

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 836**

51 Int. Cl.:

A23L 33/10 (2006.01)
A23L 33/17 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
C07K 14/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2011 E 11743093 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2590662**

54 Título: **Complejo macromolecular proveniente de Bifidobacterium longum y utilización de dicho complejo para prevenir y tratar los reumatismos inflamatorios**

30 Prioridad:

05.07.2010 FR 1055432

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.09.2016

73 Titular/es:

**BIFINOVE (100.0%)
99 rue du Jardin des Plantes
59000 Lille, FR**

72 Inventor/es:

**BLAREAU, JEAN-PIERRE;
COLAVIZZA, MICHEL;
HUGUET, FRÉDÉRIC y
ROMOND, CHARLES**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 581 836 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

Complejo macromolecular proveniente de *Bifidobacterium longum* y utilización de dicho complejo para prevenir y tratar los reumatismos inflamatorios

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un complejo macromolecular de origen bacteriano, así como a la utilización de dicho complejo macromolecular para la profilaxis y el tratamiento de reumatismos inflamatorios.

10

Estado de la técnica

Numerosos estudios científicos han demostrado el papel que juega la flora intestinal en la patogenia de las enfermedades inflamatorias reumáticas crónicas tales como poliartritis reumatoide, espondilitis anquilosante o reumatismos postinfecciosos.

15

Por ejemplo, la ausencia de signos de artritis se observa en los animales sin gérmenes (ratas o ratones transgénicos) mientras que los miembros de la misma camada que albergan una flora intestinal desarrollan signos de artritis (Rath HC, et al; J. Clin. Invest; 98(4); 945-953; 1996 y Abdollahi-Roodsaz S., et al; J. Clin. Invest; 118; 205-216; 2008).

20

Por otro lado, en el ser humano, estudios han mostrado que los pacientes cuya poliartritis reumatoide era de diagnóstico reciente, albergaban pocas bifidobacterias, con respecto a sujetos de control (Vaahtovuori J, et al; J. Rheumatol; 35; 690-693; 2008) y cuando el equilibrio de la flora intestinal estaba perfectamente restaurado mediante la introducción de una alimentación vegetariana, se descubría que el estado del paciente había mejorado (Peltonen R, et al; J. Rheumatol; 36; 64-68; 1997). Finalmente, es bien conocido que la utilización de ciertos antibióticos que modifican la composición de la flora intestinal mejora los signos de poliartritis reumatoide (Stone M. et al.; J. Rheumatol; 30; 2112-2122; 2003).

25

Uno de los mecanismos que explican la implicación de la flora intestinal en la patogenia de las enfermedades reumáticas crónicas reside en su capacidad para regular la translocación bacteriana. El mecanismo de translocación bacteriana se define mediante el paso de la barrera intestinal de bacterias intestinales. Estas bacterias intestinales son captadas y a continuación transportadas por células del sistema inmunitario intestinal, tales como células dendríticas o macrófagos hacia el sitio sinovial provocando un foco inflamatorio doloroso de tipo reumático a nivel de las articulaciones.

30

La composición de la flora intestinal influye en este proceso. De este modo, cuando las bifidobacterias colonizan ampliamente la parte baja del intestino, estas últimas muestran una capacidad de reducir la translocación bacteriana (Romond MB, et al.; Anaerobe; 14; 43-48; 2008).

35

Por otro lado, la composición de la flora intestinal influye también en el nivel de expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria, tales como las galectinas (Romond MB, et al; Fems Immunol Med Microbiol; 55; 85-92; 2009).

40

Actualmente existen numerosos productos capaces de modificar la flora intestinal, tales como los prebióticos o los probióticos. En cambio, pocos de entre estos tienen un impacto positivo sobre la translocación bacteriana. Entre los productos que tienen una acción beneficiosa frente a la translocación bacteriana, se encuentra la macromolécula aislada de cultivo de *Bifidobacterium breve*. En efecto, se ha demostrado en los documentos WO 2004/093898 y WO 2006/040485 que la administración por vía oral de esta macromolécula conllevaba una disminución de la translocación y de la diseminación bacteriana y que esta última presentaba una actividad preventiva de la artritis inducida por colágeno en el ratón. Sin embargo, una actividad proinflamatoria residual siempre se observa con la utilización de la macromolécula aislada de cultivo de *Bifidobacterium breve*, lo que limita su utilización en el campo de las enfermedades inflamatorias.

45

Sería ventajoso, por lo tanto, disponer de un producto que permita una disminución de la translocación bacteriana y que no presentara actividad proinflamatoria residual.

50

Objeto de la invención

Ahora bien, la solicitante ha descubierto que la utilización de un complejo macromolecular aislado de cultivo de *Bifidobacterium longum* permitía responder a estas exigencias.

55

El complejo macromolecular de la presente invención es producido por la cepa *Bifidobacterium longum* CBi0703, depositada según el tratado de Budapest con el número CNCM I-3994 a nombre de BIFINOVE, el 23 de mayo de 2008 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) mantenida por el Institut Pasteur, 25 rue du docteur Leroux 75015 París.

60

macromolecular; la de N-acetilglucosamina está comprendida entre 1 y 10 µg/mg de complejo macromolecular, preferentemente entre 1 y 5 µg/mg de complejo macromolecular; la de ramnosa está comprendida entre 0,05 y 10 µg/mg de complejo macromolecular, preferentemente entre 0,05 y 5 µg/mg de complejo macromolecular, y aún más preferentemente entre 1 y 5 µg/mg de complejo macromolecular.

5 Los lípidos que constituyen la parte lipídica del complejo macromolecular de la presente invención pueden seleccionarse entre el grupo constituido por ácidos grasos saturados largos de C14, C16, C18 y sus mezclas.

10 Por otro lado, se ha demostrado que esta estructura macromolecular es reconocida por la galectina-1 y el TLR-6, lo que indica, por un lado, que unidades de galactosa están en posición externa accesible al receptor galectina 1 (reconociendo la galectina 1 la galactosa presente en la lactosa, y sobre todo la galactosa en posición externa presente en los glicoconjugados) y, por otro lado, que el complejo macromolecular conserva unidades de lipoproteína reconocibles por la subunidad específica de las lipoproteínas del complejo TLR2/6.

15 Los ensayos efectuados por la solicitante han demostrado que la administración de dicho complejo macromolecular induce una actividad antiartrítica en ratón, en un modelo de artritis inducida por colágeno.

Esta actividad antiartrítica se ha demostrado a través de varias observaciones:

- 20 - una mejora de la respuesta transcriptómica de las células dendríticas a la translocación bacteriana en ratón asociada a un biotopo de paciente aquejado de artritis;
- un condicionamiento de estas células dendríticas que conlleva una coevolución con la población de linfocitos T reguladores responsable de la producción de interleuquina-10 (citoquina con un papel importante en la inmunomodulación en el sistema digestivo y que presenta concretamente efectos antiinflamatorios).

25 El complejo macromolecular de acuerdo con la invención se obtiene mediante un procedimiento que consta de las etapas siguientes:

- 30 (i) la siembra y la incubación durante de 16 a 60 h, en condiciones anaerobias y a una temperatura comprendida entre 30 °C y 39 °C aproximadamente, de una cepa de *Bifidobacterium longum* depositada según el tratado de Budapest con el número CNCM I-3994 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) en un medio de cultivo y que comprende una fracción de proteínas de lactosuero nativas o hidrolizadas, lactosa y un agente antioxidante;
- 35 (ii) la separación de dichas bacterias de dicho medio de cultivo;
- (iii) la ultrafiltración del sobrenadante en membranas de filtración que tienen un umbral de corte de 10 a 100 kDa, que conduce a la obtención de un retentado concentrado;
- (iv) el enriquecimiento en complejo macromolecular mediante lavado con un volumen de 5 a 50 veces el volumen del retentado concentrado;
- 40 (v) la purificación del complejo macromolecular mediante cromatografía de exclusión molecular en condiciones estériles, por ejemplo en gel Superdex 200;
- (vi) la recuperación de la fracción excluida que comprende el complejo macromolecular bacteriano.

45 Es importante prevenir la oxidación durante el procedimiento, de ahí la necesidad de introducir un agente antioxidante tal como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína o tioglicolato.

De acuerdo con una realización, el medio de cultivo contiene además otros compuestos tales como dihidrogenofosfato de potasio que interviene en la estabilización del pH.

50 De acuerdo con una realización, la siembra de las bifidobacterias en dicho medio de cultivo puede realizarse a partir de un concentrado congelado o de un precultivo de 16-24 h, que permite la proliferación de las bacterias.

