

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 825**

51 Int. Cl.:

A23L 33/16	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01) A61P 3/02	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)	
A23L 33/10	(2006.01)	
A23L 33/13	(2006.01)	
A61K 49/18	(2006.01)	
A61K 33/00	(2006.01)	
A61K 33/24	(2009.01)	
C12N 1/20	(2006.01)	
C12R 1/225	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2014 PCT/EP2014/063246**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14206969**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2014 E 14732207 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3019038**

54 Título: **Bacterias probióticas que comprenden nanopartículas de óxidos metálicos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

25.06.2013 EP 13384202

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

26.11.2019

73 Titular/es:

**BIOSEARCH S.A. (100.0%)
Camino de Purchil 66
18004 Granada, ES**

72 Inventor/es:

**DOMÍNGUEZ VERA, JOSÉ MANUEL;
GÁLVEZ RODRÍGUEZ, NATIVIDAD;
MARTÍN MARCOS, MIGUEL ÁNGEL;
CARMONA RODRÍGUEZ-ACOSTA, FERNANDO;
RONDÓN RODRÍGUEZ, DEYANIRA y
OLIVARES MARTÍN, MÓNICA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 732 825 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 probióticas que comprenden nanopartículas de óxidos metálicos y usos de las mismas

5 Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo de las bacterias probióticas y, más específicamente, se refiere a bacterias probióticas cargadas con iones metálicos y/o nanopartículas metálicas, al uso de estas bacterias probióticas para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades causadas por deficiencia de minerales, al uso de estas bacterias como agente de contraste para la obtención de imágenes del tubo digestivo y al uso de estas bacterias para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

15 Los minerales son uno de los cinco grupos fundamentales de nutrientes necesarios para la vida. Las deficiencias en micronutrientes afectan a un porcentaje mayor del 50 % de la población en todo el mundo. En particular, se considera que las deficiencias en hierro, zinc y calcio son un problema de salud pública que aparece en la mayoría de los países en desarrollo. En los países desarrollados también hay problemas graves de deficiencia de minerales debido a los malos hábitos alimenticios en los que prevalece la comodidad y el placer sobre la salud. La deficiencia de hierro es el problema nutricional más común en el mundo. Además de afectar a una gran cantidad de niños y mujeres en los países en desarrollo, es la única deficiencia de nutrientes que también es significativamente frecuente en los países industrializados. Las consecuencias de la anemia por deficiencia de hierro son muy graves. La anemia provocada por una deficiencia de hierro en niños de corta edad se ha vuelto muy común, ya que en una dieta típica de un bebé, el nivel de hierro biodisponible es bajo, mientras que su rápido crecimiento requiere un nivel mucho más alto de hierro. Las consecuencias de la anemia por deficiencia de hierro (IDA, del inglés *iron deficiency anemia*) o anemia ferropénica, son muy graves, ya que se asocia con deterioro cognitivo y desarrollo psicomotor, con reducción del crecimiento y con la disminución de la resistencia a infecciones.

30 Para aumentar la ingesta diaria de estos minerales, en el comercio se dispone de numerosos complementos alimenticios que contienen diferentes formas inorgánicas y orgánicas de estos metales. En cualquier caso, se sabe bien que las sales inorgánicas tienen una biodisponibilidad muy baja. Las sales orgánicas, comúnmente basadas en gluconato, citrato, u otras moléculas, se caracterizan por un efecto sistémico superior. Las dosis terapéuticas de suplementos de hierro, que se prescriben para la anemia ferropénica pueden causar efectos secundarios gastrointestinales, tales como náuseas, vómitos, estreñimiento, diarrea, heces de color oscuro y/o dolores abdominales. Por lo tanto, hay una necesidad de proporcionar nuevas formulaciones para el aporte suplementario de metales, en particular para el aporte suplementario de hierro, con efectos secundarios gastrointestinales mínimos. En los documentos U 2009/0239280 y US 2010/0271770 se desvelan nanopartículas de metales producidas por bacterias.

40 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a una bacteria seleccionada de una bacteria ácido láctica y de una bacteria del género *Bifidobacterium* que comprende al menos una nanopartícula metálica unida a su superficie, en donde la nanopartícula comprende un metal y en donde el metal está en forma de óxido.

En segundo aspecto, la invención se refiere a un método para obtener dicha bacteria, que comprende poner en contacto dicha bacteria con al menos dicho metal, en donde dicha bacteria en contacto se realiza en presencia de al menos una sal de un catión divalente y a una temperatura en la que se reduce sustancialmente el crecimiento de dicha bacteria y a un pH en el que dicha nanopartícula tiene una carga electrostática superficial positiva.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una bacteria que puede obtenerse por el método de acuerdo con el segundo aspecto.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria de acuerdo con el tercer aspecto.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria de acuerdo con el tercer aspecto.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria de acuerdo con el tercer aspecto.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a una bacteria seleccionada de la bacteria del primer aspecto y de la bacteria del tercer aspecto, o a un cultivo biológicamente puro de acuerdo con el cuarto aspecto, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o afección asociada con una deficiencia de metal, en el que la bacteria comprende el metal que es deficiente en dicha enfermedad o afección y en la que la bacteria o el cultivo se

administra por vía oral.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a una bacteria seleccionada de la bacteria del primer aspecto y de la bacteria del tercer aspecto, o a un cultivo biológicamente puro de acuerdo con el cuarto aspecto, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el metal está comprendido en una nanopartícula magnética.

En un noveno aspecto, la invención se refiere a un agente de contraste que comprende una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria de acuerdo con el tercer aspecto o un cultivo biológicamente puro de acuerdo con el cuarto aspecto.

En un décimo aspecto, la invención se refiere a una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria de acuerdo con el tercer aspecto o a un cultivo biológicamente puro de acuerdo con el cuarto aspecto para su uso como agente de contraste en la formación de imágenes médicas por resonancia magnética, en el que el metal está comprendido en una nanopartícula magnética.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Imágenes por Microscopía Electrónica de Transmisión de finas capas de bacterias magnéticas artificiales incrustadas en una resina epoxi amorfa. a) Nanopartículas de maghemita positivas y b) nanopartículas de maghemita negativas y c) bacterias sin biopelícula de SPE (sustancia polimérica extracelular). Obsérvese que el injerto de nanopartículas tiene lugar cuando las bacterias contienen biopelícula de SPE y que las nanopartículas son positivas. d) Mapeo de hierro de una bacteria que contiene maghemita que muestra como el hierro se acumula selectivamente en la superficie externa de la bacteria.

Figura 2. Una imagen por MET (Microscopía Electrónica de Transmisión) típica, sin contraste, de bifidobacterias después de la incubación con nanopartículas de maghemita positivas, formando una estructura de tipo budín de pasas.

Figura 3. (a) Dispersión de bacterias magnéticas artificiales en el medio acuoso seguido de (b) separación de las bacterias magnéticas por un campo magnético.

Figura 4. Deposición de bacterias magnéticas artificiales marcadas con el colorante verde SYTO9 sobre polilisina en presencia de un imán externo.

Figura 5. Eliminación de hierro dependiente del tiempo de bacterias que contienen nanopartículas de óxido de hierro en medios que simulan el estómago y el intestino. Obsérvese que el nivel de hierro eliminado en el medio intestinal es significativamente más alto que el del estómago.

Figura 6. Eliminación de calcio dependiente del tiempo de bacterias en medios que simulan el estómago y el intestino.

Figura 7. Eliminación de zinc dependiente del tiempo de bacterias en medios que simulan el estómago y el intestino.

