylori* eradication". *Dig Liver Dis.* 32(8): 746-7.
- 45 39. Sheu BS. *et al.* (2002) "Impact of supplement with *Lactobacillus*-and *Bifidobacterium*-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication" *Aliment Pharmacol Ther.* 16 (9): 1669-75.
40. Mrda Z *et al.* (1993) "*Helicobacter pylori* in patients with diseases of the upper part of the gastrointestinal tract" *Med. Pregl.* 46(3-4):117-9.
41. Scholz-Ahrens, KE y Schrezenmeir J. *et al.* (2000) "Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides" *Br J Nutr.* 84 Supl 1: 147-53.
- 50 42. Nakaji S *et al.* (2001) "Relationship between mineral and trace element concentrations in drinking water and gastric cancer mortality in Japan." *Nutr Cancer.*40(2):99-102.
43. Wendakoon CN. *et al.* (2002) "Lack of therapeutic effect of a specially designed yogurt for the eradication of *Helicobacter pylori* infection" *Digestion.* 65 (1): 16-20.
44. Kumar R.S. *et al.* (2006) "Structural and functional analysis of a conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* reveals an evolutionary relationship with penicillin V acylase." *J. Biol. Chem.* 281: 32516-32525.
- 55 45. Eerola, S. *et al.* (1993) "Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages". *Int. J. AOAC* 76: 575-577.
46. Guilliland SE. (1998) Fermented milks and probiotics. En: Applied Dairy Microbiology (Marth EH y Steele JL, eds.) Maarcel Dekker, Inc., Nueva York, pp. 195-212.
- 60

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Corporación Alimentaria Penasanta

5 <120> Obtención de una nueva cepa de *Bifidobacterium bifidum* con actividad frente a la infección por *Helicobacter pylori*

<130> AX090058WO

10 <150> P200801154
<151> 22-04-2008

<160> 19

15 <170> Patent In versión 3,3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Artificial

<220>

<223> péptido procedente de la caseína bovina 1139,57 Da

25 <400> 1

Val Tyr Pro Phe Pro Gly Pro Ile His Asn
1 5 10

<210> 2

<211> 16

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido procedente de la caseína bovina de 1783,95 Da

35 <400> 2

Pro Pro Phe Leu Gln Pro Glu Val Met Gly Val Ser Lys Val Lys Glu
1 5 10 15

40 <210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> péptido procedente de la caseína bovina de 1889,97 Da

<400> 3

Asp Lys Ile His Pro Phe Ala Gln Thr Gln Ser Leu Val Tyr Pro Phe
1 5 10 15

50 <210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

55 <220>

<223> péptido procedente de la caseína bovina de 1978,99 Da

<400> 4

Pro Tyr Pro Gln Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe Leu Leu Tyr Gln
 1 5 10 15

5

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> péptido procedente de la caseína bovina.

<400> 5

Arg Asp Met Pro Ile Gln Ala Phe Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Val Leu
 1 5 10 15

Gly

15

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> péptido procedente de la caseína bovina 2310,26 Da

<400> 6

25

Pro Gln Asn Ile Pro Pro Leu Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro
 1 5 10 15

Phe Leu Gln Pro Glu
 20

30

<210> 7
 <211> 577
 <212> ADN
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos obtenida a partir del amplificado de ADNr 16S obtenido de la cepa CP5

<400> 7

ES 2 545 209 T3

tcatgcgacg gagctgaaga cgacatgcac accctgtgaa cctgccccgg aagggaaacg 60
 cctatctctg gcgctcgtcgg gaacattgtc aagcccaggg taaggttctt cgcgatgcat 120
 cgaattaatc cgcgatgctcc gccgcattgt gcgggcccc gtcaatttct ttgagtttta 180
 gccttgcgga cgtactcccc aggtcgggac gcttaacgcg ttagctccga cacggaacac 240
 gtggaacgtg tcccacatcc agcgcctccac cgtttacgga gatggactac cagggtatct 300
 aatcctgttc gctccccacg ctatcgctcc tcagcgtcag cgacggcca gagacctgcc 360
 ttcgccatog gagttcttcc cgatatctac acattccacc gtatacaccg ggtaattcca 420

 gtctctccta ccgctcttcc tgtcacgctc cgatacccgg cgcaaaccct ccgtctaagc 480
 gatggacttt cacaccagta cgcgacgagc cgcctacgta gccctttaac gccccaatca 540
 gaatccgat taacgttttg ctgcgcctac agaatta 577