De acuerdo con otra realización que puede combinarse con la anterior, las bacterias se siembran en dicho medio de cultivo a razón de 10^5 - 10^{10} unidades formadoras de colonias por ml de medio.

55 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el medio de cultivo consta de 1 a 20 g/l de medio de proteínas de lactosuero nativas o hidrolizadas, 30 a 80 g/l de medio de lactosa y 0,1 a 0,5 g/l de medio de ácido ascórbico. De acuerdo con otra realización preferida de la invención, el medio de cultivo consta de 1 a 20 g/l de medio de proteínas de lactosuero nativas o hidrolizadas, 30 a 80 g/l de medio de lactosa y 0,1 a 0,5 g/l de medio de ácido ascórbico y 0,5 y 3 g/l de medio de dihidrogenofosfato de potasio.

60 De acuerdo con una realización que puede combinarse con las anteriores, el pH de dicho medio de cultivo no está regulado durante la incubación.

65 Finalmente, de acuerdo con otra realización, el pH de dicho medio de cultivo se mantiene entre 4 y 7 durante la incubación.

La invención se refiere a la utilización del complejo macromolecular de origen bacteriano de acuerdo con la invención para prevenir y tratar los trastornos articulares, para la regulación de la flora intestinal y de la translocación bacteriana.

5 De acuerdo con otro aspecto, la presente invención tiene por objeto la utilización de dicho complejo macromolecular de origen bacteriano obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en productos destinados a la industria farmacéutica, agroalimentaria y/o nutracéutica.

10 La invención tiene concretamente por objeto una composición farmacéutica que comprende al menos dicho complejo macromolecular, como principio activo, y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable.

La concentración másica de dicho complejo macromolecular representa de 0,1 µg/g a 50 µg/g de la composición farmacéutica.

15 Por farmacéuticamente aceptable, se entiende cualquier soporte que permite, no solamente conservar las propiedades inmunomoduladores del complejo macromolecular obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, sino también transportar dicho complejo macromolecular.

20 La utilización de la composición farmacéutica permite regular la flora intestinal y la translocación bacteriana. Ésta está destinada, por consiguiente, a la profilaxis y al tratamiento de reumatismos inflamatorios tales como poliartritis reumatoide y espondilitis anquilosante y de artrosis.

25 La invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de la composición farmacéutica para la obtención de un medicamento destinado a regular la flora intestinal y la translocación bacteriana.

De este modo, la invención se refiere a una composición farmacéutica para una utilización en la regulación de la flora intestinal y la translocación bacteriana.

30 La invención también se refiere a la utilización de la composición farmacéutica para la obtención de un medicamento destinado a tratar o a prevenir reumatismos inflamatorios y artrosis.

De este modo, la invención se refiere a una composición farmacéutica para una utilización en el tratamiento y la prevención de reumatismos inflamatorios y de artrosis.

35 La invención también se refiere a la utilización de la composición farmacéutica para la obtención de un medicamento destinado a tratar poliartritis reumatoide y espondilitis anquilosante, artrosis y fibromialgia.

40 De este modo, la invención se refiere a una composición farmacéutica para una utilización en el tratamiento de poliartritis reumatoide y de espondilitis anquilosante, y de artrosis. La composición farmacéutica de la presente invención puede presentarse en cualquier forma galénica deseada para una administración por vía oral al ser humano o al animal como por ejemplo en forma líquida (jarabe, solución, spray) o en forma sólida (polvo, comprimido, gragea, cápsula, spray en polvo, goma, pasta, granulados, en sus diversas formas, de liberación inmediata o programada), o por vía rectal, nasal, pulmonar, parental o en una forma adaptada a una administración por inhalación o insuflación. La vía de administración preferida es generalmente la vía oral.

45 La composición farmacéutica que comprende dicho complejo macromolecular puede conservarse a una temperatura de -70 °C a +4 °C para las formas líquidas y hasta +40 °C para las formas sólidas durante 3 años.

50 Por otro lado, el complejo macromolecular obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente también puede incorporarse, como ingrediente, en composiciones alimentarias.

Por consiguiente, la invención también tiene por objeto una composición alimentaria que comprende al menos el complejo macromolecular y al menos un ingrediente alimentario. El ingrediente alimentario puede ser, por ejemplo, una preparación láctea, cereales, etc.

55 Dicha composición alimentaria puede estar destinada al ser humano o a un animal y puede encontrarse concretamente en forma de productos alimentarios dietéticos o no, de uso hospitalario o no. En particular, esta composición puede ser un soluto enteral.

60 La concentración másica de dicho complejo macromolecular representa de 10 µg/g a 2 µg/g, preferentemente de 10 µg/g a 1 µg/g de la composición alimentaria.

Finalmente, el complejo macromolecular obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente puede incorporarse como ingrediente alimentario en composiciones nutracéuticas.

65 La invención tiene, por lo tanto, como objeto una composición nutracéutica que comprende al menos dicho complejo

macromolecular, y al menos un soporte nutracéuticamente aceptable.

La concentración másica de dicho complejo macromolecular representa de 10 µg/g a 5 µg/g de la composición nutracéutica.

5 Por composición nutracéutica, se entiende una composición que posee efectos fisiológicos beneficiosos o protectores superiores a los que podría aportar la nutrición clásica.

10 Dicha composición nutracéutica puede encontrarse en forma de suplementos nutricionales. Estos suplementos nutricionales pueden estar en forma sólida, tales como comprimidos, polvos, grageas, cápsulas, o en forma líquida tales como bebidas o emulsiones.

15 La composición nutracéutica de acuerdo con la invención puede utilizarse, por lo tanto, para prevenir reumatismos inflamatorios, artrosis.

La invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de dicha composición nutracéutica para la obtención de un suplemento nutricional destinado a prevenir reumatismos inflamatorios, artrosis.

20 De este modo, la invención se refiere a una composición nutracéutica para una utilización en la prevención de reumatismos inflamatorios, y de artrosis.

Descripción de las figuras

25 La figura 1 representa el reconocimiento in vitro por la galectina-1 del complejo macromolecular obtenido con una fermentación a pH regulado o a pH no regulado de acuerdo con la invención.

La figura 2 representa el reconocimiento in vitro por TLR-6 del complejo macromolecular obtenido con una fermentación a pH regulado o a pH no regulado de acuerdo con la invención.

La figura 3 representa la puntuación de artritis en ratones DBA1 después de dos inyecciones de colágeno con o sin tratamiento con el complejo macromolecular preparado de acuerdo con el ejemplo 2 (0,2 mg/l, es decir 30-40 µg/kg).

30 La figura 4 representa la evolución de la artritis inducida por un coctel de anticuerpos y de LPS en ratones DBA1.

La figura 5 representa la evolución de la puntuación de artritis en los ratones DBA1 tratados con el complejo macromolecular hidrolizado (0,2 mg de complejo macromolecular hidrolizado/l).

35 La figura 6a representa articulaciones de miembros posteriores izquierdos (que no han experimentado inyección de yodoacetato de sodio: MIA) de ratas que pertenecen al grupo de control no tratado con el complejo macromolecular de la invención.

La figura 6b representa articulaciones de miembros posteriores izquierdos (que no han experimentado inyección de MIA) de ratas que pertenecen al grupo tratado con el complejo macromolecular de la invención.

40 Las figuras 7a y 7b representan articulaciones de miembros posteriores derechos (que han experimentado una inyección de MIA) de ratas que pertenecen al grupo de control no tratado con el complejo macromolecular de la invención.

Las figuras 7c y 7d representan articulaciones de miembros posteriores derechos (que han experimentado una inyección de MIA) de ratas que pertenecen al grupo tratado con el complejo macromolecular de la invención.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

50 Ejemplo 1 Preparación y aislamiento del complejo macromolecular de acuerdo con la invención (pH regulado durante la fermentación)

Se prepara un medio de cultivo que contiene los siguientes ingredientes:

- 55
- de 1 a 20 g/l de una base proteica compuesta por permeado de proteínas de leche hidrolizado o en forma nativa
 - de 30 a 80 g/l de lactosa
 - de 0,1 a 0,5 g/l de ácido ascórbico
 - de 0,5 a 3 g/l de dihidrogenofosfato de potasio

60 Una primera solución se reconstituye con lactosa sola y se esteriliza a 108 °C durante 130 minutos. Una segunda solución se reconstituye con el resto de los ingredientes y se esteriliza a 121 °C durante 20 minutos.

La fermentación es de tipo discontinuo a pH regulado durante 24 horas.