Figura 8. (A) La imagen de MEB (microscopía electrónica de barrido) muestra las bacterias después de la incubación con Ca^{2+} . (B) El espectro de EDX (energía dispersiva de rayos X) mostró el pico $\text{K}\alpha$ a 3,8 eV característico de Ca.

Figura 9. (A) La imagen de MEB muestra las bacterias después de la incubación con maghemita y Ca^{2+} . (B) El espectro EDX mostró los picos $\text{K}\alpha$ a 6,2 eV y a 3,8 eV característicos de Fe y Ca, respectivamente.

Figura 10. Una IRM (imagen por resonancia magnética) del cuerpo entero de un ratón, después de 6 h de administración de bacterias que contienen nanopartículas de maghemita. La morfología de algunas partes intestino delgado es evidente debido al contraste positivo (oscuro) por la acumulación de nanopartículas magnéticas.

Figura 11. Una IRM del cuerpo entero de un ratón, después de 12 h de administración de bacterias que contienen nanopartículas de maghemita. La morfología de algunas partes del intestino grueso es evidente debido al contraste positivo (oscuro) por la acumulación de nanopartículas magnéticas.

Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención, definida por las reivindicaciones, han observado que una bacteria ácido láctica o una bacteria del género *Bifidobacterium* es capaz de unir una nanopartícula metálica a su superficie de una manera dependiente del pH. La asociación entre la bacteria y la nanopartícula metálica es estable en aquellas condiciones de pH en las que la nanopartícula tiene una carga superficial positiva (Figura 1). Por otra parte, los inventores han observado que las condiciones de pH en las que la nanopartícula metálica se asocia de forma estable con la bacteria, se superponen con las condiciones de pH ácido en el estómago, mientras que las

condiciones de pH en el intestino permiten la disociación entre la nanopartícula metálica y la bacteria con el suministro posterior de la nanopartícula metálica (Ejemplo 2). Basándose en esta propiedad, los inventores han desarrollado un método para la administración de suplementos de metales a sujetos que lo necesiten mediante la administración oral de una bacteria que contiene nanopartículas metálicas de acuerdo con la invención. Estas bacterias, así como un cultivo de estas bacterias, también puede formularse como una composición farmacéutica o formar parte de un producto alimenticio o producto nutricional. Por otra parte, basándose en la capacidad de las bacterias ácido lácticas y de las bifidobacterias para llegar a las zonas tumorales hipóxicas, las bacterias asociadas a nanopartículas también podrían utilizarse para dirigir un compuesto de interés a un tumor. Además, las bacterias que llevan nanopartículas magnéticas asociadas a sus superficies, son capaces de destruir células tumorales cuando se someten a un aumento selectivo de la temperatura (hipertermia) cerca del tumor, cuando se aplica un campo magnético alterno en el intervalo de radiofrecuencia.

Por último, los presentes inventores también han observado que las bacterias cargadas con nanopartículas metálicas son adecuadas para la formación de imágenes del sistema gastrointestinal mediante resonancia magnética (IRM) (ejemplo 4). Por tanto, estas bacterias también son adecuadas para su uso como agentes de contraste de IRM orales.

Bacteria y cultivo

En un primer aspecto, la invención se refiere a una bacteria, en lo sucesivo, "bacteria de la invención", seleccionada de una bacteria ácido láctica y de una bacteria del género *Bifidobacterium* que comprende al menos una nanopartícula unida a su superficie, en donde la nanopartícula comprende un metal y en donde el metal está en forma de óxido.

La bacteria se selecciona de una bacteria ácido láctica y de una bacteria del género *Bifidobacterium*.

La expresión "bacteria ácido láctica" o "BAL", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier bacteria capaz de producir, como el principal producto metabólico final de la fermentación de hidratos de carbono, ácido láctico o al menos uno de sus derivados (incluyendo, pero sin limitación, ácido acético o ácido propiónico); por lo tanto, se pretende que la expresión incluya bacterias ácido propiónicas (BAP), que producen ácido propiónico como un producto de fermentación de hidratos de carbono. Son ejemplos ilustrativos no limitativos de bacterias ácido lácticas, las bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* y *Streptococcus*, así como de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* del orden *Lactobacillales*. Típicamente, la bacteria ácido láctica se selecciona de las especies *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefirii*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *farciminis Lactobacillus*, *Lactobacillus lactis*, *delbreuckii Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *crispatus Lactobacillus*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus jensenii*.

En una realización preferida, la bacteria ácido láctica es una bacteria del género *Lactobacillus*. El término "Lactobacillus", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un género que se describe en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) con el ID taxonómico 1578. En una realización particular, la bacteria ácido láctica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus bulgaricus*. En una realización más preferida, la bacteria ácido láctica es *Lactobacillus fermentum*. Las expresiones "*Lactobacillus fermentum*" o "*L. fermentum*" se refieren a una especie del género *Lactobacillus* que se describe en la base de datos del NCBI con el ID taxonómico 1613.

Las expresiones "bacteria del género *Bifidobacterium*" o "*bifidobacterium*", tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a un género de bacterias que se describe en la base de datos del NCBI con el ID taxonómico 1678. Son ejemplos ilustrativos, no limitativos, de bifidobacterias adecuadas las especies *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium adolescentes* y *Bifidobacterium angulatum*. En una realización particular, la bacteria del género *Bifidobacterium* se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantum* y *Bifidobacterium animalis*. En una realización más preferida, la bacteria del género *Bifidobacterium* es *Bifidobacterium breve*. Las expresiones "*Bifidobacterium breve*" o "*B. breve*", se refieren a una especie del género *Bifidobacterium* que se describe en la base de datos del NCBI con el ID taxonómico 1685.

En otra realización particular, la bacteria ácido láctica o la *bifidobacterium* de la invención, es una bacteria con capacidad de transferirse a la glándula mamaria después de la ingesta oral. Para detectar la capacidad de transferirse a la glándula mamaria, puede utilizarse un ensayo tal como el que se describe en el documento WO2004003235, para detectar la transferencia de un microorganismo a la leche después de la ingesta oral. En la solicitud internacional WO2008145756, se desvelan ejemplos de dichas bacterias. En una realización más particular,

la bacteria ácido láctica o la bacteria del género *Bifidobacterium* con capacidad de transferirse a la glándula mamaria después de la ingesta oral, se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 - *Bifidobacterium breve* depositada en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) con el número de registro 7263
- *Lactobacillus fermentum* depositada en la CECT con el número de registro 5716
- *Lactobacillus coryniformis* depositada en la CECT con el número de registro 5711
- *Lactobacillus salivarius* depositada en la CECT con el número de registro 5713
- *Lactobacillus gasseri* depositada en la CECT con el número de registro 5714
- 10 - *Bifidobacterium breve* depositada en la CECT con el número de registro 7264
- *Lactobacillus reuteri* depositada en la CECT con el número de registro 7260
- *Lactobacillus plantarum* depositada en la CECT con el número de registro 7262
- *Lactobacillus fermentum* depositada en la CECT con el número de registro 7265
- *Lactobacillus reuteri* depositada en la CECT con el número de registro 7266
- 15 - *Enterococcus hirae* depositada en la CECT con el número de registro 7410
- *Lactobacillus plantarum* depositada en la CECT con el número de registro 7412
- *Enterococcus faecalis* depositada en la CECT con el número de registro 7411
- *Lactobacillus salivarius* depositada en la CECT con el número de registro 7409 y
- *Lactobacillus reuteri* depositada en la CECT con el número de registro 7413.

