

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 064**

51 Int. Cl.:

C12R 1/225 (2006.01)

A23C 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2014 E 14197818 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 3031931**

54 Título: **Bacterias de Lactobacillus Rhamnosus de calidad alimentaria**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2018

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17 Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BURTON, JEREMY;
MONACHESE, MARC;
REID, GREGOR;
SMOKVINA, TAMARA;
VAN HYLCKAMA VLIÉG, JOHAN y
BISANZ, JORDAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 659 064 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

Bacterias de *Lactobacillus Rhamnosus* de calidad alimentaria

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a bacterias de calidad alimentaria para mejorar la desintoxicación. Más en particular, la presente invención se refiere a bacterias de calidad alimentaria, o extractos de las mismas, capaces de eliminar mercurio de un medio acuoso al cual se exponen las bacterias de calidad alimentaria.

Antecedentes de la invención

10 Los seres humanos y los animales en general, están expuestos a muchos compuestos tóxicos que contaminan el medio ambiente, la cadena alimentaria, el agua de suministro, y varios objetos que forman parte de la vida cotidiana. Este intervalo en cifras, tipo y exposición, va desde los ingredientes en la pasta de dientes y los champús, hasta los fármacos y patógenos en el agua de pozos. En la Primera Nación Canadiense y las poblaciones Inuit, las toxinas medio ambientales son factores de riesgo para otras enfermedades altamente prevalentes, especialmente la diabetes tipo 2 [Sharp D. Environmental toxins, a potential risk factor for diabetes among Canadian Aboriginals. Int J Circumpolar Health. 2009;68(4):316-26]. Se ha incrementado un mercado consumidor de productos de venta libre
15 bajo la consigna 'detox', pero la mayoría de los productos no tienen fundamentos o evidencia clínica que los respalde. El concepto detox es muy atractivo para los consumidores, tanto para los consumidores de productos saludables como para los que se preocupan por el número creciente de noticias en los medios de comunicación acerca de la polución y las enfermedades relacionadas con las sustancias tóxicas. Por lo tanto, existe un sustancial interés en este área, pocos productos eficaces, y una creciente demanda.

20 La reposición o potenciación de organismos beneficiosos a través de la administración de probióticos se ha hecho posible en Canadá hace relativamente poco tiempo, y ha conducido a un mayor interés entre los consumidores y los profesionales sanitarios. De hecho, los probióticos es uno de los sectores de alimentación de mayor crecimiento en Norte América. Sin embargo, se ha visto limitado un conocimiento profundo en los mecanismos mediante los cuales los microbios autóctonos y los probióticos exógenos afectan al sujeto.

25 Los lactobacilos y bifidobacterias probióticos han demostrado ayudar a controlar varias patologías intestinales. Por ejemplo, la Patente U.S. N° 6.641.808 divulga el empleo de lactobacilos para el tratamiento de la obesidad; la Patente U.S. N° 5.531.988, divulga una mezcla de una inmunoglobulina y una bacteria, tal como lactobacilos o bifidobacterias o mezclas de los mismos, que se pueden usar para tratar la diarrea, estreñimiento, y los gases/cólicos; la Patente U.S. N° 6.080.401 divulga una combinación de probióticos que tienen *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidus* y preparaciones de hierbas para ayudar en la pérdida de peso, y así sucesivamente.
30

35 La capacidad de los productos probióticos para reducir las toxinas ha sido mucho menos estudiada aún, sin embargo tienen alguna base. Por ejemplo, se ha encontrado que los lactobacilos y/o bifidobacterias alteran las características metabólicas intestinales del sujeto [Ndagijimana, M. Laghi L, Vitali B, Placucci G, Brigidi P, Guerzoni ME. Effect of synbiotic food consumption on human gut metabolic profiles evaluated by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Int J Food Microbiol. 2009; 134:147-153]; bind to aflatoxin (Lactobacillus strains) [Hernández-Mendoza A, García HS, Steele JL. Screening of Lactobacillus casei strains for their ability to bind aflatoxin B1. Food Chem Toxicol. 2009;47(6):1064-8]; y detoxify or bind and negate other mycotoxins (*B. animalis*) [Fuchs S, Sontang G, Stidl R, Ehrlich V, Kundi M, Knasmüller S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. Food Chem Toxicol. 2008;46(4):1398-407].
40

En resumen, el problema asociado con los compuestos tóxicos es real, y una preocupación creciente para los consumidores.

Metales Pesados

45 La toxicidad de los metales pesados es un o de los grandes riesgos para la salud en el siglo 21. El consumo de plomo y cadmio a través de la exposición al medio ambiente y la dieta, ha sido directamente responsable de consecuencias de mala salud que incluyen: función neurológica disminuida y pérdida en el cociente intelectual, osteoporosis, cáncer de pulmón y de riñón.

50 Metales pesados tales como plomo y cadmio, están presentes en el medio ambiente natural, y por lo tanto, muchas bacterias han desarrollado a lo largo del tiempo mecanismos de resistencia para estos metales que generalmente incluyen la precipitación y el secuestro activo de los metales intra/extra celulares, o la descarga activa de los metales hacia el exterior del citoplasma celular. Se han investigado bacterias no alimentarias para usarse en el secuestro y la desintoxicación de metales pesados y han tenido éxito.

Mercurio

El mercurio es una de las mayores sustancias tóxicas conocidas por el hombre, y su consumo por un sujeto está unido a consecuencias de mala salud que incluyen desarrollo neurológico alterado en los niños. Sin embargo, se estima que los norteamericanos y los europeos consumen 6,7 µg al día de mercurio inorgánico y de metilmercurio (Organización Mundial de la Salud, 1991).

5 El mercurio está presente en el medio ambiente natural, y como tal, muchas bacterias han adoptado mecanismos de resistencias hacia él, los cuales generalmente reducen los niveles de mercurio en el entorno circundante. Se han investigado muchas bacterias de calidad no alimentaria para usarse en el secuestro y desintoxicación de mercurio y de compuestos de metilmercurio en el medio ambiente, sin embargo hasta la fecha no se ha demostrado la aplicación de bacterias de calidad no alimentaria.