65 1- Fermentación de tipo discontinuo a pH regulado

El pH se ajusta a un valor de 6,5 una vez vertidas las dos soluciones en el fermentador. El medio de cultivo se siembra con del 6 al 10 % (v/v) de un inóculo de 24 h que contiene entre 1×10^6 y 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de bifidobacterias procedentes de la cepa *Bifidobacterium longum* depositada con el número CNCM I-3994 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) por ml de medio de cultivo. Las bacterias se cultivan con agitación, sin aireación del medio y a una temperatura de 37 °C. El pH se mantiene a 6,5 mediante adición de sosa (1 N a 3 N) durante la fermentación.

La fermentación dura 24 horas y la población de *Bifidobacterium longum* al final del cultivo está comprendida entre 2×10^8 y 1×10^{10} UFC por ml de medio de cultivo.

2- Aislamiento del complejo macromolecular

Al final del cultivo, las bacterias se eliminan mediante centrifugado a 13000 g durante 30 minutos a una temperatura de 4 °C o mediante microfiltración en cartuchos MILLISTACK (Millipore) de superficie apropiada al volumen de fermentación.

El sobrenadante se ultrafiltra a temperatura ambiente y en condiciones estériles en un aparato de tipo AMICON Proflex M12 (Millipore). Una primera ultrafiltración se efectúa en un cartucho espiralado de tipo HELICON (Millipore) de un umbral de corte de 10 Da.

El sobrenadante se concentra como máximo 15 veces, a continuación se lava de forma continua con agua osmotizada estéril, 30 veces el volumen concentrado. El retentado de 10 kDa recuperado se conserva a 4 °C o se congela para la segunda ultrafiltración.

La segunda ultrafiltración se realiza también a temperatura ambiente y en condiciones estériles en el mismo aparato que anteriormente pero equipado con un soporte para cartuchos de tipo PELLICON (Millipore). El cartucho utilizado es de tipo BIOMAX de 0,5 m² de superficie y de un umbral de corte de 100 kDa. El retentado de 10 kDa se concentra como máximo 2 veces y a continuación se lava de forma continua con 30 volúmenes de agua osmotizada.

El retentado >100 kDa se conserva en forma congelada o liofilizada hasta la purificación.

El complejo macromolecular contenido en el retentado >100 kDa, se obtiene a continuación en condiciones estériles mediante cromatografía de exclusión en un gel de tipo Superdex 200 (GE Healthcare). El complejo macromolecular se separa de este modo y a continuación se eluye en la fracción excluida (> 600 kDa) con un tampón Tris/HCl 50 mM - NaCl 150 mM, pH 8,0.

Esta fracción excluida es desalada a continuación por filtración, a continuación se diafiltra con de 5 a 7 volúmenes de agua osmotizada estéril. El complejo macromolecular se recupera y se conserva de este modo en una forma liofilizada.

Ejemplo 2: Preparación y aislamiento del complejo macromolecular de acuerdo con la invención (pH no regulado durante la fermentación)

La composición del medio de cultivo y las etapas son las mismas que en el ejemplo 1 a excepción de que, en este ejemplo, el pH no está regulado durante la fermentación, la etapa 1 es reemplazada de este modo por la etapa descrita a continuación.

1-Fermentation de tipo discontinuo a pH no regulado durante la fermentación:

El pH se ajusta a un valor de 6,5 una vez vertidas las dos soluciones en el fermentador. El medio de cultivo se siembra con del 6 al 10 % (v/v) de un inóculo de 24 h, que comprende entre 1×10^6 y 2×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de bifidobacterias procedentes de la cepa *Bifidobacterium longum* depositada con el número CNCM I-3994 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) por ml de medio de cultivo. Las bacterias se cultivan con agitación, sin aireación del medio y a una temperatura de 37 °C. El pH no se ajusta durante la fermentación. La fermentación dura 24 horas y la población de *Bifidobacterium longum* al final del cultivo está comprendida entre 1×10^7 y 1×10^9 UFC por ml de medio de cultivo.

El aislamiento del complejo macromolecular puede realizarse a continuación de acuerdo con la etapa 2 del ejemplo 1.

En lo sucesivo en este texto, C1 hace referencia al complejo macromolecular preparado de acuerdo con el ejemplo 2 de la invención.

Ejemplo 3 Caracterización del complejo macromolecular

Las partes sacarídicas, proteicas y lipídicas de las que está constituido el complejo macromolecular se

con ayuda el sistema MACs. La flora intestinal se analizó en el íleon, el ciego y el colon. La translocación bacteriana se evaluó mediante análisis bacteriológico de las placas de Peyer, del hígado, del pulmón, de los riñones y de la sangre.

- 5 Los resultados se agruparon en la tabla 2 y demuestran claramente un aumento de la tasa de bifidobacterias a lo largo del intestino de los ratones tratados con C1 y muestra de este modo el efecto beneficioso de la administración de este último sobre la flora intestinal.

Tabla 2: Efecto de la administración del complejo macromolecular C1 sobre la flora intestinal.

	control	ensayo	p
Ratón (n)	6	5	
<i>íleon</i>			
E. coli	5,38 ± 0,6 (5)	4,89 ± 1,3 (5)	NS
Bifidobacterias	2,68 ± 0,7 (2)	3,49 ± 1,7 (5)	0,0398
<i>ciego</i>			
E. coli	7,89 ± 0,3 (6)	7,52 ± 0,4 (5)	NS
Bifidobacterias	3,06 ± 0,4 (3)	6,43 ± 1,5 (5)	0,0061
<i>colon</i>			
E. coli	7,61 ± 1,4 (6)	8,11 ± 0,4 (5)	NS
Bifidobacterias	3,0 ± 0,8 (6)	6,56 ± 1,5 (5)	0,0057

10 **Ejemplo 5: Implicación de las bacterias intestinales en la artritis en los ratones DBA1 y efecto del complejo macromolecular C1 de la invención**

Para este estudio, se establecieron dos modelos de acuerdo con el tipo de inyección seleccionada:

- 15 - Modelo 1: dos dosis de colágeno a un intervalo de tres semanas se inyectan en ratones DBA1;
 - Modelo 2: un cóctel de anticuerpos anticólageno (MD Biosciences) seguido de una inyección tres días más tarde de LPS (lipopolisacárido) se inyectan en ratones DBA1.

20 Sea cual sea el modelo, estas inyecciones inducen un cuadro clínico evocador de PAR (poliartritis reumatoide). La puntuación de artritis se establece estimando el enrojecimiento y la hinchazón de las patas.

El tratamiento con el complejo macromolecular C1 se inició 15 días antes de la primera inyección del inductor (modelo 1-figura 3), o con la aparición de los síntomas (modelo 2-figura 4). Las concentraciones del complejo macromolecular C1 se escalonan entre 0,1 mg/l y 0,5 mg/l, es decir dosis diarias estimadas entre 10 y 100 µg/kg de peso corporal.

La dosis eficaz está situada en una horquilla de 30 a 90 µg/kg de acuerdo con el modelo de inducción de artritis (figuras 3 y 4).

30 La puntuación aumenta aproximadamente diez días después de la segunda inyección de colágeno en el primer modelo y 3-4 días después de la inyección de LPS en el segundo caso.

Después de tres días de interrupción (modelo 2), el tratamiento se administra de nuevo (a razón de 0,2 mg/l, es decir de 0,01 a 0,05 mg del complejo macromolecular C1/kg de peso corporal).

40 La tabla 3 representa el análisis concomitante de la flora intestinal y muestra que la intensidad de la inflamación articular es más intensa cuando el número de células dendríticas esplénicas es bajo, en tratamiento con el complejo macromolecular C1 de la invención, mientras que no existe ninguna dependencia entre los dos factores en ausencia de tratamiento.

Ahora bien, se observa en los ratones tratados que el número de células dendríticas esplénicas está ligado no solamente a una población de lactobacilos (Lb09) sino también a la población de *Bacteroides* del ciego. En ausencia de tratamiento, el número de células dendríticas está afectado exclusivamente por poblaciones de lactobacilos. En los dos grupos de ratones, cuanto más elevado es el número de *Lactobacillus* 09 en el colon, menos células dendríticas alberga el bazo. Pero la correlación entre *Lactobacillus* 09 e intensidad de la inflamación articular solamente se vuelve significativa cuando el tratamiento anula el efecto de una segunda población de lactobacilos (*Lactobacillus* 081) sobre las células dendríticas (tabla 3).

50 Se observa, por lo tanto, una correlación entre esta población de lactobacilos (Lb 081) localizada en el ciego y las placas de Peyer y la intensidad de la inflamación en ausencia de tratamiento mientras que no se ha encontrado ninguna dependencia con tratamiento aunque la población de *Lactobacillus* 081 no disminuye (tabla 3).