20 La bacteria de la invención comprende al menos una nanopartícula metálica unida a su superficie. La expresión "nanopartícula metálica", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una nanopartícula que comprende un metal. El término "nanopartícula", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una
 25 partícula que tiene un diámetro que varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nanómetros. En una realización particular, las nanopartículas para su uso de acuerdo con la invención tienen típicamente un diámetro medio de partícula que varía de 2 a 50 nm, preferentemente de 4 a 10 nm, más preferentemente de 8 nm. El diámetro medio de partícula es el tamaño de partícula máximo medio, sabiendo que las partículas no son necesariamente esféricas. El tamaño de partícula puede medirse convenientemente utilizando técnicas convencionales, tales como técnicas de microscopía, por ejemplo, microscopía electrónica de transmisión. En una
 30 realización, las nanopartículas para su uso de acuerdo con la invención, tienen una forma esférica o sustancialmente esférica. La forma puede evaluarse convenientemente mediante técnicas convencionales de microscopía óptica o electrónica.

35 El término "metal", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier elemento, compuesto o aleación que sea un buen conductor de la electricidad y del calor. En una realización particular, el metal se selecciona del grupo que consiste en hierro, manganeso, cobalto, níquel, calcio, zinc, magnesio, potasio, cobre, cromo, selenio, silicio, yodo y combinaciones de los mismos. En una divulgación, realización preferida, el metal se selecciona del grupo que consiste en hierro, calcio, zinc, selenio y una combinación de los mismos. En una divulgación más preferida, el metal es el hierro.

40 En una realización particular, cuando el metal es selenio, éste no está en forma de selenocisteína.

45 El metal puede estar en forma de óxido. La expresión "óxido de metal", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier óxido de un elemento metálico. El término "óxido" se refiere a cualquier compuesto químico que contiene uno o varios átomos de oxígeno en un estado de oxidación -2, junto con otros elementos. En una realización particular, el óxido metálico es un óxido de hierro. Son ejemplos ilustrativos, no limitativos, de óxidos de hierro que pueden formar parte de la nanopartícula de la bacteria de la invención maghemita, magnetita, hematita, goethita y ferrihidrita. En una realización particular, el óxido de hierro se selecciona del grupo que consiste en maghemita, magnetita, hematita, goethita y ferrihidrita.

50 En una realización aún más preferida, el óxido de hierro es maghemita.

55 El término "maghemita", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mineral de óxido de hierro definido por la fórmula $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

El término "magnetita", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mineral de óxido de hierro definido por la fórmula Fe_3O_4 .

60 El término "hematita", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mineral de óxido de hierro definido por la fórmula $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

El término "goethita", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mineral de óxido de hierro definido por la fórmula $\alpha\text{-FeO(OH)}$.

65 El término "ferrihidrita", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un mineral de óxido de hierro definido por la fórmula $(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ o por la fórmula $[\text{Fe}^{3+}_{10}\text{O}_{14}(\text{OH})_2]$.

En una realización particular de la bacteria de la invención, la nanopartícula es una nanopartícula magnética. La expresión "nanopartícula magnética", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier nanopartícula con comportamiento ferromagnético y/o superparamagnético. Los ejemplos no limitantes adecuados pueden incluir, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Fe_2O_4 , Fe_xPt_y , Co_xPt_y , MnFe_xO_y , CoFe_xO_y , NiFe_xO_y , CuFe_xO_y , ZaFe_xO_y y CdFe_xO_y , en donde x e y varían entre 1 y 6, dependiendo del método de síntesis conocido en la materia. En una realización preferida, la nanopartícula magnética comprende óxido de hierro. En una realización más preferida, la nanopartícula magnética comprende maghemita.

Las nanopartículas que pueden adherirse a las bacterias de acuerdo con el primer aspecto de la invención pueden obtenerse por métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, el método descrito por Massart (Massart, R. IEEE Trans. Magn. 1981, 1247-1248) como se ilustra en el ejemplo 1.

En una realización preferida, las nanopartículas se unen directamente a las bacterias, es decir, no contienen ningún grupo químico orientado hacia el exterior o ninguna capa que pueda formar interacciones con los componentes de la pared bacteriana. En una realización preferida, las nanopartículas no están funcionalizadas con grupos amina. En otra realización preferida, las nanopartículas metálicas no están recubiertas con un componente polimérico. En una realización aún más preferida, las nanopartículas no están recubiertas con un poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico)-b-poli(L-histidina)-b-poli(etilenglicol) (PLGA-PLH-PEG).

En una realización particular, la bacteria comprende una nanopartícula metálica y al menos un metal adicional, por ejemplo, 2, 3, 4 o más metales adicionales. En esta realización particular, dicho metal adicional es diferente del metal que forma la nanopartícula metálica. En una realización más particular, el metal adicional se selecciona del grupo que consiste en hierro, manganeso, cobalto, níquel, calcio, zinc, magnesio, potasio, cobre, cromo, selenio, silicio, yodo y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, la bacteria comprende una nanopartícula metálica que comprende hierro, preferentemente, óxido de hierro, más preferentemente maghemita, y uno o más metales adicionales seleccionados del grupo que consiste en manganeso, cobalto, níquel, calcio, zinc, magnesio, potasio, cobre, cromo, selenio, silicio, yodo y combinaciones de los mismos. En una realización más particular, la bacteria comprende una nanopartícula metálica que comprende hierro, preferentemente, óxido de hierro, más preferentemente maghemita, y uno o más metales adicionales seleccionados del grupo que consiste en calcio, zinc, selenio y una combinación de los mismos. En una realización más particular, la bacteria comprende una nanopartícula metálica que comprende hierro, preferentemente un óxido de hierro, más preferentemente maghemita, y además comprende un metal seleccionado de cinc y calcio, más preferentemente comprende zinc y calcio.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un cultivo biológicamente puro de la bacteria del primer aspecto de la invención.

La expresión "cultivo biológicamente puro", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un cultivo en el que las bacterias de la invención se encuentran en una proporción de 95 % o más, por ejemplo 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, 99 % o más o 100 %, en comparación con otros organismos presentes en el cultivo. El término "cultivo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una población de las bacterias de la invención. Un cultivo puede comprender otros elementos además de las bacterias de la invención, tal como el medio de cultivo o cualquier otra sustancia que pueda añadirse al medio de cultivo, beneficiosa para el crecimiento del cultivo o su mantenimiento. Las expresiones "medio de cultivo" o "medio" son reconocidas en la materia, y se refieren en general a cualquier sustancia o preparación que se utiliza para el cultivo de células vivas. El término "medio", tal como se utiliza en referencia a un cultivo celular, incluye los componentes del medio ambiente que rodea a las células. Los medios pueden ser sólidos, líquidos, gaseosos o una mezcla de fases y materiales. Los medios incluyen medios de cultivo líquidos, así como medios líquidos que no sustentan el crecimiento celular. Los medios también incluyen medios gelatinosos tales como agar, agarosa, gelatina y matrices de colágeno. Como ejemplos de medios gaseosos se incluyen la fase gaseosa a la que se exponen las células que crecen en una placa de Petri u otro soporte sólido o semisólido. El término "medio" también se refiere al material que va a utilizarse en un cultivo celular, incluso si todavía no se ha puesto en contacto con las células. En otras palabras, un líquido rico en nutrientes preparado para cultivo bacteriano es un medio. Del mismo modo, una mezcla en polvo que cuando se mezcla con agua o con otro líquido se convierte en adecuada para el cultivo celular, puede recibir el nombre de "medio en polvo". "Medio definido" se refiere a medios fabricados con componentes químicamente definidos (generalmente purificados). Los "medios definidos" no contienen extractos biológicos mal caracterizados, tales como extracto de levadura y caldo de carne. Un "medio rico" incluye medios que están diseñados para sustentar el crecimiento de la mayoría o todas las formas viables de una especie en particular. Los medios ricos a menudo incluyen extractos biológicos complejos. En la presente invención puede utilizarse cualquier medio de cultivo convencional, apropiado para el cultivo de bacterias ácido lácticas o bifidobacterias, conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, medio MRS, medio de Hank, medio APT, medio RCM, medio LM17, medio GM17 y medio Elliker. En una realización particular, el medio de cultivo que puede formar parte del cultivo biológicamente puro de la invención es medio MRS. En el manual de medios de cultivo para microbiología alimentaria, vol. 34, editado por Janet E. L. Corry, G.D.W. Curtis, Rosamund M. Baird, puede encontrarse una descripción del medio MRS y de otros medios apropiados para el cultivo de bacterias ácido lácticas y bifidobacterias.