10 Arsénico

El arsénico es un elemento metaloide que aparece comúnmente en dos estados de oxidación: arseniato (As V) y arsenito (As III). El arsénico se encuentra a menudo globalmente distribuido en la corteza terrestre, es altamente soluble en agua, y se encuentra en altas concentraciones en el agua subterránea. La toxicidad del arsénico se ha vinculado a un gran número de casos y se conoce por causar insuficiencia orgánica, cáncer y la muerte. Las principales rutas de exposición es mediante la ingestión a través de la dieta, a menudo las aguas contaminadas con arsénico se emplean para el riego de tierras agrícolas que dan como resultado la acumulación de metales en las plantas y en la comida.

Pesticidas

20 Los pesticidas, tales como el malatión y el paratión, entran dentro de la clase de los compuestos organofosforados, y actúan como inhibidores de la colinesterasa. El malatión es uno de los pesticidas más ampliamente utilizados en los Estados Unidos, y el uso del paratión se ha limitado recientemente y no se utiliza en muchos países desarrollados debido a su elevada toxicidad. Sin embargo, en los productos importados aún se detectan niveles constantes de paratión en su producción, y se emplean en contadas ocasiones en Norte América.

25 Las principales rutas de exposición pública es mediante el consumo a través de la dieta. Los trabajadores agrícolas y los trabajadores de la industria tienen mayor riesgo de exposición a través de su lugar de trabajo, mediante la absorción o inhalación si no se siguen correctamente los protocolos de seguridad.

30 En vista de los problemas asociados a la exposición de cualquiera de los compuestos tóxicos anteriores, sería ventajoso proporcionar bacterias de calidad alimentaria que puedan secuestrar los compuestos tóxicos, incluyendo los metales pesados, mercurio, arsénico, pesticidas, tales como malatión y paratión, o una combinación de los mismos, del tracto gastrointestinal de un sujeto, para reducir la cantidad del compuesto tóxico disponible para absorberse por el sujeto, mientras que se desintoxican los compuestos tóxicos se reduce directamente la toxicidad de los compuestos tóxicos disponibles para absorberse por el sujeto. Existe una necesidad de cepas bacterianas que presenten una capacidad mejorada para eliminar metales pesados, preferiblemente mercurio.

Compendio de la invención

35 El tema objeto de la invención se define mediante las reivindicaciones 1 a 5.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar bacterias de calidad alimentaria o extractos de las mismas para eliminar y/o neutralizar productos tóxicos de un medio ambiente o sustancia a la cual se expone la bacteria de calidad alimentaria, que resuelve las deficiencias inherentes en los tratamientos de desintoxicación tradicionales.

40 La presente invención proporciona un tratamiento eficaz para la eliminación y/o neutralización de productos tóxicos que se encuentran en el medio interno de los animales, en el medio en el cual se exponen, o en una sustancia que se ingiere por los animales, que puede evitar efectos adversos, a un coste razonable, y que puede ser beneficioso en la reducción del riesgo de enfermedades relacionadas con dichos productos tóxicos. Además, la presente invención es relativamente fácil de producir y suministrar a un sujeto.

45 Es un objetivo de la presente invención proporcionar bacterias de calidad alimentaria, o extractos de las mismas, para desintoxicar y/o secuestrar compuestos tóxicos, que incluyen metales pesados, mercurio, arsénico y pesticidas, con la aplicación de reducir la absorción de compuestos tóxicos por el sujeto.

La presente invención aborda la necesidad de realizar mejoras en las cepas bacterianas, particularmente para la eliminación de mercurio, con una cepa de bacterias de calidad alimentaria de *Lactobacillus rhamnosus*, estando la cepa depositada en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos) bajo el número I-4719.

50 La presente invención también se refiere al método para obtener una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que comprende una etapa de mutagénesis o de transformación genética de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* depositada en la CNCM bajo el número I-4719. La cepa obtenida puede denominarse como una cepa "modificada", que abarca cepas mutantes y transformadas genéticamente.

La presente invención también se refiere a una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* que se obtiene mediante el método anterior. La cepa modificada normalmente es capaz de eliminar mercurio de un medio acuoso.

La descripción se refiere a un método para obtener una fracción celular, que comprende las etapas de:

- a) cultivar una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* como se menciona anteriormente, y
- 5 b) recuperar la fracción celular a partir del cultivo de la etapa a).

La descripción se refiere también a la fracción celular, que se obtiene mediante el método anterior. La fracción celular normalmente es capaz de eliminar mercurio del medio ambiente acuoso. La presente invención se refiere también a una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* como se mencionó anteriormente.

10 Aquí en lo sucesivo, a menos que se proporcione de otra manera, la bacteria de calidad alimentaria es la cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, estando la cepa depositada en la CNCM bajo el número I-4719, o productos de mutagénesis o transformación genética de la misma, o fracciones celulares de la misma.

La cepa CNCM I-4719 permite una eliminación del mercurio sorprendentemente mejorada, en comparación con otras cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Ejemplos de cepas comparativas que permiten una menor eliminación de mercurio se encuentran enumeradas en la Tabla 1 de abajo.

15 Así, en una realización, la presente invención proporciona bacterias de calidad alimentaria o extractos de las mismas para eliminar compuestos tóxicos de una sustancia o medio ambiente al cual se exponen las bacterias de calidad alimentaria.

20 En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende bacterias de calidad alimentaria y un vehículo adecuado, a través de la cual la composición comprende una dosis eficaz de las bacterias de calidad alimentaria para eliminar un compuesto tóxico de una sustancia o medio ambiente al cual se exponen las bacterias de calidad alimentaria.

En una realización de la presente invención, la sustancia es una sustancia comestible o bebible.

En otra realización, la sustancia es una materia prima empleada para producir la sustancia comestible o bebible.

En otra realización de la presente invención, el medio es el tracto gastrointestinal de un sujeto.

