

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 518**

51 Int. Cl.:

C12R 1/225 (2006.01)

C12P 19/42 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A23L 33/15 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2012 PCT/IB2012/002612**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.06.2013 WO13084052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2012 E 12813446 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2788511**

54 Título: **Cepas de Lactobacillus reuteri productoras de vitamina B12**

30 Prioridad:

09.12.2011 IT MI20112238

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

26.01.2018

73 Titular/es:

PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)

Via E. Mattei 3

28100 Novara, IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI;

STROZZI, GIAN PAOLO y

MOGNA, LUCA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 651 518 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepas de *Lactobacillus reuteri* productoras de vitamina B12

5 La presente invención se refiere a una composición que comprende al menos dos cepas bacterianas probióticas seleccionadas que pertenecen a la especie *Lactobacillus reuteri* como productoras de vitamina B12. Finalmente, la presente invención se refiere a una composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica que comprende una cepa bacteriana seleccionada que pertenece a la especie *Lactobacillus reuteri* como productora de vitamina B12.

10 Se sabe bien que la cobalamina (vitamina B12) desempeña un papel importante en la producción de glóbulos rojos y es esencial para un funcionamiento apropiado del sistema nervioso.

15 Además, se sabe bien que cuatro formas químicas pueden hacer referencia a la cobalamina (vitamina B12) dependiendo del tipo de grupo químico (R) que se une al ion de cobalto en su fórmula estructural. El grupo (R) puede ser:

- hidrocianico, -CN (cianocobalamina)
- 20 - hidroxilo, -OH (hidroxocobalamina)
- metilo, -CH₃ (metilcobalamina)
- 25 - 5-desoxiadenosilo (5'-desoxiadenosilcobalamina).

Las formas metabólicamente activas son metil- y 5'-desoxiadenosilcobalamina.

La hidroxocobalamina es la forma natural en la que la vitamina B12 se toma habitualmente a través de la dieta.

30 Sin embargo, para uso alimentario y farmacéutico de dicha vitamina, debe confiarse en la forma más estable, representada por la cianocobalamina, que se sintetiza químicamente. La cianocobalamina no existe en la naturaleza excepto en casos raros.

35 Por tanto, la cianocobalamina producida de manera sintética es una sustancia artificial que se forma durante los procedimientos de extracción industriales, ya que se hace uso de papaya, una proteasa que se activa mediante la adición de CN-. En la práctica, durante procedimientos de síntesis industriales, se efectúa una transformación de hidroxocobalamina en cianocobalamina, debido a que esta última forma de vitamina B12 es más estable cuando se expone al aire y puede cristalizar más fácilmente, favoreciendo por tanto los rendimientos de producción. Por este motivo, la mayoría de los productos alimenticios, complementos alimenticios y productos farmacéuticos contienen cianocobalamina.

40 Por tanto, la posibilidad de producir vitamina B12 de manera natural en forma de hidroxocobalamina como alternativa a la vitamina B12 producida de manera sintética en forma de cianocobalamina se observa con mucho interés y responde a una necesidad notada acusadamente de los operadores de la industria.

45 Hugenschmidt, S *et al* (International Dairy Journal 2010, vol. 20, n.º 12, páginas 852-857) dan a conocer la producción de vitamina B12 intracelular de tres cepas de *L. reuteri* tras 24 horas de incubación en medio de permeato de lactosuero complementado, con rendimientos en un intervalo de desde 0,058 hasta 0,115 µg.ml⁻¹.

50 Molina, V. C. *et al* (Journal of Applied Microbiology 2009, vol. 106, n.º 2, páginas 467-473) se refiere a una cepa de *L. reuteri* que puede producir pseudovitamina B12.

Por tanto, sigue habiendo la necesidad de tener un método para producir vitamina B12 de manera natural.

55 En particular, sigue habiendo la necesidad de tener un método para producir hidroxocobalamina de manera natural.

Finalmente, se sabe bien que la carne contiene vitamina B12.

60 Sin embargo, para personas que no consumen productos cárnicos, tales como vegetarianos, puede ser difícil conseguir una cantidad diaria de vitamina B12 suficiente para cumplir los requisitos diarios.

Por tanto, la disponibilidad de productos alimenticios no cárnicos ricos en vitamina B12 permitiría a los vegetarianos tomar más fácilmente una dosis diaria de vitamina B12 suficiente para cumplir sus requisitos diarios.

65 En una realización, la materia de la presente invención es una composición que comprende al menos dos cepas bacterianas probióticas seleccionadas que pertenecen a la especie *Lactobacillus reuteri*, tal como se expone en la

reivindicación adjunta.

La materia de la presente invención se refiere además a una composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica para su uso tal como se expone en la reivindicación adjunta.

5 La materia de la presente invención se refiere además a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen una patología debida a un déficit o una deficiencia de vitamina B12, tal como se expone en la reivindicación adjunta.

10 La materia de la presente invención se refiere además a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen anemia perniciosa, tal como se expone en la reivindicación adjunta.

15 La materia de la presente invención se refiere además a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de sujetos que toman vitamina C, tal como se expone en la reivindicación adjunta.

Realizaciones adicionales preferidas de la presente invención se expondrán e ilustrarán a continuación sin pretender limitar el alcance de la presente invención de ningún modo.

20 La tabla 1 muestra los valores de concentración (valor medio con respecto a varias pruebas) de vitamina B12 (expresada en µg/litro) medida a DO₆₀₀.