<210> 8
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador Lm26
 10
 <400> 8
 gattctggct caggatgaac g 21

 <210> 9
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Cebador Lm3

 <400> 9
 cgggtgctg cccacttca tg 22

 25 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Cebador BiBif-1

 <400> 10
 35 ccacatgatc gcatgtgatt g 21

 <210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador BiBif-2

 <400> 11
 45 ccgaaggctt gctccaaa 19

<210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador BiLON-1

 10 <400> 12
 ttccagttga tcgcatggtc 20

 <210> 13
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador BiLON-2
 20
 <400> 13
 ggaagccgt atctctacga 20

 <210> 14
 25 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 30 <223> Cebador BiCAT-1

 <400> 14
 cggatgctcc gactcct 17

 35 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Cebador BiCAT-2

 <400> 15
 45 cgaaggcttg ctcccgat 18

 <210> 16
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador BIF

 <400> 16
 55 agtcagccac 10

 <210> 17
 <211> 10
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador RFL-2

ES 2 545 209 T3

<400> 17
cggcccctgt 10

5 <210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador 616V

<400> 18
agagttgat ymtggctcag 20

15 <210> 19
<211> 15

<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador 699R

<400> 19
rgggtgcgc tcggtt 15

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de *Bifidobacterium bifidum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo de Microorganismos (CECT) con el número de acceso CECT 7366, con actividad para inhibir *Helicobacter pylori*, y que tenga la capacidad de producir seis péptidos caracterizados por que su secuencia de aminoácidos sea SEC ID N°: 1 a 6, o un derivado de dichos péptidos.
- 10 2. Cepa de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las bacterias están presentes como células viables.
3. Cepa bacteriana de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** las bacterias están presentes como células no-viables.
- 15 4. Cultivo bacteriano **caracterizado por que** se ha obtenido a partir de la cepa bacteriana CECT 7366 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Cultivo bacteriano, **caracterizado por que** comprende células viables de la cepa bacteriana CECT 7366, de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2.
- 20 6. Cultivo bacteriano, **caracterizado por que** comprende células no viables de la cepa bacteriana CECT 7366, de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3.
- 25 7. Sobrenadante de cultivo de la cepa bacteriana CECT 7366 de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, obtenido por fermentación, que tiene actividad anti *H. pylori*.
8. Utilización de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 para la obtención de los péptidos SEC ID N°: 1 a 6.
- 30 9. Liofilizado, **caracterizado por que** se ha obtenido de la cepa bacteriana CECT 7366 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 10. Liofilizado de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado por que** contiene de $10^5 - 10^{11}$ ufc/g de células de cepa bacteriana CECT 7366, de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 3.
- 40 11. Utilización de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, para la preparación de una composición nutritiva y/o farmacéutica, caracterizada por que dicha bacteria y los péptidos SEC ID N°: 1-6 están presentes en una cantidad que sea suficiente para ejercer un efecto probiótico en dicha composición nutritiva y/o farmacéutica que un individuo necesite, preferiblemente contra *Helicobacter pylori*.
- 45 12. Composición nutritiva, que comprende una cantidad efectiva de la cepa *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 y los péptidos con aminoácidos SEC ID N°: 1 a 6, junto con cantidades apropiadas de otros alimentos.
13. Composición nutritiva de acuerdo con la reivindicación 12, en la que los otros alimentos se seleccionan del grupo que comprende helados, cereales, zumos, barritas de nutrición, productos lácteos como leche entera, leche desnatada, leche fermentada, leche en polvo, queso, yogures u otros derivados lácteos.
- 50 14. Composición nutritiva de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizada por que** es un yogur.
15. Composición de yogur de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizada por que** las células de la cepa *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 tienen una viabilidad de al menos un 80 % durante un periodo de 15 días cuando se mantiene a 5 °C.
- 55 16. Composición nutritiva de acuerdo con las reivindicaciones 12-15, **caracterizada por que** la cepa *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 está presente en una cantidad entre $10^5 - 10^{11}$ ufc/g de la composición.
- 60 17. Cepa de *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, para utilización para prevenir o curar úlceras gástricas o el cáncer estomacal producido por infección de *Helicobacter pylori*.
18. Composición farmacéutica que comprende un liofilizado de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 10 en una cantidad fisiológicamente efectiva junto con los vehículos y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables necesarios para prevenir o curar úlceras gástricas o el cáncer estomacal producido por infección de *Helicobacter pylori*.

19. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 18, **caracterizada por que** dicha composición está en forma sólida, como por ejemplo, píldoras, comprimidos, etc; en forma líquida, en suspensión o dispersión.

5 20. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicaciones 18-19, **caracterizada por que** además comprende antibióticos para tratar la úlcera gástrica.

21. Composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 18-20, **caracterizada por que** la cepa está presente en una cantidad entre 10^7 - 10^{11} ufc/g.

Figura 1A

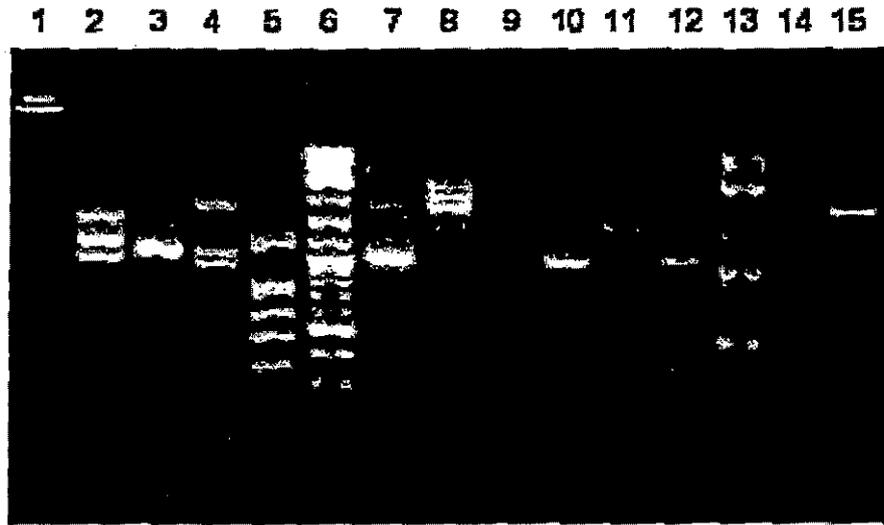


Figura 1B

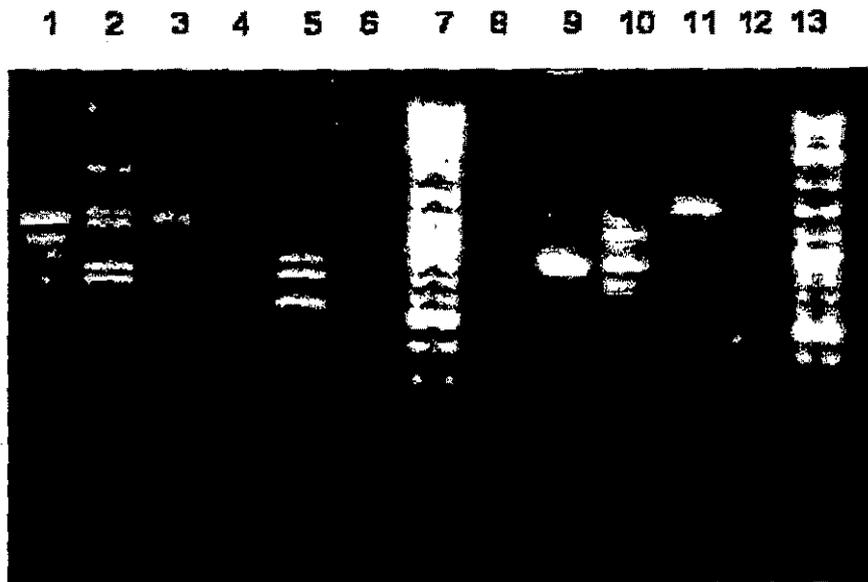


Figura 2

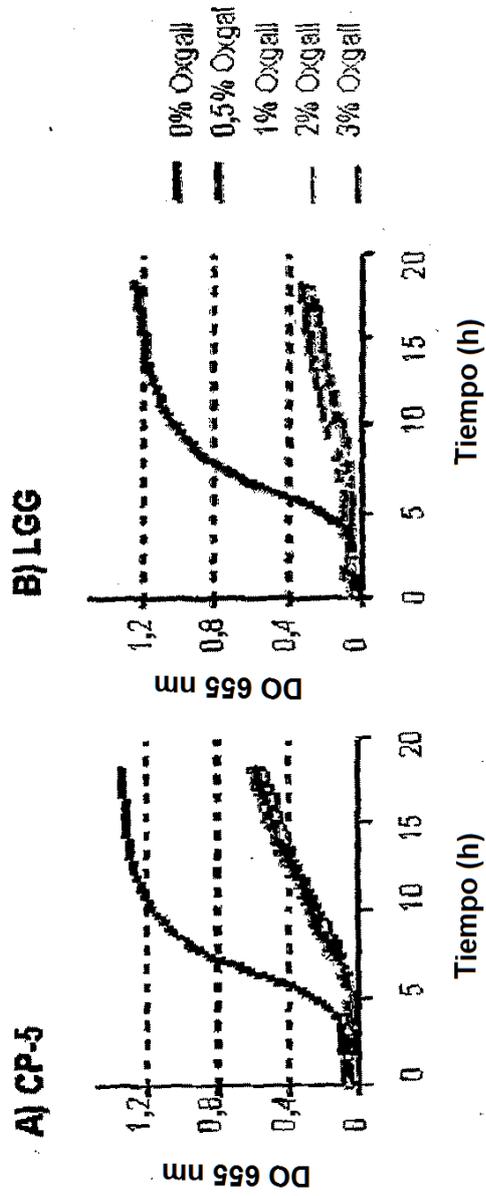


Figura 3

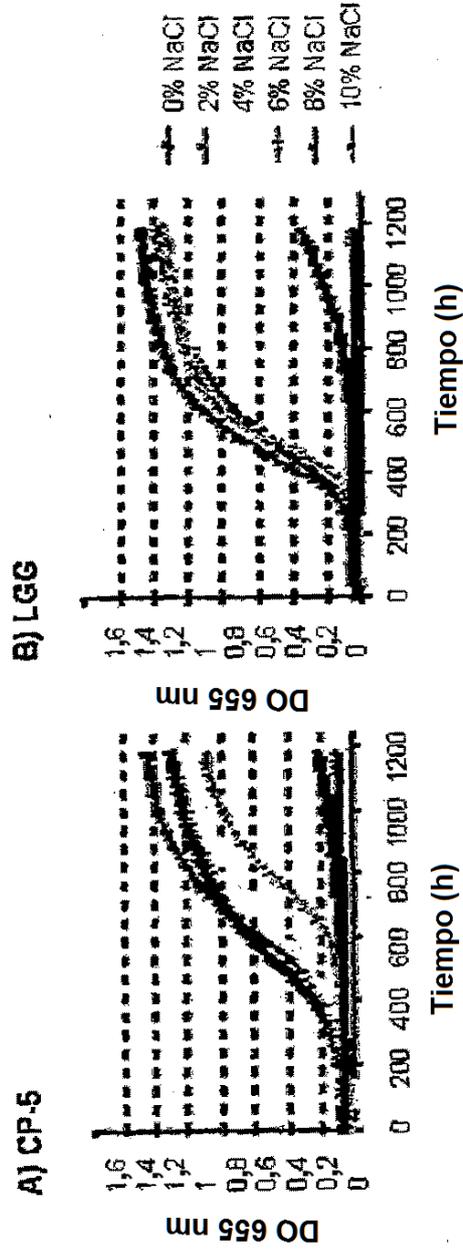


Figura 4