25 En otra realización de la presente invención, el medio ambiente es un medio acuático en el que vive un sujeto.

En una realización de la presente invención, las bacterias de calidad alimentaria o extractos de las mismas, se proporcionan en una composición nutricional que comprende las bacterias de calidad alimentaria o extractos de las mismas, y un medio enriquecido en carbohidrato.

30 En una realización, la composición comprende una combinación de dos o más especies diferentes de bacterias de calidad alimentaria.

En otra realización, la presente invención proporciona además un método para reducir la absorción de compuestos tóxicos consumidos por el sujeto. El método, en una realización, comprende administrar al sujeto una dosis eficaz de bacterias de calidad alimentaria o extractos de las mismas, capaz de secuestrar el compuesto tóxico consumido por el sujeto.

35 En otra realización, la presente invención proporciona un método para eliminar un compuesto tóxico de una sustancia que está contaminada con dicho compuesto tóxico, que comprende poner en contacto la sustancia con las bacterias de calidad alimentaria o extracto de las mismas, capaces de eliminar el compuesto tóxico de la sustancia.

40 En otra realización, la presente invención proporciona un método para reducir los efectos tóxicos de un compuesto tóxico en un sujeto, comprendiendo el método: administrar al sujeto una cantidad eficaz terapéuticamente de las bacterias de calidad alimentaria de la Tabla 1 o cualquier combinación de las mismas.

En una realización de los métodos de la presente invención, las bacterias de calidad alimentaria comprenden una combinación de dos o más especies diferentes de las bacterias de calidad alimentaria.

En un aspecto de la presente invención el compuesto tóxico incluye un metal pesado.

45 En otro aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye un metal pesado y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias muertas.

En otro aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye un metal pesado y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias vivas.

En otro aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye un metal pesado y las bacterias de calidad alimentaria comprenden una mezcla de bacterias muertas y de bacterias vivas.

En otro aspecto de la presente invención el metal pesado es cadmio.

En otro aspecto de la presente invención el metal pesado es plomo.

- 5 En otro aspecto de la presente invención el compuesto tóxico incluye mercurio.

En otro aspecto de la invención el mercurio es mercurio inorgánico.

En otro aspecto de la invención el mercurio es mercurio orgánico.

En un aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye mercurio y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias muertas.

- 10 En un aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye mercurio y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias vivas.

En un aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye mercurio y las bacterias de calidad alimentaria comprenden una mezcla de bacterias muertas y de bacterias vivas.

En otro aspecto de la presente invención el compuesto tóxico incluye arsénico.

- 15 En un aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye arsénico y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias muertas.

En un aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye arsénico y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias vivas.

En otro aspecto de la presente invención el compuesto tóxico incluye un pesticida.

- 20 En un aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye un pesticida y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias muertas.

En un aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye un pesticida y las bacterias de calidad alimentaria comprenden bacterias vivas.

En otro aspecto de la presente invención el pesticida se selecciona de malatión o paratión.

- 25 En otro aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye endotoxinas.

En otro aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye aflatoxina.

En otro aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye aminas aromáticas heterocíclicas.

En otro aspecto de la presente invención, el compuesto tóxico incluye acrilamida.

Breve descripción de las figuras

- 30 La presente invención se entenderá completamente a partir de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria, y a partir de los dibujos acompañantes, que se proporcionan sólo a modo de ilustración y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

- 35 La Figura 1 A es un gráfica que ilustra la capacidad de una bacteria de calidad alimentaria de la presente invención para eliminar Hg^{2+} de una disolución que tiene un inóculo de 1 parte por millón (ppm) de Hg^{2+} (barras de error \pm SEM; * significa diferencia significativa ($p < 0,05$) mediante un ensayo T independiente).

La Figura 1 B es un gráfica que ilustra la capacidad de una bacteria de calidad alimentaria de la presente invención para eliminar Hg^{2+} de una disolución que tiene un inóculo de 15 partes por billón (ppb) de Hg^{2+} (barras de error \pm SEM; * significa diferencia significativa ($p < 0,05$) mediante un ensayo T independiente).

- 40 La Figura 2 es un gráfica que ilustra la capacidad de una bacteria de calidad alimentaria de la presente invención para eliminar mercurio orgánico de una disolución (barras de error \pm SEM; * significa diferencia significativa ($p < 0,05$) mediante un ensayo T independiente).

La Figura 3 es un gráfica que ilustra la capacidad de bacterias de calidad alimentaria vivas y muertas, de la presente invención, para eliminar mercurio inorgánico de una disolución (barras de error \pm SEM; * significa diferencia significativa ($p < 0,05$) mediante un ensayo T independiente).

La Figura 4 A es un gráfica que ilustra la variabilidad de la resistencia al mercurio dentro de un grupo de bacterias de calidad alimentaria del género *Lactobacillus rhamnosus* en un gradiente de Hg²⁺.

Descripción detallada de la invención

5 La invención se refiere a una cepa de bacterias de *Lactobacillus rhamnosus*, estando la cepa depositada en la CNCM bajo el número I-4719.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, que comprende una etapa de mutagénesis o de transformación genética de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* como se define anteriormente.

10 En otro aspecto, la invención también se refiere a una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* como se define anteriormente.

En una realización, la invención se refiere a una composición como se define anteriormente, que comprende además un vehículo.

En una realización, la invención se refiere a una composición como se define anteriormente, que comprende un vehículo que es un producto a base de leche.

15 Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se emplean en la presente memoria tienen el mismo significado que el que se entiende comúnmente por un experto en la técnica al que esta invención pertenece. También, a menos que se indique de otra manera, excepto en las reivindicaciones, el uso de "o" incluye "y" y viceversa. Los términos no limitantes no se construyen como limitantes a menos que se indique expresamente, o el contexto lo indique claramente de otro modo (por ejemplo "que incluye", "que tiene" o "que comprende" normalmente indican "que incluye sin limitación"). Formas en singular que se incluyen en las reivindicaciones, tales como "un", "uno" y "el" incluyen la referencia plural a menos que se indique expresamente de otra manera.

25 La expresión "bacteria de calidad alimentaria" se refiere a cualquier bacteria, viva o muerta, que no tiene efecto perjudicial para la salud humana o que tiene un estado GRAS (generalmente reconocido como seguro, de sus siglas en inglés).