25 Tras una intensa actividad de investigación, el solicitante seleccionó, entre las cepas bacterianas probióticas seleccionadas del grupo que comprende las cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Lactobacillus reuteri*, solo las que eran capaces de producir vitamina B12.

La cepa, como productora de vitamina B12, se selecciona del grupo que consiste en:

30 - *Lactobacillus reuteri* DSM 23877 - (LRE01),

- *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 - (LRE02),

- *Lactobacillus reuteri* DSM 23879 - (LRE03),

35 - *Lactobacillus reuteri* DSM 23880 - (LRE04).

Ventajosamente, la cepa es *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02). La cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02) está en asociación con al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en:

40 - *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730,

- *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, y

45 - *Lactobacillus reuteri* DSM 16143.

En una realización, la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02) está en asociación con al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en:

50 - *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730,

- *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

La composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica para su uso según la presente invención comprende al menos una cepa bacteriana, que es la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02).

55 Preferiblemente, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica comprende dos cepas o tres cepas, seleccionadas de entre las mencionadas anteriormente.

60 Ventajosamente, la composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica comprende además las cepas *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 o, alternativamente, comprende o consiste en las tres cepas *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 16143.

65 La composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica puede comprender o, alternativamente, consistir en:

i) la cepa *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o

ii) la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o

5 iii) la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 16143 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o

iv) las tres cepas *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o

10 v) las tres cepas *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 16143, o

vi) las tres cepas *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 16143.

15 Las especies bacterianas mencionadas anteriormente están presentes en una cantidad que comprende desde el 0,1 hasta el 75 % en peso, preferiblemente desde el 0,5 hasta el 15 % en peso; incluso más preferiblemente desde el 1 hasta el 10 % en peso, en relación con el peso total de la composición o complemento. Sin embargo, dicho porcentaje en relación con el peso total de la composición depende del tipo de producto de la composición o complemento. Por ejemplo, en una cápsula la cantidad de dichas especies bacterianas es preferiblemente mayor del 20 40 %.

En una realización preferida, la composición contiene bacterias en una concentración que comprende desde 1×10^6 hasta 1×10^{11} UFC/g de mezcla, preferiblemente desde 1×10^8 hasta 1×10^{10} UFC/g de mezcla.

25 En una realización preferida, la composición contiene bacterias en una concentración que comprende desde 1×10^6 hasta 1×10^{11} UFC/dosis, preferiblemente desde 1×10^8 hasta 1×10^{10} UFC/dosis.

La dosis puede comprender desde 0,2 hasta 10 g, por ejemplo, es de 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g.

30 Las bacterias probióticas usadas en la presente invención pueden estar en forma sólida, en particular en forma de polvo, polvo deshidratado, pulverización o liofilizada.

35 En una realización preferida de la invención, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica puede comprender además fibras prebióticas e hidratos de carbono que tienen una acción bifidogénica, tales como, por ejemplo, inulina, fructooligosacáridos (FOS), galacto- y trans-galactooligosacáridos (GOS y TOS), gluco-oligosacáridos (GOS α), xilo-oligosacáridos (XOS), oligosacáridos de quitosano (COS), oligosacáridos de soja (SOS), isomalto-oligosacáridos (IMOS), almidón resistente, pectina, psilio, arabinogalactanos, glucomananos, galactomananos, xilanos, lactosacarosa, lactulosa, lactitol y diversos otros tipos de gomas, arábica, de algarrobo, fibra de avena o bambú, fibras de cítricos y, en general, fibras que contienen una porción soluble y una insoluble, en una razón variable entre sí.

Ventajosamente, dicha fibra se selecciona del grupo que comprende FOS, inulina y fibras de cítricos, preferiblemente en una razón en peso de desde 1:3 hasta 3:1.

45 La cantidad de las fibras prebióticas y/o hidratos de carbono que tienen una acción bifidogénica, si están presentes, comprende desde el 0,5 hasta el 75 % en peso, preferiblemente desde el 1 % hasta el 40 % en peso e incluso más preferiblemente desde el 2 hasta el 20 % en peso en relación con el peso total de la composición. En este caso se tiene un complemento con actividad simbiótica.

50 En una realización preferida, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica puede comprender además uno o más aditivos o excipientes fisiológicamente aceptables.

55 En una realización preferida de la invención, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica puede comprender además otros componentes y/o principios activos, tales como vitaminas, minerales, péptidos bioactivos, sustancias que tienen actividad antioxidante, hipocolesterolemiantes, hipoglucemiantes, antiinflamatoria o edulcorante en una cantidad en peso que comprende generalmente desde el 0,001 % hasta el 10 % en peso, preferiblemente desde el 0,5 % hasta el 5 % en peso, dependiendo en cualquier caso del tipo de componente activo y la dosis diaria recomendada del mismo en relación con el peso total de la composición.

60 La composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica de la presente invención se prepara usando técnicas ya conocidas disponibles para un experto habitual en la técnica que es capaz de usar aparatos y maquinaria conocidos y el método más adecuado.

65 En una realización preferida, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica puede contener elementos o sustancias con actividad antioxidante tal como se mencionó anteriormente, en una cantidad que

comprende desde el 0,0001 % hasta el 30 % en peso en relación con el peso de la composición final, dependiendo de la concentración de sustancias con actividad antioxidante y/o de la cantidad diaria recomendada (CDR), cuando se define.