Método para la obtención de la bacteria

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una bacteria seleccionada de una bacteria ácido láctica y una bacteria del género *Bifidobacterium* que comprende al menos una nanopartícula unida a su superficie, donde la nanopartícula un metal y donde el metal está en forma de un óxido, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha bacteria con al menos dicho metal, en el que dicha puesta en contacto se realiza en presencia de al menos una sal de un catión divalente y a una temperatura en la que se reduce sustancialmente el crecimiento de dicha bacteria y a un pH en el que dicha nanopartícula tiene una carga electrostática superficial positiva.

Las expresiones "bacteria ácido láctica", "bacteria del género *Bifidobacterium*", y "metal", se han descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

De acuerdo con el método del segundo aspecto, el contacto entre la bacteria ácido láctica o la bacteria del género *Bifidobacterium* y el metal, debe realizarse en presencia de al menos una sal de un catión divalente. La expresión "sal de un catión divalente", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto en el que un catión divalente está acoplado a un contraión o está en solución. La expresión "catión divalente", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un elemento en un estado de oxidación positivo, que produce una carga eléctrica positiva con una valencia de 2. Son ejemplos de cationes divalentes Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{2+} , Se^{2+} y Si^{2+} . Preferentemente, la sal de un catión divalente se selecciona de una sal de calcio, una sal de magnesio y una combinación de los mismos. Más preferentemente, la sal de un catión divalente se selecciona de cloruro de calcio, cloruro de magnesio y una combinación de los mismos. Incluso más preferible, la sal de un catión divalente es una combinación de cloruro de calcio y cloruro de magnesio. Sin querer estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la adición de la sal es capaz de afectar a la superficie de la bacteria aumentando su porosidad y aumentando de este modo la unión del metal.

De acuerdo con el método del segundo aspecto, el contacto entre la bacteria ácido láctica o la bifidobacteria (*bifidobacterium*) y el metal, debe realizarse en condiciones de temperatura en las que el crecimiento de dicha bacteria se reduzca sustancialmente. La expresión "temperatura mínima de crecimiento", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a la temperatura por debajo de la cual no se produce el crecimiento bacteriano sostenido y equilibrado. La temperatura de crecimiento adecuada para realizar el método de acuerdo con la invención, varía dependiendo de la bacteria y debe determinarse para cada especie y cepa bacteriana. El experto en la materia conoce métodos y técnicas para determinar las condiciones de temperatura en las que el crecimiento de una bacteria se reduce sustancialmente, tales como los métodos descritos por Shaw et al (Shaw et al, Journal of Bacteriology, 1971, vol. 105 (2) : 683-684). En una realización particular, el contacto entre la bacteria ácido láctica o la bifidobacteria y el metal, se realiza a una temperatura comprendida entre 0 °C y 10 °C, más preferentemente a 0 °C.

En una realización preferida, la temperatura a la cual se realiza la puesta en contacto con el metal, es una temperatura a la cual el crecimiento de la bacteria se reduce al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, o más con respecto al crecimiento de la bacteria a su temperatura de crecimiento óptima.

En una realización particular, las bacterias ácido lácticas o las bifidobacterias se enfrían a una temperatura por debajo de la temperatura mínima de crecimiento, por ejemplo, 0 °C, antes de la incubación con el metal, por ejemplo, conservando en hielo el cultivo de la bacteria ácido láctica o bifidobacteria durante un período de tiempo de, por ejemplo, 10 minutos.

Las bacterias ácido lácticas o las bifidobacterias que van a modificarse mediante el metal de acuerdo con el método del segundo aspecto, pueden obtenerse a través del cultivo de las bacterias apropiadas en condiciones de cultivo estándar conocidas por el experto en la materia. En una realización particular, las bacterias ácido lácticas o las bifidobacterias proceden de un cultivo de 24 horas en medio MRS. En una realización preferida, la bacteria que va a tratarse con el método del segundo aspecto para obtener una bacteria que comprenda un metal unido a su superficie, se ha cultivado en un medio de cultivo que no comprende dicho metal. Sin querer estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que, dado que la bacteria se pone en contacto con el metal en condiciones que no permiten el crecimiento bacteriano sustancial, el metal no entra significativamente en la bacteria sino que se incorpora en la superficie de la bacteria.

La puesta en contacto debe realizarse a un pH en el que la nanopartícula metálica tenga una carga electrostática superficial positiva. La expresión "carga electrostática superficial", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a la carga electrostática o a la partícula que puede medirse por el potencial zeta de la nanopartícula. La expresión "potencial zeta" se refiere al potencial eléctrico en la doble capa (DC) interfacial en la ubicación del plano de deslizamiento frente a un punto en el fluido a granel fuera de la interfaz. En otras palabras, el potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unida a la partícula dispersada. El experto en la materia sabe cómo calcular el potencial zeta de una nanopartícula basándose en una movilidad electroforética determinada experimentalmente o movilidad electroforética dinámica (Delgado AV et al, 2005, Pure

Appl Chem. 77 (10): 1753-1850; Dukhin AS y Goetz PJ "Ultrasound for characterizing colloids", Elsevier, 2002).

El pH al cual la carga electrostática superficial de la nanopartícula metálica es positivo dependerá de la composición de la nanopartícula, y puede determinarlo un experto en la materia. Por ejemplo, cuando la nanopartícula metálica comprende maghemita, el pH debe ser inferior a 5. En una realización preferida, cuando la nanopartícula metálica comprende maghemita, la bacteria ácido láctica o la bifidobacteria y la nanopartícula maghemita se incuban a un pH de 2.

Estas condiciones experimentales preservan la biopelícula de SPE (sustancia polimérica extracelular) de las bacterias. La presencia de la SPE parece ser necesaria para injertar las nanopartículas metálicas a las bacterias (Figura 1c). De hecho, cuando se retira la biopelícula de SPE siguiendo protocolos estándar (Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 2, John J. Sambrook, David David, William Russell CSHL Press, 2001), las nanopartículas metálicas positivas no se fijan a la superficie exterior de las bacterias (Figura 1c).

En una realización particular, antes de la incubación del cultivo de la bacteria ácido láctica o de la bifidobacteria con el metal, se realiza una etapa de secado. Dicha etapa de secado puede realizarse mediante cualquier técnica adecuada conocida por el experto en la materia, tal como centrifugación del cultivo celular y decantación del medio.