En conclusión, el tratamiento no tiene ningún efecto antibacteriano frente a la población de lactobacilos, sino que incluye en el balance metabólico de los lactobacilos Lb081, de los cuales uno o varios de los productos finales podrían estar implicados en la inflamación articular.

5

Tabla 3: Correlación entre poblaciones bacterianas intestinales, puntuación de artritis y células dendríticas de acuerdo con el tratamiento

Ratón de control		rs*	p
localización	Bacterias	Frente a puntuación de artritis	
Intestino delgado	<i>Lactobacillus reuteri</i>	-0,736	<0,04
	<i>Streptococcus sp.</i>	-0,812	<0,02
Ciego	<i>Lactobacillus sp. 081</i>	0,88	<0,01
	<i>Bacteroides fragilis</i>	-0,862	<0,006
Colon	<i>Streptococcus sp.</i>	-0,986	<0,0004
Placas de Peyer	<i>Lactobacillus sp. 081</i>	0,88	<0,01
	<i>Streptococcus sp.</i>	-0,736	<0,05
		frente a CD esplénicas	
Intestino delgado	<i>Lactobacillus sp. 081</i>	0,771	<0,05
Colon	<i>Lactobacillus sp. 09</i>	-0,829	<0,01

Ratón tratado con el complejo macromolecular		rs*	p
Localización		frente a puntuación de artritis	
Ciego	<i>Bacteroides sp.</i>	-0.791	<0,05
Colon	<i>Lactobacillus sp. 09</i>	0,805	<0,02
Placas de Peyer	<i>Lactobacillus sp. 082</i>	-0,77	<0,02
		frente a CD esplénicas	
Ciego	<i>Bacteroides fragilis</i>	0,829	<0,05
Colon	<i>Lactobacillus sp. 09</i>	-0,829**	<0,05

*rs=coeficiente de Spearman

**correlación de puntuación de artritis en función del número de células dendríticas rs=-0,812 p<0,05

Ejemplo 6: Importancia de la agregación de las cadenas que constituyen el complejo macromolecular C1 de la invención

10

Este ejemplo demuestra el efecto de la hidrólisis ácida sobre la eficacia antiartrítica.

28 mg del complejo macromolecular preparado de acuerdo con el ejemplo 2 se diluyen en 100 ml de una solución de ácido acético al 70 %. La solución se lleva a 75 °C durante 100 min. La degradación en moléculas de baja masa molecular se verifica mediante cromatografía en Superdex 200 (la concentración de macromolécula residual es del orden del 2,5 %). Después de la liofilización del producto degradado que permite la eliminación del ácido acético, el polvo se recupera en un volumen de agua estéril equivalente para administración a ratones DBA1 (modelo 1).

15

De acuerdo con la figura 5, se observa un efecto proartrítico, siendo las puntuaciones de artritis más elevadas a lo largo del tiempo en el grupo tratado con la macromolécula hidrolizada (ANOVA dos factores medidos repetidos, p=5,43852E-08). En conclusión, es necesario que las unidades de lipoproteína bífida asociadas a los oligosacáridos se agreguen en forma de macromoléculas para que se observe actividad antiartrítica.

20

Ejemplo 7: Comparación entre el efecto de la administración del complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium breve* y el procedente de la cepa *Bifidobacterium longum*

25

La tabla 4 demuestra el efecto del tratamiento con el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* (C1) por un lado y compara este último con el producido por la administración del complejo macromolecular procedente de la *Bifidobacterium breve* (tal como se describe en el documento WO 2006/040485).

30

En lo sucesivo en este texto, C2 hace referencia al complejo macromolecular preparado de acuerdo con el ejemplo 1 del documento WO 2006/040485.

35

El protocolo experimental es idéntico al descrito en el ejemplo 4.

Los resultados agrupados en la tabla 4 muestran que:

- el número de linfocitos Th CD4(+) esplénicos es más bajo en los ratones tratados con C2 (complejo

macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium breve*) con respecto a los ratones de control o a los tratados con C1 (complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum*)
 - el número de linfocitos Treg (células reguladoras) es menor en los ratones tratados con C2 con respecto a los ratones de control o a los tratados con C1.

5 Estos resultados muestran, de este modo, que el tratamiento es menos eficaz en el caso de la administración del complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium breve* que con el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* depositada con el número CNCM I-3994. En efecto, la administración del complejo de acuerdo con la invención mantiene la producción de células T reguladoras, células que juegan un papel preponderante en la respuesta antiinflamatoria.
 10

Tabla 4: Población celular en función del tratamiento administrado

FA	Células dendríticas	Linfocitos	T
ratón (n)*	CD11c	Th	Treg
		CD4+	CD4+, CD25+
Tratamiento de control (4)	3,6 ± 0,9**	5,30 ± 0,6	0,32 ± 0,04
C1 (4)	3,04 ± 0,3	5,2 ± 0,3	0,30 ± 0,07
C2 (4)	3,28 ± 0,6	4,07 ± 1,0	0,22 ± 0,03

* los ratones son de edad comparable (aproximadamente 7 meses)

a: expresión en % de esplenocitos

**ratones asociados a flora de voluntario sano CD11c= 4,76 ± 1,6

Por otro lado, la tabla 5 representa la correlación de Spearman entre las poblaciones celulares.

15 De demuestra en esta tabla que las tasas de células dendríticas y de linfocitos T esplénicos se correlacionan en los ratones tratados con el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* **C1** (correlación de Spearman cercana a 1) mientras que las poblaciones celulares son numéricamente independientes en los ratones tratados con el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium breve* **C2** (correlación de Spearman cercana a 0).
 20

Más específicamente, la tasa de células dendríticas en los ratones tratados con el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* **C1** se correlaciona con la subpoblación de linfocitos T, los linfocitos Treg CD4, CD25 productos de interleuquina 10 antiinflamatoria. Las dos poblaciones celulares evolucionan, por lo tanto, de forma dependiente en tratamiento con el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* **C1**. El complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* **C1** acondiciona, por lo tanto, las células dendríticas, lo que facilita el reclutamiento por estas células de los linfocitos productores de interleuquina 10.
 25

Tabla 5: correlación de Spearman entre las poblaciones celulares de acuerdo con el tratamiento

rs*	CD11c frente a Th CD4+ p	CD11c frente a Th CD4+, CD25+ p
Tratamiento de control (9)	0,45	NS
C1(7)	0,81	<0,05
C2 (7)	0,16	NS

Ejemplo 8: Modificación de la expresión de los genes

35 Las tablas 6 y 7 demuestran el efecto del tratamiento unido a la administración del complejo macromolecular C1 frente a la expresión de los genes comparando las expresiones de los genes de las células dendríticas de ratón asociadas a una flora de paciente artrítico con respecto a ratones asociados a la flora de voluntario sano (**FA frente a FN** en la tabla 6) con los de células dendríticas de bazo de ratón asociado a una flora de paciente artrítico tratadas durante 15 días con 0,2 mg/l del complejo macromolecular C1 con respecto a ratones no tratados (**FAt frente a FA** en la tabla 6). Estos resultados muestran que la hiperestimulación de la flora en el sistema inmunitario se lleva de nuevo a la normal con el tratamiento.
 40

En efecto, en el caso de ratones que albergan una flora de artritis, cierto número de genes están sobreexpresados tales como genes de proteólisis o de hidrólisis de los azúcares que intervienen en la digestión de los antígenos captados por las células dendríticas, así como de los genes implicados en la inflamación (elastasa). Después del tratamiento (FAt frente a FA), se encuentra una expresión similar a la de ratones que albergan una flora de sujeto sano: a modo de ejemplo para elastasa, la relación FC de su expresión en ratones que albergan la flora de artritis (**FA**) frente a ratones que albergan una flora de sujeto sano (**FN**) (**FA frente a FN antes del tratamiento**) es de +24,725. Después del tratamiento de los ratones que albergan la flora de artritis con el complejo macromolecular C1, la relación FC que compara su expresión con la de los ratones que albergan la flora de paciente aquejado de artritis no tratados (**FAt frente a FA**) (**después del tratamiento**) es de -23,92, es decir un retorno a su expresión de base en un ratón que albergan una flora de sujeto sano.
 45
 50

Por otro lado, la tabla 7 demuestra los genes que no han sido sobreexpresados por la flora de artritis con respecto a la flora de sujeto sano pero cuya expresión está igualmente modificada por la administración del tratamiento con la C1. Por ejemplo, el gen de la prostaglandina 2 reductasa está sobreexpresado, lo que sugiere una atenuación de la inflamación. Del mismo modo, el gen Ednrb implicado en los procesos inflamatorios está sobreexpresado tras el tratamiento.