5 Puede estar presente selenio en forma de selenato de sodio, L-selenometionina, selenito de sodio, selenito ácido de sodio y ácido selenioso, así como en forma de microorganismos enriquecidos en selenio, por ejemplo, levaduras, en una cantidad en peso que comprende desde el 0,0005 % hasta el 0,005 % en relación con el peso de la composición final, en cualquier caso, suficiente para contribuir a una cantidad de selenio que comprende preferiblemente desde 10 µg hasta 150 µg.

10 Ventajosamente, las cepas depositadas por la empresa BIOMAN S.r.l., Via Alfieri 18, 10100 Turín, Italia, tienen aplicación; concretamente:

15 - *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositada en la DSMZ el 05/04/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16341, y/o

- *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16144, y/o

20 - *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16143, y/o

en asociación con las cepas productoras de vitamina B12 de la presente invención.

25 Dichas cepas, de hecho, son capaces de acumular dentro de las células grandes cantidades de selenio, especialmente en forma orgánica, si se hacen crecer en presencia de una fuente adecuada de selenio en el medio de cultivo.

30 En otra realización preferida, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica puede contener glutatión. En particular, glutatión en forma antioxidante se refiere a glutatión reducido (o GSH). En una realización preferida, la composición comprende glutatión en forma reducida y selenio en una cantidad en peso que comprende desde el 0,5 % hasta el 25 %, en relación con el peso de la composición final, en asociación con las cepas productoras de vitamina B12 de la presente invención.

35 Ventajosamente, puesto que el glutatión puede inactivarse parcialmente si se toma por vía oral, la composición puede comprender el aminoácido de azufre cisteína y/o N-acetilcisteína y/o mezclas de las mismas.

40 En una realización de la presente invención, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica puede contener las bacterias probióticas mencionadas anteriormente de la presente invención en forma microencapsulada, es decir, recubiertas con una composición que contiene al menos un lípido (composición lipídica), preferiblemente de origen vegetal.

45 Alternativamente, la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica puede comprender las bacterias probióticas mencionadas anteriormente de la presente invención como bacterias microencapsuladas y bacterias no microencapsuladas.

50 Dicha composición lipídica comprende al menos un lípido, y dicho al menos un lípido es de origen vegetal. Ventajosamente, dicho lípido de origen vegetal se selecciona del grupo que comprende grasas saturadas. Ventajosamente, se usan grasas saturadas que tienen un punto de fusión por debajo de 75 °C, preferiblemente comprendido desde 45 hasta 65 °C.

55 En una realización preferida, dichas grasas saturadas se seleccionan del grupo que comprende mono- y diglicéridos de ácidos grasos saturados, poligliceroles esterificados con ácidos grasos saturados y ácidos grasos saturados libres. Preferiblemente, dichas grasas saturadas se seleccionan de entre diestearato de poliglicerilo, palmitoestearato de glicerilo o grasas vegetales hidrogenadas de origen no láurico.

En una primera realización, las bacterias probióticas mencionadas anteriormente de la presente invención tienen un único recubrimiento.

60 En la práctica, se produce un único recubrimiento con el mismo lípido. Ventajosamente, el único recubrimiento se basa en diestearato de poliglicerilo (nombre comercial Plurol Stearique WL 1009).

Las bacterias probióticas con un único recubrimiento mencionadas anteriormente de la presente invención se colocan en la composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica de la presente invención.

65 En una segunda realización, las bacterias probióticas mencionadas anteriormente de la presente invención tienen un

recubrimiento doble. En la práctica, se produce un recubrimiento doble, en sucesión, con dos lípidos que difieren entre sí.

5 Ventajosamente, los dos lípidos se seleccionan de entre una grasa de palma hidrogenada ($T_m=60\text{ }^\circ\text{C}$) y un dipalmitoestearato de glicerol ($T_m=57\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$), que se pulverizan sobre el liofilizado en sucesión, es decir, se aplica una cobertura doble sobre el liofilizado: la primera con la grasa de palma hidrogenada (por ejemplo, con Revel C) y la segunda con el dipalmitoestearato de glicerol (por ejemplo, Precirol Ato 5) en una razón de 3:1 entre sí, ventajosamente 2:1, por ejemplo, 2/3 en peso del primero y 1/3 en peso del último.

10 En una realización preferida, la composición farmacéutica está indicada para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen una patología o un estado de malestar general debido a deficiencias o déficits de vitamina B12.

15 En otra realización preferida, la composición farmacéutica está indicada para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen anemia perniciosa.

La anemia perniciosa es una enfermedad provocada por una deficiencia o un déficit de vitamina B12, tal como, por ejemplo, cobalamina. Esta enfermedad se caracteriza por anemia megaloblástica y trastornos del sistema nervioso.

20 En estos casos también es importante evaluar la concentración de vitamina B12 y ácido fólico, puesto que una deficiencia de este último provoca de manera similar un estado de anemia megaloblástica, sin afectar, sin embargo, al sistema nervioso.