El término "probiótico" como se emplea esta memoria, se refiere a bacterias de calidad alimentaria que llevan a cabo funciones beneficiosas para los organismos sujeto cuando están presentes y activas en una forma viable.

30 "Animales para la producción de alimentos" se emplea en la presente memoria para describir a cualquier animal que se prepara y emplea para el consumo humano. Un animal para la producción de alimentos puede ser, pero no se limita a, un animal rumiante, tal como la carne de vacuno y las vacas lecheras, cerdos, cordero, pollo, pavo o cualquier otra ave de corral, o animales acuáticos que incluyen gambas, langosta o pescados empleados para el consumo humano.

35 "Sujeto" o "sujetos" se emplea en la presente memoria para describir a un miembro del reino animal, incluyendo a los animales para la producción de alimentos para el hombre.

Bacterias de Lactobacillus rhamnosus de calidad alimentaria de la cepa CNCM I-4719 y modificaciones

La cepa de *Lactobacillus rhamnosus* está depositada, según el Tratado de Budapest, en la CNCM (Colección Nacional de Microorganismos, calle del Doctor Roux n° 25, París) el 5 de Marzo, 2013, bajo el número de acceso CNCM I-4719. Esta cepa también es referida como "DN 116-0060" o R37.

40 Esta cepa CNCM I-4719 tiene las siguientes características:

- Morfología de la colonia (en MRS sólido neutro + cisteína, 72 horas a 37°C, anaeróbica bajo condiciones de CO₂): Irregular, brillante, colonias blancas de 2 mm
- Morfología microscópica (en MRS líquido neutro + cisteína, 16 horas a 37°C, condiciones aeróbicas): Pequeña, delgada, bastones bipolares, en cadenas cortas o en racimo
- 45 - Fermentación (e identificación) de los siguientes sustratos (en una tira API 50 CH, en medio MRS API a 37°C durante 48 horas): D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbosa, L-ramnosa, Inositol, D-manitol, D-sorbitol, metil-alfaD-Manopiranos, metil-alfaD-glucopiranos, N-acetilglucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-melecitosa, Gentibiosa, D-turanosa, D-tagatosa, gluconato de potasio.

50 Esta cepa es capaz de eliminar el mercurio de un medio acuoso.

Como se emplea en la presente memoria, el término “eliminar mercurio de un medio acuoso” se refiere a la eliminación de mercurio que se puede ensayar como se describe en al menos uno de los ejemplos de a continuación.

5 La presente invención abarca también a cepas mutantes o transformadas genéticamente derivadas de la cepa parental CNCM I-4719. Estas cepas mutantes o transformadas genéticamente pueden ser cepas en donde han mutado uno o más genes endógenos de la cepa parental, por ejemplo para modificar alguna de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, su capacidad para fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia para transportarse en el tracto gastrointestinal, sus propiedades de post-acidificación o su producción de metabolitos).
 10 Pueden ser también cepas resultantes de la transformación genética de la cepa parental CNCM I-4719 de uno o más genes de interés, por ejemplo para conferir a dichas cepas transformadas genéticamente características fisiológicas adicionales, o para permitir expresar proteínas de interés terapéutico o vacunal que se desean administrar a través de dichas cepas. Estas cepas se pueden obtener a partir de la cepa CNCM I-4719 por medio de técnicas convencionales de mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio, y por transformación genética de *Lactobacilos*, tal como las descritas por Guy et al. (2004) o por Perea Vélez et al., 2007, o por medio de la técnica conocida como
 15 “barajado del genoma” (genome shuffling) (Patnaik et al., 2002 y Wang et al., 2007).

Son también un objeto de la presente descripción las fracciones celulares que se pueden obtener a partir de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* como se define anteriormente, preferiblemente la cepa CNCM I-4719. Existen preparaciones de ADN o preparaciones de la pared bacteriana particulares obtenidas a partir de cultivos de dicha cepa. Puede tratar igualmente de sobrenadantes de cultivos o de fracciones de estos sobrenadantes. A modo de
 20 ejemplo, el sobrenadante libre de células (CFS) de la cepa CNCM I-4719 se puede obtener empleando el método para obtener un CFS a partir de otra cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

Es también un objeto de la presente descripción un método para obtener una fracción celular, que comprende las etapas de:

- a) cultivar una cepa de *L. bulgaricus* como se define anteriormente, preferiblemente la cepa CNCM I-4719, y
- 25 b) obtener y/o recuperar la fracción celular a partir del cultivo en la etapa a).

En composiciones de la invención, dicha cepa se puede usar en forma de la bacteria entera que puede estar viva o muerta. Alternativamente, dicha cepa se puede usar en forma de un lisado bacteriano o en forma de fracciones bacterianas; se pueden elegir las fracciones bacterianas adecuadas para este uso, por ejemplo, mediante el ensayo de sus propiedades para eliminar mercurio de un medio acuoso. Las células bacterianas se presentan
 30 preferiblemente como células vivas, viables.

Bacterias de Calidad Alimentaria para Eliminar Compuestos Tóxicos

En una realización, la presente invención se refiere a bacterias de calidad alimentaria o extractos de las mismas, incluyendo los probióticos, capaces de eliminar o secuestrar compuestos tóxicos de un medio ambiente o sustancia a la cual se exponen las bacterias de calidad alimentaria. Las sustancias pueden incluir composiciones comestibles,
 35 tales como alimentos de origen vegetal o alimentos de origen animal, y pueden incluir también disoluciones bebibles, incluyendo el agua, leche, jarabes, extractos, y otras bebidas. Las sustancias pueden incluir también materias primas agrícolas empleadas para producir alimentos y disoluciones bebibles. Como tal, la presente invención se refiere también a los métodos de utilizar las bacterias de calidad alimentaria de la presente invención para prevenir la absorción de compuestos tóxicos por un sujeto, o en los métodos para filtrar compuestos tóxicos de las sustancias antes de exponer un sujeto a dichas sustancias.
 40