Ejemplo 9: Prevención de la artrosis quimio-inducida en rata por administración del complejo macromolecular

Modo operatorio:

La artrosis es inducida en ratas de la cepa CD macho de 125-150 g (CHARLES RIVER) por una inyección en la articulación tibio-femoral derecha de 3 mg (0,05 ml de una solución a 60mg/ml) de yodoacetato de sodio (MIA).

Los animales son observados a continuación (gradación de la cojera) durante un periodo postoperatorio de aproximadamente 15 días antes de recibir de forma continua el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* C1 (solución acuosa de 0,3 mg de complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* C1/l) por hueso durante 3 semanas (periodo de adaptación).

Durante las 5 semanas siguientes, la misma solución de complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* C1 se administra de forma discontinua (alternancia entre agua durante 3-4 días y administración de la solución que contiene el complejo macromolecular C1 durante 3-4 días). De este modo, las dosis recibidas por las ratas durante el periodo de adaptación son de $26,3 \pm 7 \mu\text{g}$ de complejo macromolecular C1/Kg de peso corporal, a continuación durante el periodo de administración de las 5 semanas siguientes, de $18,9 \pm 6 \mu\text{g}$ de complejo macromolecular C1/Kg de peso corporal.

Una vez finalizado en ensayo, las ratas son sacrificadas mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (CEVA Santé animale) de 2 a 4 horas después de haberles retirado la bebida y la alimentación.

Por otro lado, ratas que no hayan recibido la administración del complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* C1 también son sacrificadas (grupo de control).

Las articulaciones de los miembros posteriores de las ratas que pertenecen al grupo tratado con el complejo macromolecular procedente de la cepa *Bifidobacterium longum* C1 y las ratas del grupo de control son extraídas y se observa la unión articular tibio-femoral (figuras 6 y 7).

En las figuras 6 y 7, 1 representa el fémur, 2 representa el cartílago, 3 representa la membrana sinovial, 4 representa la rótula y 5 representa la tibia.

Además, se realiza un análisis bacteriológico en los siguientes órganos: sangre, pulmón, hígado, bazo, riñón, placas de Peyer, íleon (tres fragmentos), ciego, colon.

Resultados:

Las figuras 6a y 6b no demuestran ninguna deformación de las articulaciones de los miembros posteriores. Los miembros posteriores derechos (inyección de MIA) de ratas no tratadas con el complejo macromolecular C1 muestran una deformación evocadora de las lesiones de artrosis (figuras 7a y 7b). Por el contrario, no se observa deformación en ratas que han recibido el complejo macromolecular C1 (50 % de ratas sensibles) (figuras 7c y 7d).

Por otro lado, el análisis bacteriológico permite formular las siguientes observaciones. En las ratas sensibles, la flora intestinal se modifica en varios sitios:

- los estafilococos son indetectables en el íleon distal,
- las enterobacterias (diferentes de *E. coli*) son indetectables en el colon,
- se observa una disminución de clostridios en el ciego ($<2,7$ frente a $3,2 \pm 0,5 \log \text{ufc/g}$ en las ratas de control),
- se observa una disminución de enterococos en el colon ($<5 \log \text{ufc/g}$ frente a $6,2 \pm 0,5 \log \text{ufc/g}$ en las ratas de control).

Por otro lado, se observa una translocación de lactobacilos en el pulmón ($4,2 \pm 2,5 \log \text{ufc/g}$) mientras que los pulmones de las ratas no protegidas son estériles o están contaminados por estafilococos.

Conclusiones:

Cuando la administración del complejo macromolecular de la invención modifica el equilibrio de la flora intestinal en el modelo de artrosis y la translocación bacteriana, ésta protege eficazmente el animal del proceso degenerativo

inducido por la inyección de MIA.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> BIFINOVE
- <120> COMPLEJO MACROMOLECULAR DE ORIGEN BACTERIANO Y UTILIZACIÓN DE DICHO COMPLEJO MACROMOLECULAR PARA PREVENIR Y TRATAR LOS REUMATISMOS INFLAMATORIOS
- 10 <130> BCT110303QT
- <150> FR1055432
- <151> 05-07-2010
- 15 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 20 <211> 229
- <212> PRT
- <213> *Bifidobacterium longum*
- <400> 1

25

Met Thr Asn Val Arg Val Ile Lys Pro Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala
1 5 10 15

30

Ala Ala Ala Cys Val Gly Gly Leu Ala Phe Ser Ser Ala Gln Pro Ala
20 25 30

35

Gln Ala Asp Thr Tyr Ser Asp Leu Ile Asn Ala Gln Asn Gln His Ala
35 40 45

40

Ala Ser Val Gln Arg Glu Ala Glu Leu Lys Gln Gln Leu Ala Gly Ala
50 55 60

45

Ser Gln Asp Leu Ala Asn Lys Val Leu Glu Leu Asp Asp Leu Thr Asn
65 70 75 80

50

Asn Lys Ile Val Ala Ala Gln Ala Lys Val Thr Gln Ala Asn Glu Asp
85 90 95

55

Ala Ala Thr Ala Gln Asp Glu Ala Asp Ala Ala Ser Gly Arg Leu Ser
100 105 110

60

Ala Ala Gln Lys Asp Lys Glu Thr Leu Glu Glu Gln Ile Lys Gln Thr
115 120 125

65

Gly Lys Asp Tyr Asp Asp Ala His Ala Ala Val Ala Gln Leu Ala Arg
130 135 140

ES 2 581 836 T3

Asp Glu Met His Gly Ser Asn Ala Ser Asp Val Met Ser Val Val Thr
 145 150 155 160
 5
 Gly Ala Thr Ser Thr Gln Asp Phe Val Asn Ser Met Gln Ser Arg Asp
 165 170 175
 10
 Ala Leu Ser Arg Asn Glu Ala Asn Ala Ala Ser Ser Ala Ala Thr Ser
 180 185 190
 15
 Leu Ser Thr Ser Lys Asn Arg Gly Glu Arg Leu Ala Ala Ile Glu Lys
 195 200 205
 20
 Gln Ile Ala Val Leu Lys Thr Gln Ala Asp Glu Lys Ala Ala Pro His
 210 215 220
 25
 Arg Pro Pro Pro Lys
 225
 30
 <210> 2
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> *Bifidobacterium longum*
 35
 <400> 2
 40
 Met Thr Asn Val Arg Val Ile Lys Pro Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala
 1 5 10 15
 45
 Ala Ala Ala Cys Val Gly Gly Leu Ala Phe Ser Ser Ala Gln Pro Ala
 20 25 30
 50
 Gln Ala Asp Thr Tyr Ser Asp Leu Ile Asn Ala Gln Asn Gln His Ala
 35 40 45
 55
 Ala Ser Val Gln Arg Glu Ala Glu Leu Lys Gln Gln Leu Ala Gly Ala
 50 55 60
 60
 Ser Gln Asp Leu Ala Asn Lys Val Leu Glu Leu Asp Asp Leu Thr Asn
 65 70 75 80
 65
 Asn Lys Ile Val Ala Ala Gln Ala Lys Val Thr Gln Ala Asn Glu Asp
 85 90 95
 Ala Ala Thr Ala Gln Asp Glu Ala Asp Ala Ala Ser Gly Arg Leu Ser
 100 105 110
 la Ala Gln Lys Asp Lys Glu Thr Leu Glu Glu Gln Ile Lys Gln Thr