25 Por tanto, en el caso de anemia perniciosa es muy importante mejorar el estado anémico administrando una composición farmacéutica que comprende al menos una cepa productora de vitamina B12 de la presente invención seleccionada del grupo que comprende: *Lactobacillus reuteri* ATCC 53609, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus reuteri* DSM 16143, *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359, *Lactobacillus reuteri* DSM 23877 - (LRE01), *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), *Lactobacillus reuteri* DSM 23879 (LRE03) y *Lactobacillus reuteri* DSM 23880 - (LRE04), en asociación con al menos
30 una cepa bacteriana productora de ácido fólico seleccionada del grupo que comprende:

- una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium adolescentis*, preferiblemente *Bifidobacterium adolescentis* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16595;

35 - una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum*, preferiblemente *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18350;

40 - una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, preferiblemente *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18352;

45 - una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve*, preferiblemente *Bifidobacterium breve* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16596;

- una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, preferiblemente *Bifidobacterium pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16597, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16598 y *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18353.

55 Las cepas mencionadas anteriormente las depositó la empresa Anidral Srl (ahora Probiotal SpA, Via Mattei 3, Novara 28100 Italia) en la DSMZ en Alemania el 21/07/2004 y el 15/06/2006.

Las cepas *Lactobacillus reuteri* DSM 23877 - (LRE01), *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 - (LRE02), *Lactobacillus reuteri* DSM 23879 - (LRE03) y *Lactobacillus reuteri* DSM 23880 - (LRE04) las depositó la empresa Probiotal SpA (Via Mattei 3, Novara 28100 Italia) en la DSMZ en Alemania el 05/08/2010.

60 En otra realización preferida, la composición farmacéutica está indicada para su uso en el tratamiento de sujetos que toman vitamina C, puesto que la ingesta de grandes cantidades de vitamina C (mayores de 1 g) puede generar deficiencias de cobalamina a lo largo del tiempo. Esto se debe al hecho de que la vitamina C, en presencia de hierro, puede actuar como antioxidante y formar radicales libres que dañan la cobalamina y el factor intrínseco.

65 Por tanto, una composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica de la presente invención tiene aplicación válida para las personas que toman dosis de vitamina C diariamente.

Por tanto, el uso de cepas bacterianas probióticas que son productoras de vitamina B12 (en forma de hidroxocobalamina, que es la forma natural tomada en su mayor parte a través de la dieta) es una alternativa ventajosa al uso de alimentos o complementos o fármacos que contienen vitamina B12 en forma de cianocobalamina. Todas las composiciones o complementos mencionados anteriormente de la presente invención pueden formularse en forma sólida, liofilizada o secada, por ejemplo, en forma de polvo o granular.

Además, una forma farmacéutica de interés son comprimidos o cápsulas duras o blandas.

En lo que respecta a los comprimidos, pueden comprender una parte interna que comprende las cepas bacterianas y una parte de recubrimiento externa. El recubrimiento puede comprender polímeros solubles en agua y/o polímeros capaces de resistir las variaciones de pH en el estómago y que permiten el paso al tracto intestinal.

En una realización preferida, la cepa bacteriana probiótica se selecciona del grupo que comprende las cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Lactobacillus reuteri*, como productora de vitamina B12.

En otra realización preferida, la cepa productora de vitamina B12 se selecciona del grupo que comprende: *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 16143.

En otra realización preferida, una composición alimenticia o complemento o composición farmacéutica comprende al menos una cepa bacteriana productora de vitamina B12, y preferiblemente está presente además al menos una cepa bacteriana adicional capaz de acumular selenio dentro de las células bacterianas; preferiblemente dicha cepa bacteriana se selecciona del grupo que comprende: *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositada en la DSMZ el 05/04/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16341, *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16144, y *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16143.

En otra realización preferida, dicha composición comprende además glutatión en forma reducida.

En otra realización dicha composición comprende además una cepa bacteriana adicional capaz de producir ácido fólico; preferiblemente dicha cepa se selecciona del grupo que comprende: una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium adolescentis*, preferiblemente *Bifidobacterium adolescentis* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16595; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum*, preferiblemente *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18350; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, preferiblemente *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18352; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve*, preferiblemente *Bifidobacterium breve* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16596; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, preferiblemente *Bifidobacterium pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16597, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16598 y *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18353.

En otra realización preferida, dicha composición farmacéutica está indicada para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen una patología o un estado de malestar general debido a deficiencias o déficits de vitamina B12.

En otra realización preferida, dicha composición farmacéutica está indicada para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen anemia perniciosa.

En otra realización preferida, dicha composición farmacéutica está indicada para su uso en el tratamiento de sujetos que toman vitamina C.

En otra realización preferida, dicha composición o complemento puede comprender dichas cepas bacterianas productoras de vitamina B12 y/o dichas cepas bacterianas capaces de acumular selenio y/o dichas cepas bacterianas productoras de ácido fólico recubiertas con una composición que contiene al menos un lípido, preferiblemente de origen vegetal, seleccionándose dicho lípido del grupo que comprende grasas saturadas que tienen un punto de fusión por debajo de 75 °C, preferiblemente comprendido desde 45 hasta 65 °C.

Parte experimental - método microbiológico

El presente método microbiológico se usa para determinar la cantidad de vitamina B12 producida por las células bacterianas de las cepas de la presente invención.

El método se basa en el uso de la cepa *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis (L. leichmannii)* ATCC 7830-DSMZ 20355, que es auxótrofa para vitamina B12 y por tanto crece proporcionalmente a la cantidad de vitamina B12 presente en el medio de cultivo. Este crecimiento se determina mediante lectura espectrofotométrica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm. La línea de calibración calculada a partir del crecimiento de *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis (L. leichmannii)* en medios que contienen cantidades escalares conocidas de vitamina B12 se usa entonces para determinar la cobalamina producida por las cepas bacterianas de la presente invención que se sometieron a análisis.