Las bacterias de calidad alimentaria pueden ser cualquier tipo de bacteria que pueda ser capaz de eliminar compuestos tóxicos de los alimentos o disoluciones que pueden ser consumidos por un sujeto, o a partir de los ingredientes empleados en la producción de dichos alimentos o disoluciones. La Tabla 1 incluye las bacterias de calidad alimentaria que se pueden emplear con la presente invención. En un aspecto preferido, las bacterias de calidad alimentaria pueden ser de cultivo aerobio, microaerófilo o anaerobio, y se pueden seleccionar del grupo que consiste en las bacterias de calidad alimentaria de la Tabla 1. La administración a un sujeto de las bacterias de calidad alimentaria, o extractos de las mismas, se puede realizar mediante cualquier método factible para introducir los organismos dentro del tracto gastro-intestinal del sujeto. Las bacterias se pueden mezclar con un vehículo y aplicarse a un alimento líquido o sólido o al agua de bebida. El material del vehículo no deberá ser tóxico para el
 45 sujeto. Cuando se trata de bacterias de calidad alimentaria vivas, el material del vehículo tampoco deberá ser tóxico para las bacterias de calidad alimentaria. Cuando se trata de bacterias de calidad alimentaria vivas el vehículo, preferiblemente, puede incluir un ingrediente que promueva la viabilidad de las bacterias durante el almacenamiento. Las bacterias de calidad alimentaria se pueden formular también como una pasta inocularante para inyectarse directamente en la boca del sujeto. La formulación puede incluir ingredientes añadidos para mejorar la palatabilidad,
 50 mejorar la vida útil, impartir beneficios nutricionales, y similares. Si se desea una dosificación reproducible y medida, las bacterias de calidad alimentaria se pueden administrar mediante una cánula o jeringa. La cantidad de bacterias de calidad alimentaria que se administra está regulada por los factores que afectan a la eficacia. Cuando se administra en la comida o en el agua de bebida, la dosificación se puede distribuir en un periodo de días o incluso
 55

semanas. El efecto acumulativo de dosificaciones bajas administradas a lo largo de varios días puede ser mayor que una única dosificación elevada de la misma. Se pueden administrar una o más cepas de bacterias de calidad alimentaria a la vez. Puede ser ventajosa una combinación de cepas ya que los sujetos individuales pueden diferir respecto a la cepa que es la más persistente en un individuo dado.

5 La presente descripción se dirige también a los extractos o fragmentos de bacterias de calidad alimentaria que pueden ser capaces de eliminar o secuestrar compuestos tóxicos de una sustancia o muestra. Como se muestra en la presente memoria, los inventores descubrieron que se pueden utilizar bacterias muertas de calidad alimentaria para secuestrar mercurio de una muestra. Como tal, la presente invención se dirige a fragmentos de bacterias de calidad alimentaria capaces de unirse a compuestos tóxicos que se encuentran en una sustancia de interés.

10 Aplicaciones

Las bacterias de calidad alimentaria de la presente invención se pueden administrar como una medida preventiva, para prevenir que un sujeto que en la actualidad no tiene un compuesto tóxico, adquiera el compuesto tóxico mediante la exposición a productos de consumo o ambientes donde están presentes los compuestos tóxicos.

15 El tratamiento de un sujeto que tiene compuestos tóxicos se puede realizar para reducir o eliminar la cantidad del compuesto tóxico portado por el sujeto, mediante la administración de bacterias de calidad alimentaria, o extractos de las mismas, al sujeto que tiene el compuesto tóxico.

20 Los métodos para administrar bacterias de calidad alimentaria son esencialmente los mismos ya sea para la prevención o para el tratamiento. Mediante una combinación de prevención y tratamiento con la administración rutinaria de una dosificación eficaz a un sujeto, el riesgo de contaminación por la toxina no deseada se puede reducir o eliminar sustancialmente.

25 En una realización, las bacterias de calidad alimentaria de la presente invención se pueden utilizar en métodos para filtrar los compuestos tóxicos de una sustancia. El método, en una realización, puede comprender poner en contacto la sustancia con las bacterias de calidad alimentaria durante un periodo de tiempo suficiente, y eliminar las bacterias de calidad alimentaria y la toxina de la muestra. Para realizar esta filtración de los compuestos tóxicos de una sustancia, las bacterias de calidad alimentaria, extractos o fragmentos de dichas bacterias de calidad alimentaria capaces de unirse a los compuestos tóxicos, se pueden adherir a un filtro, o a un soporte sólido, tal como a una columna de afinidad, y la sustancia se puede eliminar después a través del filtro o de la columna de afinidad.

30 Las bacterias de calidad alimentaria se pueden emplear también, según otra realización de la presente invención, para animales acuáticos alimentarios, tal como peces y gambas. En una realización, las bacterias de calidad alimentaria de la presente invención se pueden añadir a depósitos y estanques que contienen el animal acuático. Preferiblemente las bacterias de calidad alimentaria utilizadas para los animales acuáticos, pueden ser una bacteria que se encuentra de manera natural en los medios de agua dulce y salada.

Preparación y Administración

35 Aunque esta invención no está destinada a limitarse a ningún modo de aplicación particular, se prefiere la administración oral de las composiciones. Una bacteria de calidad alimentaria se puede administrar sola o junto con una segunda bacteria de calidad alimentaria diferente. Se puede utilizar en combinación cualquier número de bacterias de calidad alimentaria diferentes. Por "en combinación con" se entiende junto, sustancialmente simultáneo o secuencial. Las composiciones se pueden administrar en forma de comprimido, píldora o cápsula, por ejemplo. Una forma de aplicación preferida implica la preparación de una cápsula liofilizada que comprende la composición de la presente invención. Otra forma preferida de aplicación implica la preparación de una cápsula liofilizada de la presente invención. Otra forma de aplicación preferida implica la preparación de una cápsula desecada con calor de la presente invención.