ES 2 581 836 T3

	115						120						125			
5	Gly	Lys	Asp	Tyr	Asp	Asp	Ala	His	Ala	Ala	Val	Ala	Gln	Leu	Ala	Arg
	130						135					140				
10	Asp	Glu	Met	His	Gly	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Val	Met	Ser	Val	Val	Thr
	145					150					155					160
15	Gly	Ala	Thr	Ser	Thr	Gln	Asp	Phe	Val	Asn	Ser	Met	Gln	Ser	Arg	Asp
					165					170					175	
20	Ala	Leu	Ser	Arg	Asn	Glu	Ala	Asn	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Ala	Thr	Ser
				180				185						190		
25	Leu	Ser	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala	Ala	Ile	Glu	Lys
			195					200					205			
30	Gln	Ile	Ala	Val	Leu	Lys	Thr	Gln	Ala	Asp	Glu	Lys	Ala	Ala	Ser	Ala
	210						215					220				
35	Gln	Thr	Ala	Ala	Glu	Thr	Ala	Gln	Ser	Glu	Arg	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys
	225					230					235				240	
40	Leu	Arg	Gln	Glu	Gly	Glu	Ala	Arg	Arg	Asp	Glu	Leu	Ser	Ser	Met	Ile
				245						250					255	
45	Asp	Ser	Leu	Asp	Ser	Gln	Ser	Ala	Lys	Gln	Ala	Ala	Gln	Thr	Val	Leu
			260						265					270		
50	Ile	Ala	Ser	Gln	Val	Asp	Ser	Tyr	Asn	Arg	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Gln
			275					280					285			
55	Gln	Asp	Ala	Ala	Asn	Arg	Val	Asp	Thr	Gly	Asn	Gln	Gly	Gly	Thr	Pro
	290						295					300				
60	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Pro	Ala	Pro								
	305					310					315					320
65	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Ser	Val	Gly	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser
				325						330					335	
70	Asn	Gly	Asp	Tyr	Gly	Asn	Ala	Tyr	Ala	Thr	Gly	Gln	Cys	Thr	Tyr	Trp
			340					345						350		
75	3/4Ala	Tyr	Glu	Arg	Arg	Arg	Gln	Met	Gly	Ile	Gly	Thr	Pro	Ser	Tyr	Leu

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo macromolecular bacteriano producido por bacterias que pertenecen a la cepa *Bifidobacterium longum*, depositada según el tratado de Budapest con el número CNCM I-3994, el 23 de mayo de 2008 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), constituido por cadenas que asocian una lipoproteína y un oligosacárido **caracterizado por que**:
- 10 - la lipoproteína presenta una masa molecular de 30 kDa a 60 kDa;
 - el oligosacárido presenta una masa molecular inferior a 15 kDa;
 - la parte lipoproteica que está constituida por el conjunto de las lipoproteínas de cada una de las cadenas representa del 75 al 99 % en peso de la masa total del complejo y la parte oligosacáridica que está constituida por el conjunto de los oligosacáridos asociado a cada una de las cadenas representa del 1 al 25 % de la masa total del complejo.
- 15 2. Complejo macromolecular de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** presenta una masa molecular superior a 150 kDa, preferentemente superior a 400 kDa y de manera particularmente preferida superior o igual a 600 kDa.
- 20 3. Complejo macromolecular de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** la lipoproteína comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID 1.
4. Complejo macromolecular de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** la secuencia de aminoácidos de la lipoproteína es SEQ ID 2.
- 25 5. Complejo macromolecular de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** los sacáridos que constituyen la parte sacarídica del complejo macromolecular se seleccionan entre galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (Gal Nac), glucosa (Glc), N-acetilglucosamina (Glc Nac), ramnosa (Rham), y manosa (Man) y sus mezclas.
- 30 6. Complejo macromolecular de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado por que** la composición másica media de galactosa está comprendida entre 1 y 50 µg/mg de complejo macromolecular, de manosa está comprendida entre 0,5 y 10 µg/mg de complejo macromolecular; la de glucosa está comprendida entre 3 y 80 µg/mg de complejo macromolecular; la de N-acetilgalactosamina está comprendida entre 2 y 30 µg/mg de complejo macromolecular; la de N-acetilglucosamina está comprendida entre 1 y 10 µg/mg de complejo macromolecular; la de ramnosa está comprendida entre 0,05 y 10 µg/mg de complejo macromolecular.
- 35 7. Complejo macromolecular de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado por que** los lípidos que constituyen la parte lipídica del complejo macromolecular se seleccionan entre el grupo constituido por ácidos grasos saturados largos de C14, C16, C18 y sus mezclas.
- 40 8. Composición farmacéutica, **caracterizada por que** comprende al menos el complejo macromolecular de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, como principio activo, y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 45 9. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizada por que** la concentración másica del complejo macromolecular de acuerdo con la reivindicación 1 representa de 0,1 a 50 µg/g de la composición farmacéutica.
- 50 10. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, para una utilización en el tratamiento o la prevención de reumatismos inflamatorios y de artrosis.
11. Composición alimentaria **caracterizada por que** contiene al menos dicho complejo macromolecular de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, y al menos un ingrediente alimentario.
- 55 12. Composición alimentaria de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizada por que** la concentración másica del complejo macromolecular de acuerdo con la reivindicación 1 representa de 10 µg/g a 2 µg/g de la composición alimentaria.
- 60 13. Composición alimentaria de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 o 12, **caracterizada por que** se presenta en forma de productos alimentarios.
14. Composición nutracéutica **caracterizada por que** contiene al menos dicho complejo macromolecular de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, y al menos un soporte nutracéuticamente aceptable.
- 65 15. Composición nutracéutica de acuerdo con la reivindicación 14, **caracterizada por que** la concentración másica

del complejo macromolecular de acuerdo con la reivindicación 1 representa de 10 µg/g a 5 µg/g de la composición nutracéutica.

5 16. Composición nutracéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 o 15, **caracterizada por que se presenta en forma de suplementos nutricionales.**

17. Composición nutracéutica de acuerdo con una de las reivindicaciones 14 a 16, para una utilización en la prevención de reumatismos inflamatorios y de artrosis.

10 18. Cepa de bacterias *Bifidobacterium longum*, depositada según el tratado de Budapest con el número CNCM I-3994, el 23 de mayo de 2008 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM).