Método microbiológico

1.1 Preparación de la cepa auxótrofa para calcular la línea de calibración y las concentraciones de vitamina B12 producidas.

1.1.1 Se inocula la cepa auxótrofa *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis (L. leichmannii)* ATCC 7830-DSMZ 20355 a un porcentaje del 1 % en 15 ml de caldo MRS (MRS Difco 55,00 g y 1000 ml de agua destilada) y se añade el 1 % de clorhidrato de cisteína al mismo (código de Merck 1.02735.0100 - 50,00 g y 1000 ml de agua destilada; disol. al 5 %).

1.1.2 Posteriormente se agita con vórtex en una mezcladora de vórtex.

1.1.3 Se enrosca el tapón de rosca teniendo cuidado de no apretarlo completamente con el fin de permitir el desarrollo de un entorno anóxico. Se incuba la cepa en un instrumento Gas-Pack dotado de un sistema anaerobio Anaerocult A durante 18-24 horas a 37 °C.

1.1.4 Posteriormente, se trasplanta el cultivo obtenido dos veces consecutivas usando el mismo medio y el mismo porcentaje de inóculo.

1.1.5 Al final del periodo de incubación, se centrifuga el cultivo de *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis (L. leichmannii)* ATCC 7830-DSMZ 20355 a 6000 rpm durante 15 minutos.

1.1.6 Al final de la centrifugación, se desecha el sobrenadante y se lava el sedimento tres veces consecutivas con 10 ml de solución salina de NaCl al 0,85 %.

1.1.7 Se resuspende el sedimento en 10 ml de solución salina de NaCl al 0,85 %.

1.1.8 Entonces se prepara una dilución 1:100 con solución salina de NaCl al 0,85 % para obtener el inóculo necesario para establecer tubos a concentraciones conocidas de vitamina B12, necesarias para calcular la línea de calibración y establecer tubos a partir de los que se determinará la cantidad de vitamina B12 producida.

1.2 Preparación de los tubos necesarios para calcular la línea de calibración.

1.2.1 Se disuelven 7,6 g de medio de ensayo de vitamina B12 (código de Difco 60179) en 100 ml de agua ultrapura.

1.2.2 Se calienta y se agita simultáneamente y se permite que hierva durante aproximadamente 2-3 minutos para disolver completamente todo el polvo.

1.2.3 Se distribuyen 5 ml de medio de ensayo de vitamina B12 en siete tubos de ensayo de vidrio previamente lavados con agua ultrapura y se colocan en un horno a 100 °C durante la noche.

1.2.4 Se añade la disolución madre de cianocobalamina (preparada tal como se describe a continuación) a los tubos de ensayo, que se enrasan hasta el volumen final de 10 ml con agua ultrapura, tal como se describe a continuación:

- ml de disolución madre por tubo:

0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5

- ml de agua ultrapura por tubo:

5, 4,5, 4, 3, 2, 1, 0

- Concentración de vitamina B12 por tubo (ng/ml):

0,0 0,025 0,05 0,1 0 0,15 0,20 0,25

ES 2 651 518 T3

La disolución madre de cianocobalamina se prepara tal como sigue:

- 5 i) Disolver 10 mg de patrón de cianocobalamina (código de Sigma C3607) en un matraz de 100 ml, llevarlo hasta el volumen requerido con una disolución de etanol al 25 % en agua ultrapura (concentración final 0,1 mg/ml).
- ii) Añadir 1 ml de la disolución obtenida en la etapa (i) a 99 ml de agua ultrapura (concentración final 1 µg/ml).
- iii) Añadir 1 ml de la disolución obtenida en la etapa (ii) a 99 ml de agua ultrapura (concentración final 10 ng/ml).
- 10 iv) Añadir 1 ml de la disolución obtenida en la etapa (iii) a 199 ml de agua ultrapura (concentración final 0,05 ng/ml).
- 1.2.5 Se esterilizan en autoclave los tubos a 121 °C durante 15 minutos.
- 1.2.6 Al final del tratamiento térmico, se añaden 100 µl de la suspensión de *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* (L. *leichmannii*) ATCC 7830-DSMZ 20355, obtenida tal como se describió anteriormente en 1.1.8, a cada tubo de ensayo.
- 15 1.2.7 Posteriormente se agitan con vórtex los tubos en una mezcladora de vórtex.
- 20 1.2.8 Se enrosca el tapón de rosca teniendo cuidado de no apretarlo completamente con el fin de permitir el desarrollo de un entorno anóxico. Se incuba la cepa en un instrumento Gas-Pack dotado de un sistema anaerobio Anaerocult A durante 18-24 horas a 37 °C.
- 25 1.2.9 Al final del periodo de incubación, se enfrían los tubos de ensayo a 4 °C durante 15-20 minutos para bloquear el crecimiento bacteriano.
- 1.3 Cálculo de la línea de calibración.
- 30 1.3.1 Se reajusta el espectrofotómetro a 660 nm frente a 1 ml de medio de ensayo de vitamina B12 (dilución con 0 ng/ml de cianocobalamina) obtenido tal como se describió anteriormente.
- 1.3.2 Se añade 1 ml del cultivo obtenido según la etapa 1.2.9 en cubetas de plástico de 1,5 ml según el orden ascendente de la concentración de cianocobalamina presente.
- 35 1.3.3 Se leen los valores de absorbancia a la longitud de onda de 660 nm.
- 1.3.4 Se usan los valores de absorbancia obtenidos para determinar la línea de calibración, cuya ecuación se usará para extrapolar datos relacionados con las cantidades desconocidas de vitamina B12 presentes en los cultivos obtenidos según la etapa 1.4.18.
- 40 1.4 Preparación de muestras para determinar la vitamina B12 producida.
- 1.4.1 Se disuelven 7,6 g de medio de ensayo de vitamina B12 en 100 ml de agua ultrapura.
- 45 1.4.2 Se calienta y se agita simultáneamente y se permite que hierva durante aproximadamente 2-3 minutos para disolver completamente todo el polvo.
- 1.4.3 Se distribuyen 5 ml de medio de ensayo de vitamina B12 en "n" tubos de ensayo de vidrio (n = número de muestras que van a activarse x número de subcultivos de activación) previamente lavados con agua ultrapura y se colocan en un horno a 100 °C.
- 50 1.4.4 Se distribuyen 5 ml de medio de ensayo de vitamina B12 en "n" tubos de ensayo de vidrio (n = número de muestras que van a analizarse x 5) previamente lavados con agua ultrapura y se colocan en un horno a 100 °C durante la noche.
- 55 1.4.5 Se distribuyen 25 ml de medio de ensayo de vitamina B12 en "n" vasos de precipitados Bibby de 100 ml (botellas de vidrio Pyrex, generalmente de 100 o 250 ml, adecuadas para la esterilización en autoclave de medios de cultivo) (n = número de muestras que van a analizarse) previamente lavados con agua ultrapura y se colocan en un horno a 100 °C.
- 60 1.4.6 Se enrasan los tubos de ensayo descritos en la etapa 1.4.3 hasta un volumen de 10 ml con la adición de agua ultrapura.
- 65 1.4.7 Se enrasan los vasos de precipitados Bibby según la etapa 1.4.5 hasta un volumen de 50 ml con la adición de agua ultrapura.