45 Por "cantidad eficaz" como se emplea en la presente memoria se entiende una cantidad de bacteria o bacterias de calidad alimentaria, por ejemplo, *Lactobacillus*, lo suficientemente elevada como para modificar de manera significativamente positiva la afección que se trata, pero lo suficientemente baja como para evitar efectos adversos graves (en una relación razonable beneficio/riesgo), dentro del alcance del juicio médico sensato. Una cantidad eficaz de *Lactobacillus* variará según el objetivo particular a alcanzar, la edad y la condición física del sujeto que se está tratando, la duración del tratamiento, la terapia natural o concurrente, y el *Lactobacillus* específico empleado. La cantidad eficaz de *Lactobacillus* será, por tanto, la cantidad mínima que proporcionará la desintoxicación deseada.

50 Una clara ventaja práctica es que la bacteria de calidad alimentaria, por ejemplo *Lactobacillus*, se puede administrar de una manera conveniente, tal como por vía oral, intravenosa (cuando no hay alternativas viables), o mediante supositorio (vaginal o rectal). Dependiendo de la vía de administración, los ingredientes activos que comprenden las bacterias de calidad alimentaria pueden requerir estar recubiertos en un material para proteger dichos organismos de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar a dichos organismos. Para 55 administrar las bacterias de calidad alimentaria por otra administración distinta a la parenteral, deberán recubrirse o administrarse con un material que prevenga la inactivación. Por ejemplo, las bacterias de calidad alimentaria se pueden co-administrar con inhibidores enzimáticos o en liposomas. Los inhibidores enzimáticos incluyen el inhibidor

de la enzima pancreática, el diisopropilfluorofosfato (DFP), y trasylol. Los liposomas incluyen emulsiones P40 de agua en aceite y de aceite en agua, así como los liposomas convencionales y los diseñados específicamente que transportan lactobacilos o sus subproductos a una diana interna de un sujeto hospedador.

5 Los organismos de calidad alimentaria se pueden administrar también parenteral o intraperitonealmente. También se pueden preparar dispersiones, por ejemplo, en glicerol, glicoles de polietilenglicol líquido, y mezclas de los mismos, y en aceites.

10 Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (con agua soluble) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos la forma farmacéutica debe ser estéril, y debe ser fluida para extenderse fácilmente a través de la jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La propiedad de la fluidez se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante el uso en la composición de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Las disoluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación de las bacterias de calidad alimentaria en la cantidad requerida en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, cuando sea necesario, seguido de la esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de distintas bacterias de calidad alimentaria en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de la disolución esterilizada por filtrado previamente de la misma. Otros métodos de preparación preferidos incluyen, pero no se limitan a, la liofilización y el secado por calor.

25 Cuando las bacterias de calidad alimentaria están protegidas de manera adecuada como se describe anteriormente, el compuesto activo se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o se puede encerrar en una cápsula de gelatina dura o blanda, o se puede comprimir en comprimidos diseñados para pasar a través del estómago (es decir, recubrimiento entérico), o se pueden incorporar directamente con la comida de la dieta. Para la administración terapéutica oral, las bacterias de calidad alimentaria se pueden incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, píldoras, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares.

30 Los comprimidos, píldoras, pastillas, cápsulas, y similares, como se describen anteriormente, también pueden contener lo siguiente: un aglutinante, tal como goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente disgregante, tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, y similares; un lubricante, tal como estearato magnésico; y se puede añadir un agente edulcorante, tal como sacarosa, lactosa o sacarina o un agente saborizante, tal como menta, aceite de gaulteria o saborizante de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener un vehículo líquido, además de los materiales del tipo anterior. Se pueden presentar otros materiales diferentes como recubrimientos o para modificar de otra manera la forma física de la dosificación unitaria. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas o lactobacilos en suspensión se pueden recubrir con goma laca, azúcar o ambos.

35 Un jarabe o elixir puede contener el compuesto activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenes como conservadores, y un colorante o saborizante tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material empleado para preparar cualquier forma de dosificación unitaria deberá ser pura farmacéuticamente, y sustancialmente no tóxica en las cantidades empleadas. Además, el organismo de calidad alimentaria se puede incorporar dentro de preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

40 Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria como se emplea en la presente memoria se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosis unitarias, para los sujetos mamíferos tratados; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de bacterias de calidad alimentaria calculada para producir el efecto preventivo o terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. La determinación de nuevas formas de dosificación unitaria de la invención, se puede dictar y depender directamente de (a) las características únicas de las bacterias de calidad alimentaria y del efecto preventivo, de desintoxicación o terapéutico a alcanzar, y (b) de las limitaciones inherentes en la técnica de los compuestos de tales bacterias de calidad alimentaria para el establecimiento y el mantenimiento de una flora saludable en el tracto intestinal.

45 El organismo de calidad alimentaria se compone para una administración conveniente y eficaz, de cantidades eficaces con un vehículo adecuado farmacéuticamente o aceptable alimentario en la forma de dosificación unitaria anteriormente divulgada en la presente memoria. Una forma de dosificación unitaria puede, por ejemplo, contener el

compuesto activo principal en una cantidad aproximada de 10^9 viable o no viable, por ejemplo, de lactobacilos, por mililitro. En el caso de las composiciones que contienen ingredientes complementarios, tales como prebióticos, las dosis se determinan en referencia a la dosis y a la manera de administración habitual de dichos ingredientes.

5 El vehículo aceptable farmacéuticamente puede estar en forma de leche o partes de la misma, incluyendo el yogur. Se pueden emplear también productos que contienen leche desnatada, leche desnatada en polvo, sin leche o sin lactosa. La leche desnatada en polvo se suspende habitualmente en tampón fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés), se somete a autoclave o se filtra para erradicar los contaminantes vivos y proteínicos, después se deseca por congelación y por calor, se deseca a vacío, o se liofiliza.