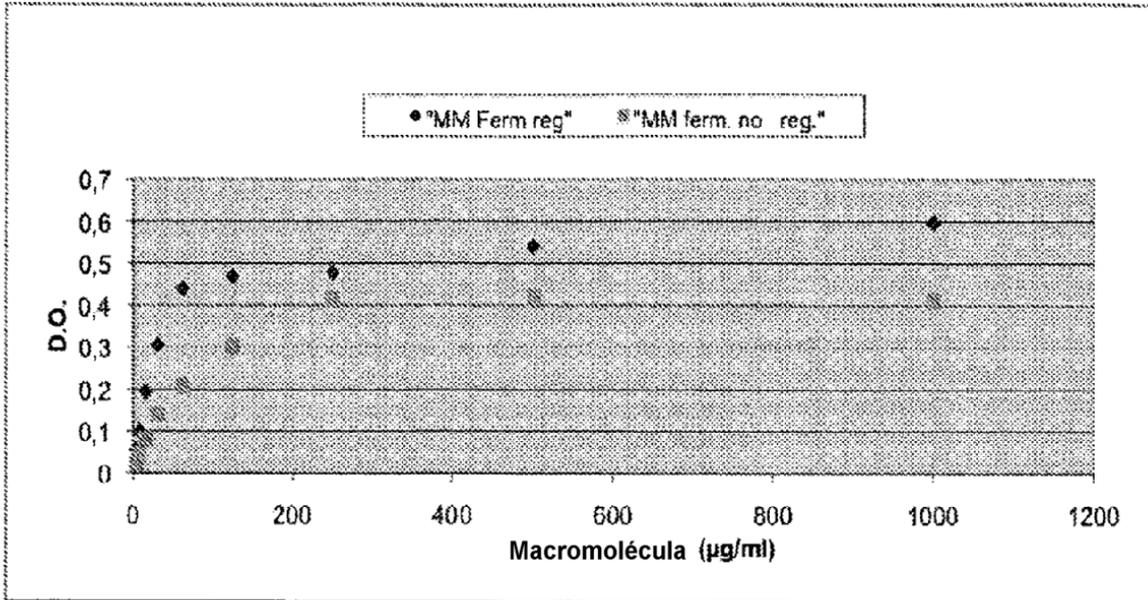


Figura 1

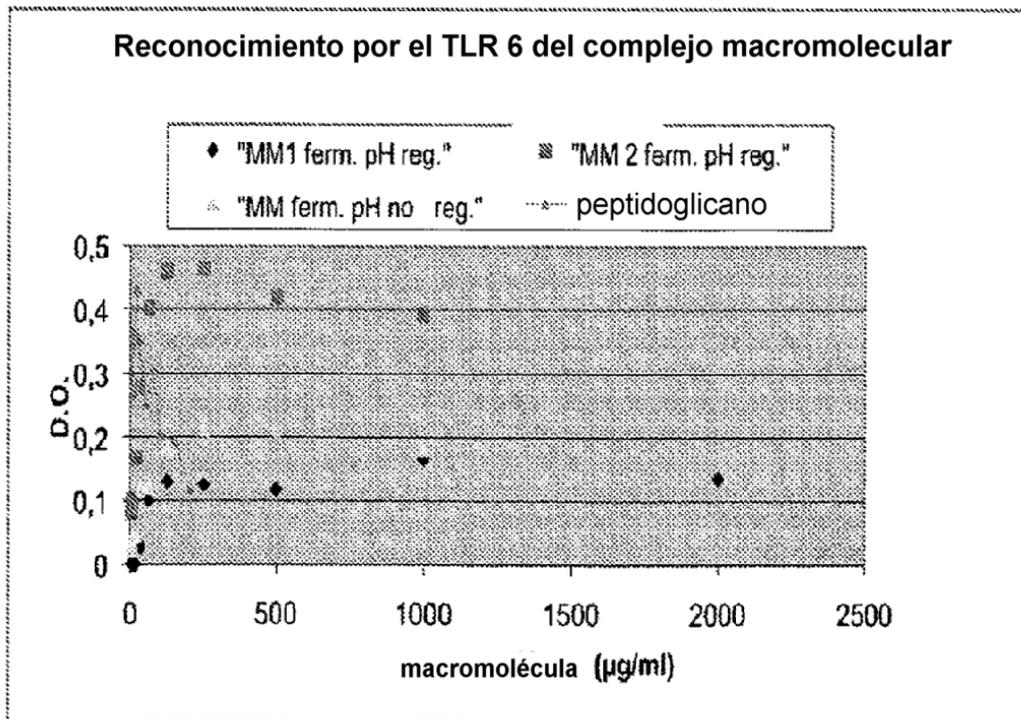


Figura 2

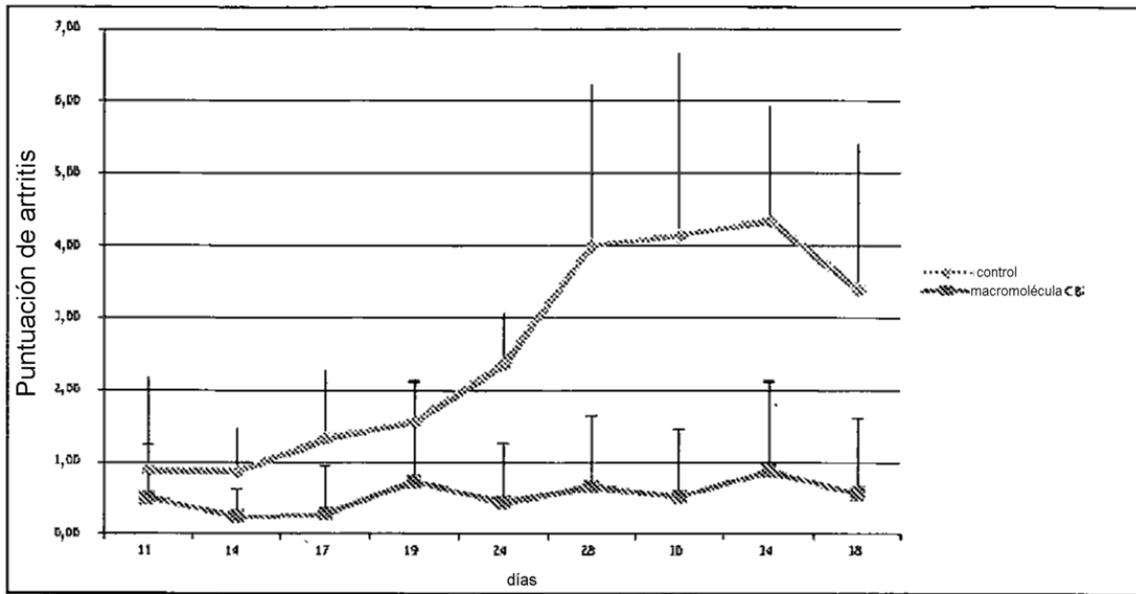


Figura 3

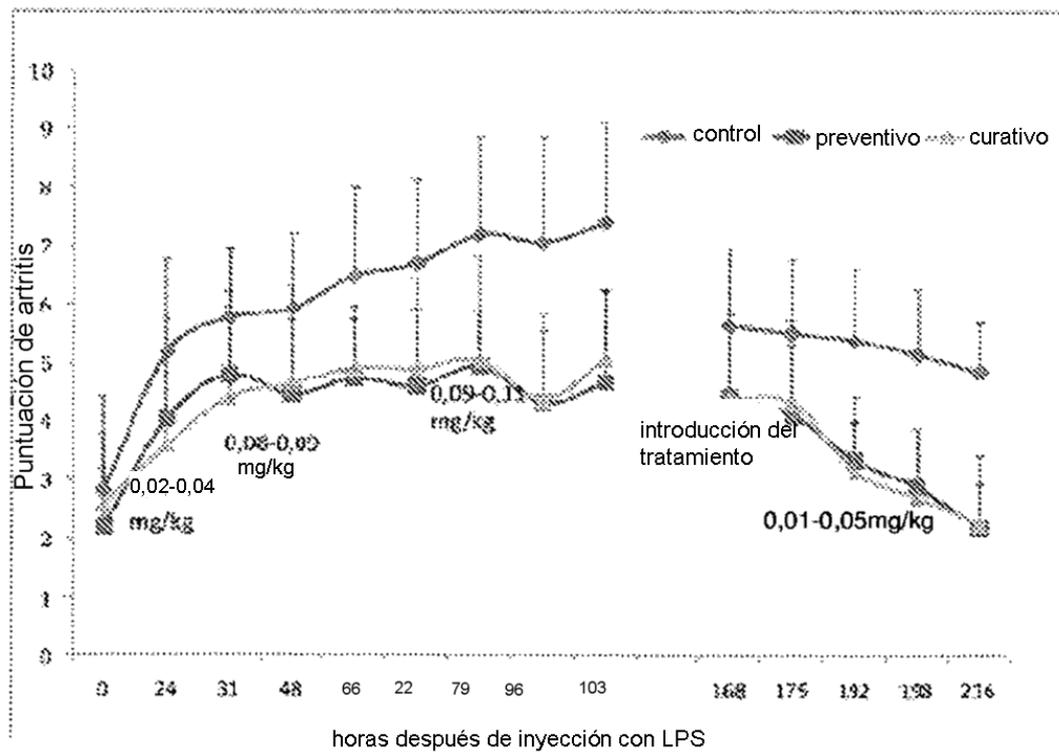


Figura 4

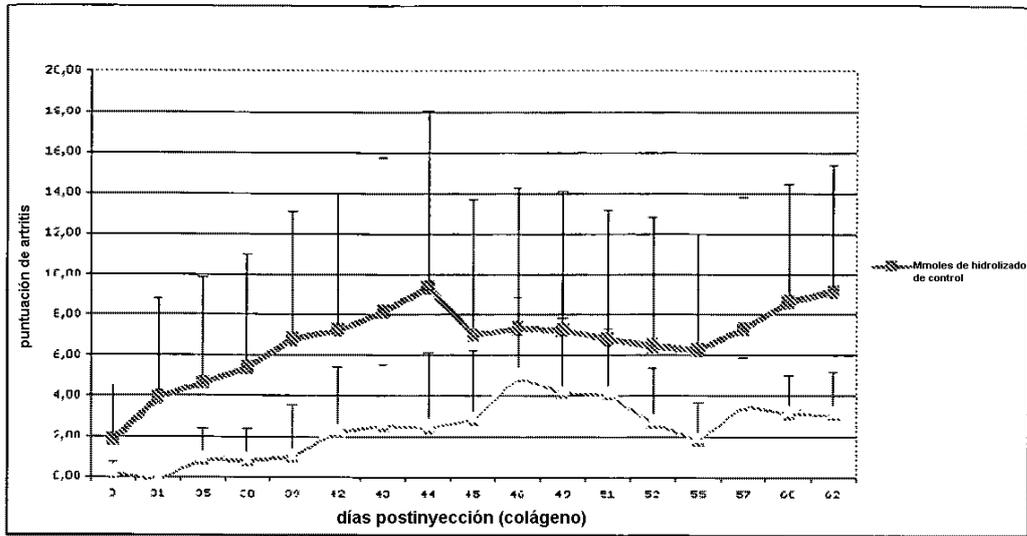


Figura 5

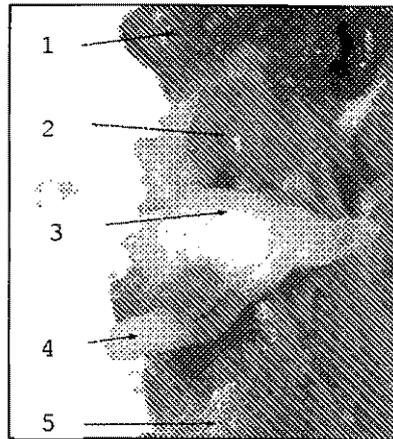


Figura 6a

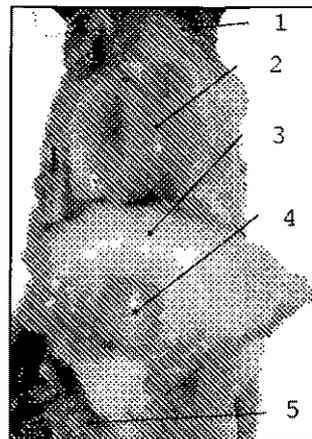


Figura 6b

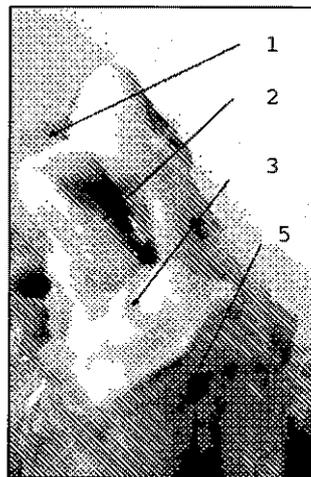


Figura 7a

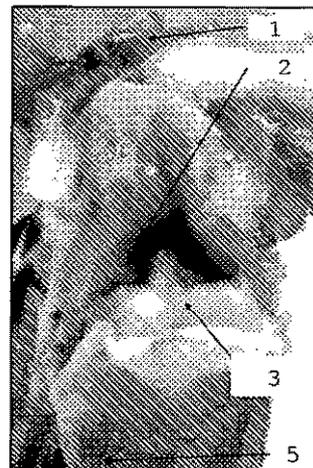


Figura 7b

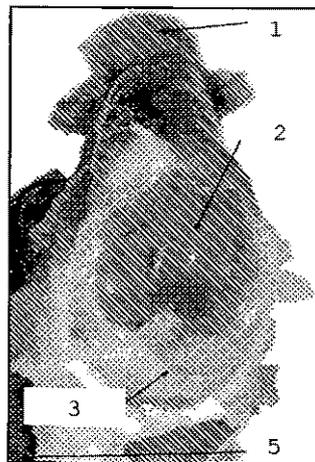


Figura 7c

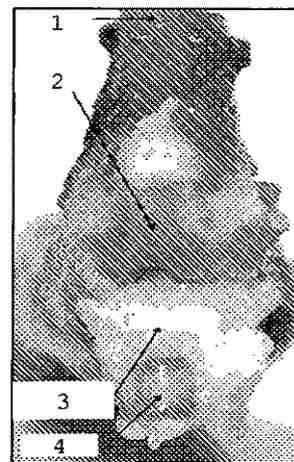


Figura 7d

Genes	Nomenclatura	FC	función
Carboxypeptidase B1 (tissue) (Cpb1), mRNA [NM_029706]	Cpb1	109.50	degradación de las proteínas
Carboxypeptidase A1 (Cpa1), mRNA [NM_025350]	Cpa1	87.14	degradación de las proteínas
Carboxypeptidase A2, pancreatic (Cpa2), mRNA [NM_001024698]	Cpa2	6.92	degradación de las proteínas
Mus musculus RIKEN cDNA 2210010C04 gene, mRNA [NM_023333]	2210010C04Rik	100.41	degradación de las proteínas (actividad similar a tripsinógeno)
protease, serine, 3 (Prss3), mRNA [NM_011645]	Prss3	16.55	degradación de las proteínas (respuesta inflamatoria)
protease, serine, 3 (Prss3), mRNA [NM_011645]	Prss3	6.58	degradación de las proteínas (respuesta inflamatoria)
peptidase, serine	1810049H19Rik	8.73	hidrólisis de péptidos
Crymotrypsin C (caldeirin) (Ctc), mRNA [NM_001033875]	Ctc	15.54	degradación de las proteínas
protease, serine, 2 (Prss2), mRNA [NM_009430]	Prss2	8.73	degradación de las proteínas
carboxyl ester lipase (Cel), mRNA [NM_009895]	Cel	10.09	degradación de los lípidos
pancreatic lipase related protein 1 (Pliprp1) mRNA [NM_018874]	Pliprp1	108.58	degradación de los lípidos
pancreatic lipase (Plip), mRNA [NM_026925]	Plip	95.10	degradación de los lípidos
PANCREATIC TRIGLYCERIDE LIPASE (FRAGMENT) homolog [Rattus norvegicus]	Plip	19.12	degradación de los lípidos
amylase 1, salivary (Amy1), mRNA [NM_007446]	Amy1	88.72	hidrólisis de los azúcares
amylase 1, salivary (Amy1), mRNA [NM_007446]	Amy1	29.38	hidrólisis de los azúcares
elastase 2A (Ela2a), mRNA [NM_007919]	RP23-395H4.4	24.725	enfermedades inflamatorias (enfisema, sarcoidosis)
Riken done:C230027O20 product:mitogen activated protein kinase 10, [AK082242]	Mapk10	22.987818	respuesta inmunitaria: presentación de Ag
deleted in malignant brain tumors 1 (Dmbt1), mRNA [NM_007769]	Dmbt1	3,7283275	respuesta inmunitaria: presentación de Ag, receptor bacterias G+/-
PREDICTED: Mus musculus similar to keratin associated protein 9-1 (LOC432600), mRNA [XM_484079]	OTTMUSG00000002191	22.03008	¿respuesta inmunitaria? queratina proteína quinasa
ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic) (Rnase1), mRNA [NM_011271]	Rnase1	14.073265	apoptosis, maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos,