ES 2 651 518 T3

- 1.4.8 Se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- 1.4.9 Se inoculan las cepas bacterianas que van a analizarse en los tubos de ensayo que pertenecen al grupo descrito en la etapa 1.4.3, a un porcentaje del 1 %.
- 5 1.4.10 Posteriormente se agitan con vórtex los tubos en una mezcladora de vórtex.
- 1.4.11 Se enrosca firmemente el tapón de rosca y se incuban los tubos en un baño de temperatura controlada durante 18-24 horas a 37 °C.
- 10 1.4.12 Se trasplanta el cultivo obtenido tres veces consecutivas usando el mismo medio y el mismo porcentaje de inóculo.
- 1.4.13 Se inoculan las cepas bacterianas en los vasos de precipitados Bibby que pertenecen al grupo descrito en la etapa 1.4.5, a un porcentaje del 1 %.
- 15 1.4.14 Posteriormente se agitan con vórtex los vasos de precipitados en una mezcladora de vórtex.
- 1.4.15 Se enrosca firmemente el tapón de rosca y se incuban los cultivos en un baño de temperatura controlada durante 18-24 horas a 37 °C.
- 20 1.4.16 Al final del periodo de incubación, se centrifuga a 6000 rpm durante 15 minutos.
- 1.4.17 Al final de la centrifugación, se elimina el sobrenadante y se lava el sedimento tres veces consecutivas con 10 ml de tampón fosfato de sodio pH 7 0,1 M.
- 25 1.4.18 Se resuspende el sedimento en 1 ml de tampón de extracción fosfato de sodio pH 4,5 0,1 M [ácido cítrico], KCN al 0,005 %. El tampón de extracción se prepara tal como sigue:
- 30 a1) llevar 100 ml de disolución tampón fosfato de sodio pH 7 0,1 M a un pH de 4,5 añadiendo ácido cítrico.
- a2) Añadir KCN al 0,005 % a la disolución obtenida en la etapa a1).
- a3) Someter a agitación durante 10 minutos.
- 35 1.4.19 Se somete la disolución a agitación a 4 °C con 1 g de perlas de vidrio durante tres ciclos de 5 minutos.
- 1.4.20 Al final del periodo de agitación, se somete a ebullición el extracto a 100 °C durante 5 minutos para permitir la desnaturalización de las proteínas y la formación de cianocobalamina.
- 40 1.4.21 Al final del tratamiento térmico, se diluye el extracto con agua ultrapura según las proporciones mostradas a continuación:
- | | | | | | |
|-----------------------------|-----|-----|------|-------|--------|
| - dilución: | 1:2 | 1:5 | 1:10 | 1:100 | 1:1000 |
| - µl extraídos: | 500 | 200 | 100 | 10 | 1 |
| - µl de ddH ₂ O: | 500 | 800 | 900 | 990 | 999 |
- 45
- 50 1.4.22 Se añade cada dilución a los tubos según la etapa 1.4.4.
- 1.4.23 Se enrasa cada tubo hasta un volumen de 10 ml con agua ultrapura.
- 1.4.24 Se añaden 100 µl de la suspensión de *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis (L. leichmannii)* ATCC 7830-DSMZ 20355 según la etapa 1.4.8.
- 55 1.4.25 Posteriormente se agitan con vórtex los tubos en una mezcladora de vórtex.
- 1.4.26 Se enrosca el tapón de rosca teniendo cuidado de no apretarlo completamente con el fin de permitir el desarrollo de un entorno anóxico. Se incuban la cepa en un instrumento Gas-Pack dotado de un sistema anaerobio Anaerocult A durante 18-24 horas a 37 °C.
- 60 1.4.27 Al final del periodo de incubación, se enfrían los tubos de ensayo a 4 °C durante 15-20 minutos para bloquear el crecimiento bacteriano.
- 65 1.5 Determinación de la vitamina B12 producida.