En una realización particular del método del segundo aspecto, la bacteria ácido láctica la bifidobacteria se pone en contacto con dos o más metales. En una realización más particular, la bacteria se pone en contacto con un primer metal comprendido en una nanopartícula, realizándose dicha puesta en contacto a un pH en el que la nanopartícula tiene una carga electrostática positiva, y al menos un metal adicional diferente del metal que está comprendido en la nanopartícula. En una realización aún más particular, la bacteria se pone en contacto con una nanopartícula de hierro, por ejemplo, una nanopartícula de maghemita, y un metal adicional seleccionado de calcio, zinc, selenio y una combinación de los mismos, preferentemente un metal adicional seleccionado de calcio, zinc y una combinación de los mismos, más preferentemente una combinación de calcio y de zinc.

Los metales pueden proporcionarse mediante una solución que comprenda un compuesto que comprenda dicho metal, por ejemplo, una sal de dicho metal, o mediante una solución que comprenda nanopartículas que comprendan dicho metal.

Cuando se desea una bacteria que comprenda más de un metal adicional, la bacteria ácido láctica o la bifidobacteria podría ponerse en contacto con estos metales adicionales en la misma etapa, es decir, la incubación de las bacterias con una solución que comprenda los diferentes metales adicionales o, preferentemente, el contacto entre la bacteria ácido láctica o la bifidobacteria y cada uno de los diferentes metales puede realizarse en diferentes etapas de incubación sucesivas. En una realización particular, la etapa o etapas adicionales se realizan antes de la incubación de la bacteria ácido láctica o la bifidobacteria con la nanopartícula metálica. En una realización más particular, cada etapa adicional de puesta en contacto de la bacteria con un metal adicional es seguida por una etapa de secado. Dicha etapa de secado puede comprender, por ejemplo, la centrifugación de la mezcla de solución que contiene las bacterias y el metal y la eliminación de la solución.

En una realización particular, el método del segundo aspecto comprende las siguientes etapas:

- Poner en contacto una bacteria ácido láctica o una bifidobacteria con un primer metal, por ejemplo, calcio.
- Poner en contacto una bacteria ácido láctica o una bifidobacteria con un segundo metal, por ejemplo zinc.
- Poner en contacto una bacteria ácido láctica o una bifidobacteria con una nanopartícula que comprenda un tercer metal, por ejemplo hierro, preferentemente maghemita.

En aspectos adicionales, la invención también se refiere a una bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto, a una bacteria obtenida por el método del segundo aspecto y a los cultivos biológicamente puros de la misma. La expresión "cultivo biológicamente puro" se ha definido anteriormente.

Productos alimenticios y composiciones farmacéuticas

La bacteria del primer aspecto y la bacteria puede obtenerse por el método del segundo aspecto puede administrarse por vía oral a un sujeto, tanto en forma de un producto alimenticio o en forma de una composición farmacéutica.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un producto alimenticio que comprende una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto.

La expresión "producto alimenticio", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una sustancia o composición que es adecuada para el consumo de seres humanos y/o animales. El producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede referirse a un producto alimenticio en forma lista para el consumo. Sin embargo, como alternativa o además, la expresión producto alimenticio, tal y como se utiliza en el presente documento, puede significar uno o más materiales alimenticios que se utilizan en la preparación de un producto alimenticio. Son

ejemplos no limitativos de productos alimenticios apropiados que pueden utilizarse en la presente invención la leche, el yogur, queso, cuajada, leches fermentadas, productos fermentados basados en lácteos, productos fermentados basados en cereales, productos cárnicos fermentados, otros polvos basados en lácteos o en cereales, fórmulas de nutrición clínica, helados, zumos, pan, pasteles o dulces, formulaciones de alimentos para animales, formulaciones dietéticas sintéticas o semisintéticas, fórmulas para lactantes, fórmulas de nutrición clínica, helados, zumos, harinas, pan, pasteles, dulces o chicles. El experto en la materia sabe cómo preparar productos alimenticios a partir de bacterias probióticas, como por ejemplo, las bacterias de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria que puede obtenerse por el método del tercer aspecto y un excipiente farmacéuticamente activo.

La expresión "composición farmacéutica", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una composición destinada para su uso en terapia. La composición farmacéutica está dirigida a la administración oral y puede tener forma de comprimidos, cápsulas, suspensiones bacterianas líquidas, suplementos orales deshidratados, suplementos orales húmedos, alimentación deshidratada por sonda o alimentación húmeda por sonda.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal y como se utiliza en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, un diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en llevar o transportar los agentes en cuestión desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetil celulosa de sodio, etil celulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol, solutol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua apirógena; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas tales como DMSO (dimetilsulfóxido) y sus derivados. En Remington's Pharmaceuticals Sciences. Ed. por Gennaro, Mack Publishing, Easton, PA, 1995 se desvelan diversos vehículos utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para su preparación.

Las formas farmacéuticas adecuadas para administración oral incluyen cualquier composición sólida (comprimidos, pastillas, cápsulas, gránulos, etc) o composición líquida (soluciones, suspensiones bacterianas, emulsiones, jarabes, etc) y pueden contener excipientes convencionales conocidos en la técnica, tales como agentes aglutinantes, por ejemplo jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la preparación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, disgregantes, por ejemplo almidón, polivinilpirrolidona, glicolato sódico de almidón o celulosa microcristalina; o agentes humectantes farmacéuticamente aceptables tales como laurilsulfato de sodio.

La cantidad de dosificación requerida de las bacterias de la invención en el producto alimenticio o composición farmacéutica variará de acuerdo con la naturaleza del trastorno o el uso propuesto de la composición, tanto si se usa profilácticamente o terapéuticamente y el tipo de organismo involucrado.

En la presente invención puede utilizarse cualquier dosificación adecuada de las bacterias de la invención siempre que los efectos tóxicos no superen los efectos terapéuticos. La eficacia terapéutica y la toxicidad pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar con animales de experimentación, tales como, por ejemplo, calculando los parámetros estadísticos DE, (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) o la DL (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis de efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la relación DL/DE. Sin embargo, la actividad de las bacterias de la invención en el individuo es naturalmente dependiente de la dosis, así como dependiente de la carga de nanopartículas metálicas de las bacterias. Se prefieren las composiciones con índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos de estudios realizados en animales se utilizan para formular un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos o en animales. La dosificación contenida en dichas composiciones está preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE, con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, de la sensibilidad del paciente y de la vía de administración. La dosificación exacta la determinará el médico, a la luz de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. Por ejemplo, para la preparación de un producto alimenticio de acuerdo con la presente invención, la bacteria de la invención se incorpora en un soporte adecuado, en una cantidad de 10^5 ufc/g a aproximadamente 10^{12} ufc/g de material de soporte, preferentemente de aproximadamente 10^6 ufc/g a aproximadamente 10^{11} ufc/g de material de soporte, más preferentemente de aproximadamente 10^6 ufc/g a aproximadamente 10^{10} ufc/g de material de soporte.

5 En el caso de una composición farmacéutica, la dosificación de la bacteria de la invención debe ser de aproximadamente 10^5 ufc/g a aproximadamente 10^{14} ufc/g de material de soporte, preferentemente de aproximadamente 10^6 ufc/g a aproximadamente 10^{13} ufc/g de material de soporte, más preferentemente de aproximadamente 10^7 ufc/g a aproximadamente 10^{12} ufc/g de material de soporte. Para el propósito de la presente invención, la abreviatura ufc indicará una "unidad formadora de colonias" que se define como el número de células bacterianas revelado por recuentos microbiológicos en placas de agar.