myeloblastosis oncogene-like 1 (Mybl1), mRNA [NM_008651]	Mybl1	9,542029	división celular (CDC25B, MYBL1), hiperplasia del bazo, expansión de los linfocitos B
clone:A830089B11, product:unclassified, full insert sequence [AK139458]	AK139458	15,529197	linfocitos B
FK506 binding protein 5 (Fkbp5), mRNA [NM_010220]	Fkbp5	-5,7101316	similar a Ig
* comparación de las expresiones de genes de las células dendríticas de ratones asociados a una flora de paciente artrítico frente a ratones asociados a la flora de voluntario sano		5,996187	receptores de glucocorticoides, unión a dexametasona
** comparación de las expresiones de genes de células dendríticas de bazo de ratones asociados a una flora de paciente artrítico, tratados durante 15 días con 0,2 mg/ml de moléculas frente a ratones no tratados			receptores de glucocorticoides, unión a dexametasona

Tabla 6: genes cuya expresión es restaurada a los valores de expresión en ratones asociados a una flora humana
 * comparación de las expresiones de genes de las células dendríticas de ratones asociados a una flora de paciente artrítico frente a ratones asociados a la flora de voluntario sano
 ** comparación de las expresiones de genes de células dendríticas de bazo de ratones asociados a una flora de paciente artrítico, tratados durante 15 días con 0,2 mg/ml de moléculas frente a ratones no tratados

Figura 8

Genes	Nomenclatura	FAT frente a FA** FC	función Metabolismo
Colipase, pancreatic (C1ps), mRNA [NM_Q25469] Amylase 2, pancreatic (Amy2), mRNA [NM_Q09669] Extra cellular link domain-containing 1 (Xlkd1), mRNA [NM_053247]	C1ps Amy2 Xlkd1	-49,773 -696,162	metabolismo de lípidos metabolismo de azúcares receptor hialuronano endotelial vascular linfático 1 (LYVE1): internalización del ácido hialurónico, catabolismo del glucosaminoglucano
Galactose-3-O-sulfotransferase 2 (Gal3st2), mRNA [NM_199366]	Gal3st2	-3,015 -3,021	sulfatación de Gal en posición C3 (mucina)
10 days neonate cerebellum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B930094O12 Cell division cycle 25 homolog B (S. pombe) (Cdc25b), mRNA [NM_023117]	AK081163 Cdc25b	-11,095 -4,500	Respuesta inmunitaria/inflamación prostaglandina reductasa 2: modo de acción de indometacina mediante unión a PGTR2 inicio de la mitosis
Endothelin receptor type B (Ednrb), mRNA [NM_007904]	Ednrb	-5,601	entrada en división celular (en asociación con MYBL1) excreción de proteínas y de sodio, cantidad de Ca2+ (en asociación con PROK2, PRSS3 (incluye EG:5646)) difusión endotelial trastorno del sistema endocrino (en asociación con AMY2A, CEL, CTRC, PNLIP, PROK2)

Tabla 7: genes cuya expresión es modificada únicamente con tratamiento

Figura 9