1.5.1 Se reajusta el espectrofotómetro a 660 nm frente a 1 ml de medio de ensayo de vitamina B12 (dilución con 0 ng/ml de cianocobalamina) obtenido tal como se describió anteriormente.

5 1.5.2 Se añade 1 ml del cultivo obtenido tal como se describió en la etapa 1.2.9 a cubetas de plástico de 1,5 ml según el orden ascendente de las diluciones del extracto tal como se describió en la etapa 1.4.21.

1.5.3 Se leen los valores de absorbancia a la longitud de onda de 660 nm.

10 1.5.4 Se usan los valores de absorbancia obtenidos en la ecuación de la línea calculada anteriormente en la etapa 1.3.4 para calcular la concentración de vitamina B12 producida por las cepas consideradas. Los resultados se expresan en ng/l.

15 Parte experimental - método analítico (HPLC)

Se usa el presente método analítico para determinar la cantidad de vitamina B12 producida por las células bacterianas de las cepas de la presente invención.

20 La determinación analítica de la vitamina B12 producida por los cultivos bacterianos de las cepas de la presente invención, que son el sujeto del presente análisis, se realiza con el método de HPLC de fase inversa (columna C18) usando un detector de UV/VIS.

Método analítico (HPLC)

25 2.1 Preparación de disoluciones patrón para calcular la línea de calibración.

2.1.1 Se pesan 10 mg de patrón de cianocobalamina (código de Sigma C3607) y se hacen las siguientes diluciones en serie:

30 2.1.1.1 Disolución de 1 mg/ml: pesar 10 mg de patrón de cianocobalamina (código de Sigma C3607) en un matraz de 10 ml y enrasar hasta el volumen requerido con agua Milli-Q y etanol al 25 % (el etanol sirve para aumentar la solubilidad de la cianocobalamina).

35 2.1.1.2 Disolución de 0,1 mg/ml: tomar 1 ml de la disolución según la etapa 2.2.1.1 y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 10 ml con agua Milli-Q.

2.1.1.3 Disolución de 0,01 mg/ml: tomar 1 ml de la disolución según la etapa 2.2.1.2 y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 10 ml con agua Milli-Q.

40 2.1.1.4 Disolución madre (1000 ng/ml): tomar 5 ml de la disolución según la etapa 2.2.1.3 y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 50 ml con agua Milli-Q.

2.1.2 La disolución madre descrita en la etapa 2.2.1.4 se usa para preparar diluciones patrón para crear la línea de calibración de la siguiente manera:

45 2.1.2.1 Disolución de 1000 ng/ml o disolución madre como tal.

2.1.2.2 Disolución de 800 ng/ml: tomar 4 ml de disolución madre y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 5 ml con agua Milli-Q.

50 2.1.2.3 Disolución de 500 ng/ml: tomar 5 ml de disolución madre y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 10 ml con agua Milli-Q.

2.1.2.4 Disolución de 200 ng/ml: tomar 1 ml de disolución madre y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 5 ml con agua Milli-Q.

55 2.1.2.5 Disolución de 100 ng/ml: tomar 1 ml de disolución madre y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 10 ml con agua Milli-Q.

60 2.1.2.6 Disolución de 50 ng/ml: tomar 1 ml de la disolución de 500 ng/ml (véase la etapa 2.2.23) y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 10 ml con agua Milli-Q.

2.1.2.7 Disolución de 25 ng/ml: tomar 5 ml de la disolución de 50 ng/ml (véase la etapa 7.2.2.6) y enrasar hasta el volumen requerido en un matraz de 10 ml con agua Milli-Q.

65 2.2 Ajustes de parámetros principales para el método de HPLC.

Con el fin de usar el sistema de HPLC Waters 625 LC, el software de adquisición de datos TotalChrom (Perkin Elmer) y el detector de UV/VIS 785 A (Perkin Elmer) correctamente, deben seguirse cuidadosamente las directrices proporcionadas en los procedimientos de uso. A continuación, se indican los parámetros de prueba fundamentales para determinar la cantidad de vitamina B12 producida por las cepas bacterianas sometidas a análisis:

2.2.1 Parámetros de HPLC:

- Tipo de columna de cromatografía:

columna Spherisorb ODS 2 (Waters) C18 250x4,6 mm, diámetro de 5 µm.

- Fase móvil: agua Milli-Q y acetonitrilo en gradiente de elución (tal como se indica en la tabla a continuación).

- Gradiente de elución: ajustar el gradiente de elución desde el teclado del controlador del sistema de HPLC Waters 625 LC, tal como se muestra a continuación:

Tiempo	% de agua Milli-Q	% de acetonitrilo
0	95	5
14	85	15
19	70	30
20	95	5
35	95	5

- Flujo de elución: En el controlador del sistema de HPLC Waters 625 LC, ajustar un flujo constante de 1,0 ml/min.