10 Algunos de otros ejemplos de sustancias que pueden servir como vehículos farmacéuticos son azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, acetatos de etilcelulosa y celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; ácido esteárico; sulfato de calcio; carbonato de calcio; aceites vegetales, tales como aceite cacahuete, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz, y aceite de teobroma; polioles, tales como propilenglicol, glicerina, sorbitol, manitol, y polietilenglicol; agar; ácido alginico; agua apirógena; solución salina isotónica; extractos de arándano y solución reguladora de fosfato; leche en polvo desnatada; así como otras sustancias atóxicas compatibles empleadas en las formulaciones farmacéuticas, tales como por ejemplo, Vitamina C, estrógeno y equinácea. Se pueden presentar también agentes humectantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico, así como agentes colorantes, agentes saborizantes, lubricantes, excipientes, agentes de compresión, estabilizantes, anti-oxidantes y conservantes.

20 Por consiguiente, al sujeto se le puede administrar una cantidad eficaz terapéuticamente de al menos una bacteria de calidad alimentaria, y un vehículo aceptable farmacéuticamente de acuerdo con la presente invención.

Tabla 1: Comparación de cepas de *Lactobacillus rhamnosus*

Código de cepa 1	Código de cepa 2
HN001	
R37	DN 116-0060
R38	DN 116-0063
R22	DN 116-0009
R17	DN 116-0136
R29	DN 116-0064
R3	DN 116-0061
R10	DN 116-0032
R11	DN 116-0141

La divulgación anterior generalmente describe la presente invención.

25 **Ejemplos**

Los ejemplos se describen con propósitos de ilustración, y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1 – Demostración de eliminación de mercurio inorgánico a partir de un medio acuoso

30 Se añadió un inóculo del 1% de un cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* DN116-0060 de 24 horas a un caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) que contiene $HgCl_2$, y se incubó durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación, las células se eliminaron mediante centrifugación a 5.000 g. Se analizó la concentración de mercurio total en el sobrenadante a través de espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS, de sus siglas en inglés). Como se ilustra en la Fig. 1, los lactobacilos eliminaron el 94,4% del inóculo de mercurio de 1 parte por millón (ppm) (Fig. 1 A) y el 85% de un inóculo de 15 partes por billón (ppb) (Fig. 1 B). Ambas eliminaciones se consideraron significativas ($p < 0,05$) mediante un ensayo T independiente.

35 Ejemplo 2 – Demostración de eliminación de una forma de mercurio orgánico a partir de un medio acuoso

Se añadió un inóculo del 1% de un cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* DN116-0060 de 24 horas a un caldo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) que contiene $MeHgCl_2$, y se incubó durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación, las células

se eliminaron mediante centrifugación a 5.000 g. Se analizó la concentración de mercurio total en el sobrenadante a través de espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS).

5 La Figura 2 muestra la capacidad de una bacteria de calidad alimentaria para eliminar MeHg^{2+} de una disolución en un inóculo de partida de 1 ppm de MeHgCl_2 . (Barras de error \pm SEM). Como se ilustra en la Fig. 2, los lactobacilos eliminaron el 23,2% de un inóculo de mercurio 1 ppm ($p < 0,05$ mediante un ensayo T independiente).

Ejemplo 3 – Eliminación de mercurio inorgánico mediante *Lactobacillus rhamnosus* DN116-0060 vivos y muertos

El ensayo se llevó a cabo como se describe anteriormente en el Ejemplo 1 en una concentración de 500 ppb de HgCl_2 . Se compararon las células de *Lactobacillus rhamnosus* DN 116-010 viables que murieron por calentamiento a 80°C durante 10 minutos en un inóculo equivalente a la densidad celular final de células viables.

10 La Fig. 3 ilustra la capacidad de *Lactobacillus rhamnosus* DN116-0060 vivos y muertos para eliminar Hg^{2+} de una disolución en un inóculo de partida de 500 ppb de HgCl_2 . Como se muestra en la Fig. 3, las células viables eran capaces de eliminar significativamente más mercurio que las células muertas por calor ($p < 0,05$ mediante un ensayo T independiente) sugiriendo que existe un secuestro pasivo de mercurio, así como una desintoxicación metabólica potencial.

15 Ejemplo 4 – Variabilidad de la resistencia a mercurio dentro de las bacterias de *Lactobacillus rhamnosus* de calidad alimentaria

20 El ensayo se llevó a cabo como se describe anteriormente en el Ejemplo 1 a través del espectro de concentraciones de HgCl_2 . Se midió el crecimiento después de 24 horas a 37°C mediante la densidad óptica de los cultivos a una longitud de onda 600 nm. Se observó un espectro de resistencias para el mercurio en ambas especies, demostrando que la resistencia al mercurio es una característica variable entre las bacterias de calidad alimentaria.

25 La Figura 4 ilustra el crecimiento de 40 cepas diferentes de *Lactobacillus rhamnosus*, que incluyen las cepas comparativas de la Tabla 1, en un gradiente de Hg^{2+} medido mediante OD600 después de 24 horas de incubación a 37°C . Cada conjunto de puntos conectados representa una cepa. La resistencia es una característica variable de la cepa que da como resultado un espectro de perfiles de resistencias en ambas especies. La Fig. 4 ilustra que la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* DN 116-0060, también referida como "R37" tiene una resistencia mucho mayor comparada con la del resto de cepas, incluyendo la cepa HN001.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de bacterias de *Lactobacillus rhamnosus*, estando la cepa depositada en la CNCM bajo el número I-4719.
2. Un método para obtener una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, que comprende una etapa de mutagénesis o de transformación genética de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de la reivindicación 1.
3. Una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* según la reivindicación 1.
4. Una composición según la reivindicación 3, que comprende además un vehículo.
5. Una composición según la reivindicación 3, que comprende un vehículo que es un producto a base de leche.