10 La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la nanopartícula metálica o para mantener el efecto deseado. Los factores que pueden tenerse en cuenta incluyen la gravedad de la patología, la salud general del sujeto, la edad, el peso y sexo del sujeto, el tiempo y la frecuencia de administración, la combinación de uno o más fármacos, las sensibilidades de la reacción y la respuesta a la terapia. Las composiciones de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o cada dos semanas dependiendo de la semivida y de la tasa de aclaramiento de la formulación particular.

15 Uso médico del producto de la invención para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades causadas por una deficiencia de metales.

20 La bacteria de la invención es adecuada para su uso como suplemento oral para un sujeto que necesite un metal. La administración de un metal por medio de la bacteria de la invención, es ventajosa, entre otras razones, debido a que la nanopartícula metálica se libera específicamente en el intestino, impidiendo la liberación del metal en el estómago, que generalmente conduce a efectos secundarios no deseados (ejemplo 2, figura 5). Por otra parte, diferentes metales, tales como calcio o zinc, asociados a una bacteria ácido láctica o a una bifidobacteria, también se liberan en condiciones tanto estomacales como intestinales (ejemplo 2, figuras 6 y 7), lo que hace que estas bacterias sean plataformas adecuadas para la suplementación oral de múltiples metales. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una bacteria seleccionada de la bacteria del primer aspecto y la bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto, o un cultivo biológicamente puro de la misma, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección asociada con una deficiencia de metal, en el que la bacteria comprende el metal que es deficiente en dicha enfermedad o afección y en el que la bacteria o el cultivo se administra por vía oral.

30 En otro aspecto, se desvela un método terapéutico para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o afección asociada con una deficiencia de metal, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una bacteria seleccionada de la bacteria del primer aspecto y la bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto, o un cultivo biológicamente puro de la misma, en el que la bacteria comprende el metal que es deficiente en dicha enfermedad o afección y en el que la bacteria o el cultivo se administra por vía oral.

35 El término "metal" se ha definido en relación con la bacteria de la invención. En una realización particular del método para el tratamiento y/o prevención de enfermedades causadas por una deficiencia de metal, el metal es el calcio o zinc. En una realización particular, el metal es un "catión metálico". La expresión "catión metálico", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un elemento metálico en un estado de oxidación positivo, que produce una carga eléctrica positiva. En una realización particular, el catión metálico es un catión metálico divalente, es decir, un catión metálico con una valencia de 2. Son ejemplos de cationes divalentes Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{2+} , Se^{2+} y Si^{2+} . En una realización particular, el catión metálico divalente es Ca^{2+} o Zn^{2+} .

45 En otra realización particular del uso médico, la bacteria comprende más de un metal, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más metales. En una realización más particular, la bacteria comprende calcio y zinc.

50 La bacteria ácido láctica o bifidobacteria que comprende al menos un metal útil para el método para el tratamiento y / o prevención de enfermedades causadas por una deficiencia de metal, podrían obtenerse poniendo en contacto dicha bacteria ácido láctica o bifidobacteria con dicho metal. En el ejemplo 2 de la solicitud se proporciona un método ilustrativo no limitativo para la obtención de dichas bacterias que comprenden uno o más metales.

En una realización particular, el metal se asocia con la superficie de la bacteria.

55 En otra realización particular, el metal está comprendido en una nanopartícula unida a la superficie de la bacteria. El término "nanopartícula", así como sus realizaciones particulares y preferidas se ha descrito anteriormente.

60 En una realización particular, la bacteria ácido láctica o la bifidobacteria comprende una nanopartícula metálica, y al menos un metal adicional diferente del metal comprendido en la nanopartícula. Preferentemente, la nanopartícula metálica comprende un óxido, más preferentemente óxido de hierro, aún más preferentemente maghemita. Preferentemente, el al menos un metal adicional se selecciona del grupo que consiste en hierro, manganeso, cobalto, níquel, calcio, zinc, magnesio, potasio, cobre, cromo, selenio, silicio, yodo y combinaciones de los mismos. Más preferible, el metal adicional es calcio, zinc o selenio una combinación de los mismos. Incluso más preferentemente, el metal adicional es calcio y zinc.

65 En una realización particular, cuando el metal es el selenio éste no está en forma de selenocisteína.

En una realización más particular, la bacteria ácido láctica o bifidobacteria comprende una nanopartícula de maghemita, calcio y zinc.

5 El término "tratamiento", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier proceso, acción, aplicación, terapia o similar, en el que a un sujeto (o paciente), incluyendo un ser humano, se le proporciona ayuda médica, directa o indirectamente, con el objeto de mejorar la afección del sujeto, o retrasar la progresión de una afección o trastorno en el sujeto, o mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno en tratamiento.

10 El término "prevención", tal y como se utiliza en el presente documento, significa que la bacteria de la invención es útil cuando se administra a un paciente al que no se le ha diagnosticado que tiene posiblemente el trastorno o la enfermedad en el momento de la administración, pero que normalmente se espera que se desarrolle el trastorno o la enfermedad o que tiene un mayor riesgo de tener el trastorno o la enfermedad. De acuerdo con la invención, la bacteria de la invención ralentizará el desarrollo de los síntomas del trastorno o enfermedad, retrasará la aparición del trastorno o enfermedad, o impedirá del todo que el individuo desarrolle el trastorno o la enfermedad.

15 Los términos "paciente" o "sujeto", tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier animal, preferentemente un mamífero, e incluyen, pero sin limitación, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano de cualquier edad o etnia. En una realización particular, el sujeto padece una enfermedad asociada con una deficiencia de metal. En otra realización particular, al sujeto no se le ha diagnosticado que padece una enfermedad asociada con una deficiencia de metal, pero se considera que corre un alto riesgo de desarrollar dicha enfermedad.

20 La expresión "enfermedad o afección asociada con una deficiencia de metal", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una afección que presenta niveles en suero bajos de uno o más metales. Los niveles en suero de un metal que se consideran niveles en suero bajos, varían dependiendo de parámetros tales como el sexo y la edad y son conocidos por el experto en la materia. La deficiencia de metal puede deberse a una ingesta, digestión, absorción o utilización insuficiente de dicho metal.

30 En una realización particular, la enfermedad o afección asociada con una deficiencia de metal se selecciona del grupo que consiste de una enfermedad o afección asociada con deficiencia de hierro (ferropenia), una enfermedad o afección asociada con deficiencia de manganeso, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de cobalto, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de níquel, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de calcio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de zinc, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de magnesio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de potasio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de cobre, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de cromo, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de selenio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de silicio y una enfermedad o afección asociada con deficiencia de yodo.