- Temperatura de columna: En el controlador del sistema de HPLC Waters 625 LC, ajustar una temperatura de 25 °C para el horno de temperatura controlada de la columna.

- Volumen de inyección: 20 µl de patrón y muestra.

2.2.2 Parámetros para el detector de UV/VIS. La longitud de onda es igual a 360 nm.

2.3 Línea de calibración.

2.3.1 Inyectar todas las disoluciones patrón preparadas tal como se describió en la etapa 2.2, una después de otra.

2.3.2 Adquirir los cromatogramas asociados por medio del software TotalChrom.

2.3.3 El software integra automáticamente los picos presentes en cada cromatograma. Sin embargo, es fundamental comprobar que la integración automática realizada por el software es correcta. El tiempo de retención de la cianocobalamina es de aproximadamente 19 minutos.

2.3.4 Se registran las áreas de cada pico individual asociado con vitamina B12. Basándose en el valor de las áreas de los picos en relación con las concentraciones de partida, se crea un gráfico de dispersión.

2.3.5 La línea de calibración generada debe tener un valor de R2 > 0,99.

2.3.6 La vitamina B12 presente en las muestras sometidas a análisis se calcula por interpolación a partir de la línea de calibración.

2.4 Preparación de muestras para determinar la vitamina B12 producida.

Se preparan las muestras siguiendo el mismo método descrito en las etapas 1.4.1 a 1.4.20.

2.5 Determinación de la vitamina B12 producida.

2.5.1 Se inyectan 20 µl del extracto preparado en la etapa 1.4.20 en la HPLC.

2.5.2 El valor del área del pico asociado con la muestra analizada se interpola a partir de la línea de calibración preparada según la etapa 1.4.

2.5.3 Se calcula el valor de vitamina B12 final de cada muestra individual basándose en la cantidad de la muestra inyectada (20 µl). Los resultados se expresan en ng/l.

ES 2 651 518 T3

El solicitante llevó a cabo un ensayo de HPLC (media de varias pruebas) [concentración de vitamina B12 expresada en µg/litro] a DO₆₀₀ y determinó los siguientes valores:

- 5 - *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02) = 45,57
- *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 = 43,02
- 10 - *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 = 32,27

Tabla 1

Cepas productoras de vitamina B12	Ensayo microbiológico (media de varias pruebas) [concentración de vitamina B12 expresada en µg/litro] a DO ₆₀₀	Ensayo de HPLC (media de varias pruebas) [concentración de vitamina B12 expresada en µg/litro] a DO ₆₀₀
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	15,640 ± 75 %	18,030 ± 12 %
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	10,950 ± 68 %	12,890 ± 10 %
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 16143	2,790 ± 76 %	8,000 ± 13 %

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cepa bacteriana probiótica que pertenece a la especie *Lactobacillus reuteri*, como productora de vitamina B12, identificada como *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 - (LRE02) y al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en:
- *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730,
 - *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, y
 - *Lactobacillus reuteri* DSM 16143;
- más preferiblemente que comprende la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02) y al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en:
- *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730,
 - *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
2. Composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica que comprende al menos una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Lactobacillus reuteri*, como productora de vitamina B12, identificada como *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 - (LRE02), para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen una patología debida a deficiencias de vitamina B12.
3. Composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 2, en el que dicha composición comprende:
- i) la cepa *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o
 - ii) la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o
 - iii) la cepa *Lactobacillus reuteri* DSM 16143 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o
 - iv) las tres cepas *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), o
 - v) las tres cepas *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus reuteri* DSM 16143, o
 - vi) las tres cepas *Lactobacillus reuteri* DSM 23878 (LRE02), *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y *Lactobacillus reuteri* DSM 16143.
4. Composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3, en el que está presente adicionalmente al menos una cepa bacteriana adicional capaz de acumular selenio dentro de las células bacterianas; dicha cepa bacteriana se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositada en la DSMZ el 05/04/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16341, *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16144, y *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16143.
5. Composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 3 o 4, en el que está presente adicionalmente glutatión en forma reducida.
6. Composición alimenticia o nutricional o complemento o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que está presente adicionalmente una cepa bacteriana adicional capaz de producir ácido fólico, preferiblemente dicha cepa se selecciona del grupo que consiste en: una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium adolescentis*, preferiblemente *Bifidobacterium adolescentis* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16595; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum*, preferiblemente *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18350; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, preferiblemente *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18352; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium breve*, preferiblemente *Bifidobacterium breve* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16596; una cepa bacteriana que pertenece a la especie *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, preferiblemente *Bifidobacterium pseudocatenulatum* depositada en la

DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16597, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 21/07/2004 y que tiene el número de registro DSM 16598 y *Bifidobacterium catenulatum/pseudocatenulatum* depositada en la DSMZ el 15/06/2006 y que tiene el número de registro DSM 18353.

- 5
7. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de sujetos que padecen anemia perniciosa, o para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de deficiencias de cobalamina en sujetos que toman vitamina C.
- 10
8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en la que dichas cepas bacterianas productoras de vitamina B12 y/o dichas cepas bacterianas capaces de acumular selenio y/o dichas cepas bacterianas productoras de ácido fólico se recubren con una composición que contiene al menos un lípido, preferiblemente de origen vegetal, seleccionándose dicho lípido del grupo que comprende grasas saturadas que tienen un punto de fusión por debajo de 75 °C, preferiblemente comprendido desde
- 15
- 45 hasta 65 °C.