5

10

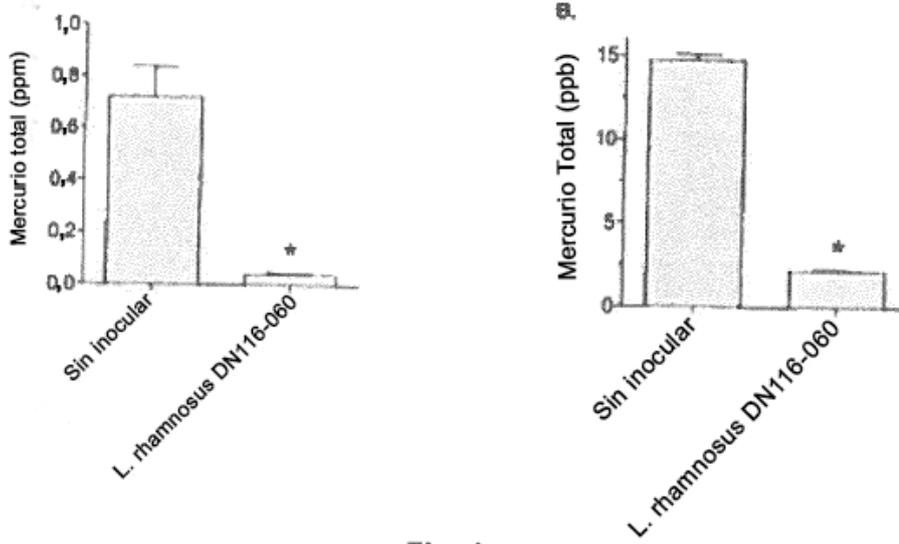


Fig. 1

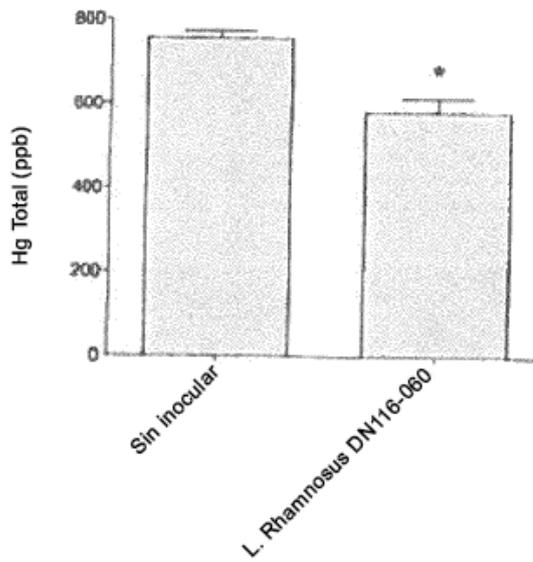


Fig. 2

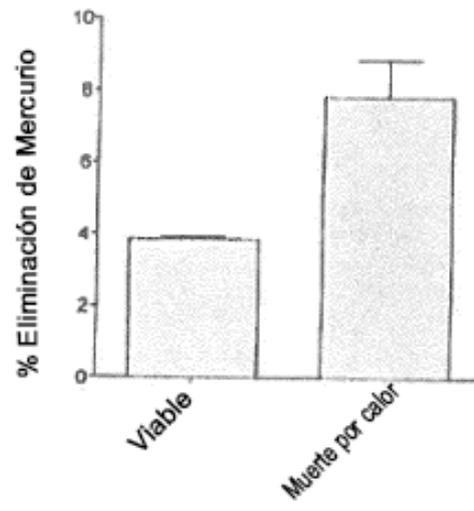


Fig. 3

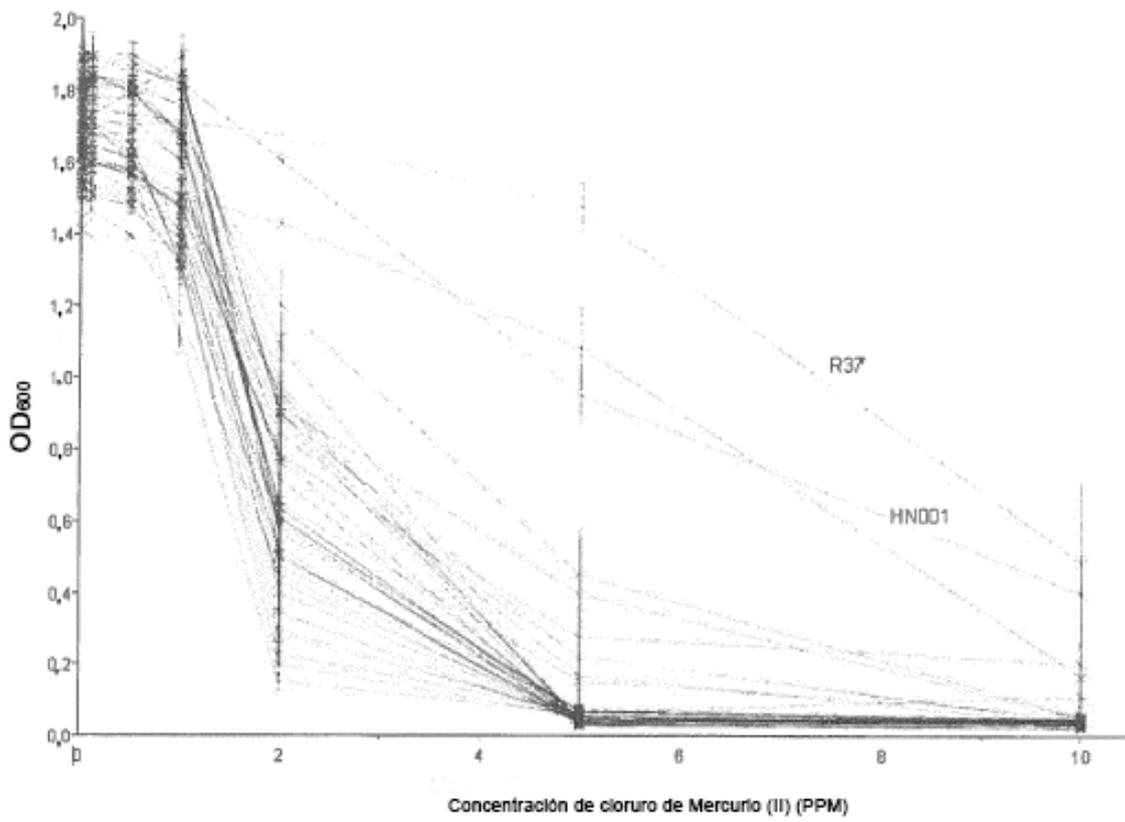


Fig. 4