40 Son ejemplos ilustrativos no limitativos de enfermedades o afecciones asociadas con deficiencias de metal los siguientes:

- 45 - Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de hierro (ferropenia): debilidad, cansancio, piel pálida, disnea, anemia, baja autoinmunidad, depresión, presión arterial baja, trastornos del habla, mala memoria y resfriados.
- Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de manganeso: trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH), asma, síndrome del túnel carpiano, convulsiones, pérdida de la libido, aborto espontáneo, retraso del crecimiento y pesadillas.
- 50 - Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de cobalto: anemia perniciosa, cansancio intenso, disnea e insuficiencia tiroidea.
- Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de níquel: hiperglucemia (altos niveles de azúcar en sangre), presión arterial baja, depresión, hepatitis, anemia, baja acidez estomacal, congestión nasal, cansancio e insuficiencia suprarrenal.
- 55 - Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de calcio: raquitismo, osteomalacia, osteoporosis, retracción de las encías, síndrome premenstrual, ataques de pánico, calambres musculares, debilidad pulmonar, lumbalgia, cálculos renales, insomnio, debilidad ósea, osteofitos y depósitos de calcio.
- Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de zinc: pérdida del gusto, pérdida de olfato, retraso del crecimiento, retraso en el desarrollo sexual, cicatrización lenta de heridas, TDAH, alopecia, defectos de nacimiento, olor corporal, trastornos cerebrales, diarrea, defectos cardíacos, hernia, impotencia, trastornos pulmonares y trastornos de la próstata.
- 60 - Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de magnesio: debilidad muscular y calambres, náuseas, arritmias cardíacas, TDAH, calcificación arterial, baja absorción de calcio, convulsiones, depresión, trastornos gastrointestinales, trastornos del crecimiento, migrañas menstruales, osteoporosis, temblores, cambios de humor y lipotimia.
- 65 - Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de potasio: náuseas, anorexia, irritabilidad, debilidad muscular, miedo, enfermedad mental, falta de energía, dolor punzante, acidez, tendencia hacia la violencia,

desconfianza, falta de ambición, nerviosismo y negatividad.

- Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de cobre: TDAH, anemia, artritis, carácter violento, parálisis cerebral, colesterol alto, párpados caídos, canas, hernia, cirrosis hepática, problemas de aprendizaje, hipoglucemia, alto riesgo de ictus y venas varicosas.
- 5 - Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de cromo: TDAH, pérdida de peso inexplicable, número de espermatozoides bajo, diabetes, depresión maníaca, problemas de aprendizaje, problemas de crecimiento, hiperactividad, enfermedad vascular coronaria, cataratas y niveles anómalos de azúcar.
- Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de selenio: manchas de la edad, envejecimiento de la piel, enfermedad de Alzheimer, cáncer, fibrosis quística, cansancio, palpitaciones cardíacas, VIH, hipotiroidismo, lesiones hepáticas, debilidad muscular y escoliosis.
- 10 - Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de silicio: cabello quebradizo, uñas quebradizas de las manos y de los pies, mala calidad de la piel, mala utilización de calcio y enfermedad arterial.
- Enfermedades o afecciones asociadas con deficiencia de yodo: bocio, trastornos menstruales, confusión mental, problemas de corazón y pulmón.

15 De acuerdo con el primer uso terapéutico de la invención, al sujeto que lo necesite se le administra una nanopartícula metálica que comprende el metal que es deficiente en la enfermedad o afección a tratar. Por ejemplo, si un sujeto va a tratarse de una enfermedad relacionada con deficiencia de hierro, o si en un sujeto que está en riesgo de desarrollar dicha enfermedad es deseable la prevención de una enfermedad asociada con deficiencia de hierro, a ese sujeto se le administra una bacteria que comprende una nanopartícula de hierro.

20 De acuerdo con los primeros usos terapéuticos de la invención, la bacteria o el cultivo biológicamente puro se administra por vía oral.

25 La expresión "administración oral", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier forma de suministro de la bacteria o cultivo de la invención a un sujeto, en el que la bacteria o el cultivo de la invención que se coloca en la boca del sujeto, sea o no la bacteria o el cultivo de la invención, se traga inmediatamente. Por lo tanto "administración oral" incluye administración bucal y sublingual así como administración esofágica.

30 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad suficiente de la bacteria o cultivo de la invención para proporcionar el efecto deseado y, en general, se determinará, entre otras causas, por las características de la bacteria o cultivo de la propia invención y el efecto terapéutico a conseguir. También dependerá del sujeto que vaya a tratarse, de la gravedad de la enfermedad que padezca dicho sujeto, de la forma de dosificación elegida, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben considerarse solamente como guías para el experto en la materia, que debe ajustar las dosis en función de las variables anteriormente mencionadas. En una realización, la cantidad eficaz produce la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad que se está tratando, por ejemplo, la normalización de los niveles del metal que fue deficiente en el sujeto.

40 Uso médico del producto de la invención para el tratamiento del cáncer

45 Las bacterias de acuerdo con la invención o los cultivos biológicamente puros de acuerdo con la invención, también son adecuados para el suministro de nanopartículas magnéticas en el tubo gastrointestinal. Las nanopartículas magnéticas dispuestas sobre la superficie de las bacterias hacen que las bacterias presenten momentos magnéticos permanentes y una respuesta magnética más fuerte. En un campo magnético alterno aplicado, los momentos magnéticos de las nanopartículas magnéticas podrían reorientarse periódicamente, lo que conduce a la transformación de la energía magnética en energía térmica, y la temperatura de las regiones circundantes se eleva rápidamente al intervalo de temperatura terapéutica (mayor de 42 °C), lo que daría lugar a la destrucción de las células adyacentes por hipertermia.

50 Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o a una bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto o a un cultivo biológicamente puro de la misma, para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que el metal está comprendido en una nanopartícula magnética.

55 Los términos "tratamiento", "sujeto" y "cantidad terapéuticamente eficaz", se han definido anteriormente en relación con los usos terapéuticos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas con deficiencia de metal.

60 El término "cáncer", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una enfermedad caracterizada por división celular incontrolada (o por un aumento de la resistencia a la supervivencia o apoptosis), por la capacidad de dichas células para invadir otros tejidos adyacentes (invasión) o por la propagación a otras áreas del cuerpo donde normalmente no se encuentran las células (metástasis) a través de vasos linfáticos y sanguíneos. En función de si pueden o no propagarse por invasión y metástasis, los tumores se clasifican como benignos o malignos: los tumores benignos son tumores que no pueden propagarse por invasión o metástasis, es decir, que sólo crecen localmente, mientras que los tumores malignos son tumores que son capaces de propagarse por invasión y metástasis. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término cáncer incluye, pero sin limitación, los siguientes tipos de cáncer: cáncer de mama, cáncer de vías biliares; cáncer de vejiga, cáncer de cerebro, incluyendo glioblastomas y

meduloblastomas; cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de esófago; cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, neoplasias hematológicas, incluyendo leucemia linfocítica aguda y leucemia mielógena, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T/linfoma, leucemia de células pilosas, leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, leucemias asociadas a SIDA y leucemia de linfocitos T adultos/linfoma; neoplasias intraepiteliales, incluyendo la enfermedad de Bowen y la enfermedad de Paget, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, linfomas, incluyendo la enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos, neuroblastomas, cáncer oral, como el carcinoma de células escamosas, cáncer de ovario incluidos los derivados de células epiteliales, células del estroma, células germinales y células mesenquimatosas; cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer rectal, sarcomas, incluyendo leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel incluyendo melanoma, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células basales y cáncer de células escamosas, cáncer testicular incluyendo tumores germinales, tales como seminoma y no seminoma (teratomas, coriocarcinomas), tumores del estroma y tumores de células germinales, cáncer de tiroides incluyendo adenocarcinoma y carcinoma medular de tiroides y cáncer renal incluyendo adenocarcinoma y tumor de Wilms. Un experto habitual en la materia conocerá otros tipos de cáncer.

En una realización particular, el cáncer es un cáncer gastrointestinal. La expresión "cáncer gastrointestinal", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier cáncer que afecta el tubo gastrointestinal, incluyendo esófago, estómago, sistema biliar, páncreas, intestino delgado, intestino grueso o colon y recto. En una realización particular, el cáncer gastrointestinal es un cáncer de estómago, un cáncer de intestino delgado o un cáncer de intestino grueso o de colon.

De acuerdo con los usos terapéuticos para el tratamiento del cáncer, la bacteria de la invención puede administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, vía oral, vía parenteral o vía intravenosa. En una realización preferida, la bacteria o el cultivo de la invención se administran por vía oral. La expresión "administración oral" se ha definido anteriormente.

En una realización particular de los usos terapéuticos para el tratamiento del cáncer, la bacteria de acuerdo con el primer aspecto tiene la capacidad de transferirse a la glándula mamaria después de la ingesta oral. Los métodos para detectar la capacidad de una bacteria para transferirse a la glándula mamaria se han desvelado anteriormente en relación con la bacteria del primer aspecto, así como ejemplos y realizaciones particulares de dichas bacterias. En esta realización particular, la bacteria de la invención es útil para el tratamiento de un cáncer de mama. Por lo tanto, en una realización particular de los usos terapéuticos de la invención, el cáncer es cáncer de mama y la bacteria es una bacteria con capacidad de transferirse a la glándula mamaria después de la ingesta oral.

La expresión "cáncer de mama" se refiere a cualquier trastorno proliferativo maligno de células mamarias, que se produce por lo general en los conductos (tubos que llevan leche al pezón) y lóbulos (glándulas que producen leche).

En una realización particular, el uso terapéutico para el tratamiento del cáncer comprende la etapa de dirigir al tumor la bacteria de acuerdo con el primer aspecto.

La etapa de dirigir al tumor la bacteria de acuerdo con la invención, podría realizarse por diferentes mecanismos. En una realización, la bacteria se dirige al tumor debido a su preferencia por el microambiente anaerobio tumoral. En otra realización, la bacteria que comprende una nanopartícula magnética, previamente definida, es guiada y atraída hacia el tumor diana mediante uno o más campos magnéticos o gradientes de campo magnético (por ejemplo, una fuente externa de campos magnéticos o gradientes de campo magnético). Dichos campos o gradientes pueden generarse, por ejemplo, mediante uno o más imanes y dispositivos médicos asociados colocados en el interior de un tumor diana, o adyacentes a un tumor diana, antes, durante o después del suministro de la bacteria. En algunas realizaciones, los imanes se colocan en el interior del cuerpo utilizando métodos quirúrgicos o percutáneos dentro del tumor diana, o fuera del tumor diana (por ejemplo, alrededor o adyacente al tumor diana). En algunas realizaciones, los imanes son imanes externos que se colocan fuera del cuerpo de un sujeto para crear una fuente externa de campo magnético alrededor de o adyacente al tumor diana. En algunas realizaciones, la fuente de los campos magnéticos es un imán permanente (por ejemplo, imán de neodimio (NdFeB)). En una realización, la fuente de los campos magnéticos es un electroimán. En otras realizaciones, el tamaño de los imanes varía de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 10 m y la fuerza de los campos magnéticos varía de aproximadamente 0,1 Tesla a aproximadamente 100 Tesla, incluyendo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 Tesla, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 Tesla, de aproximadamente 1 Tesla a aproximadamente 1,1 Tesla, de aproximadamente 1,1 Tesla a aproximadamente 1,2 Tesla, de aproximadamente 1,2 Tesla a aproximadamente 1,3 Tesla, de aproximadamente 1,3 Tesla a aproximadamente 1,4 Tesla, de aproximadamente 1,4 Tesla a aproximadamente 1,5 Tesla, de aproximadamente 1,5 Tesla a aproximadamente 2 Tesla, de aproximadamente 2 Tesla a aproximadamente 4 Tesla, de aproximadamente 4 Tesla a aproximadamente 10 Tesla, de aproximadamente 10 Tesla a aproximadamente 30 Tesla, de aproximadamente 30 Tesla a aproximadamente 50 Tesla, de aproximadamente 50 Tesla a aproximadamente 70 Tesla, de aproximadamente 70 Tesla a aproximadamente 90 Tesla e intervalos superpuestos de los mismos. En diversas realizaciones, el campo magnético se aplica durante un período de tiempo que varía de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 horas. En algunas realizaciones, el campo magnético se aplica durante aproximadamente 1 minuto a 5 minutos, de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 20, de aproximadamente 20

minutos a aproximadamente 30 minutos e intervalos superpuestos de los mismos. En diversas realizaciones, el campo magnético se aplica durante aproximadamente 5-15 minutos, incluyendo aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 minutos.

5 En algunas realizaciones, la fuente de los campos magnéticos es de uno o más imanes de un aparato (por ejemplo, un grupo de imanes como un aparato integral para dar forma y enfocar el campo magnético). Dicho aparato puede incluir, por ejemplo, una herramienta quirúrgica (por ejemplo, catéteres, alambres de guía y herramientas secundarias tales como láseres y globos, agujas de biopsia, sondas endoscópicas y dispositivos similares) con un accesorio de punta magnética (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 7 280 863 y las publicaciones de
10 patente estadounidenses N.º 200711116006, 2006/0116634, 2008/0249395, 2006/0114088 y 2004/0019447). Por lo tanto, en algunas realizaciones, las bacterias se suministran y para dirigirlas se utiliza un imán externo.

Cuando la bacteria de la invención comprende una nanopartícula magnética, dicha bacteria podría utilizar para aplicar una termoterapia a un tumor, preferentemente un tumor sólido, mediante un campo magnético alterno aplicado cerca del tumor. En esta realización, una vez que la bacteria cargada con nanopartículas magnéticas ha alcanzado el tumor, se aplica un campo magnético alternativo cerca del tumor, lo que produce calor por la bacteria cargada con nanopartículas magnéticas. Este tratamiento térmico induce la destrucción parcial o total de las células tumorales y/o del tumor o tumores. Dado que las células tumorales son más susceptibles al calor que las células sanas (Véase, por ejemplo: Overgaard et al., *Cancer*, 1977, 39, 2637 -2646), la termoterapia descrita en esta divulgación podría destruir selectivamente a las células tumorales. Por lo tanto, en una realización particular, el uso terapéutico comprende las siguientes etapas

- i) dirigir a un tumor la bacteria de acuerdo con el primer aspecto que comprende una nanopartícula magnética
y
- 25 ii) aplicar un campo magnético alternativo alrededor del tumor o adyacente al mismo.

La expresión "campo magnético alternativo" o "campo magnético oscilante", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un campo magnético cuya intensidad cambia con el tiempo. En una realización, el campo magnético alternativo aplicado durante el tratamiento se caracteriza por una frecuencia comprendida entre
30 aproximadamente 50 kHz y aproximadamente 1000 kHz, preferentemente entre aproximadamente 100 kHz y aproximadamente 500 kHz, más preferentemente entre aproximadamente 100 kHz y aproximadamente 200 kHz.

En otra realización, el campo magnético se caracteriza por una intensidad comprendida entre aproximadamente 0,1 mT y aproximadamente 200 mT, preferentemente entre aproximadamente 1 mT y aproximadamente 100 mT, más preferentemente entre aproximadamente 10 mT y aproximadamente 60 mT, típicamente entre aproximadamente 10 mT y aproximadamente 50 mT.

El valor máximo de la intensidad de campo magnético se determina por el valor al cual se vuelve tóxico para el organismo (es decir, esencialmente cuando se generan corrientes de Foucault). Puede ser posible que los campos magnéticos de intensidades superiores a 200 mT puedan utilizarse en la terapia si se demuestra que no son tóxicos.

En otra realización, el uso terapéutico de la presente invención se caracteriza por la cantidad de tiempo durante la cual se aplica el campo magnético. Esta cantidad de tiempo puede variar entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 6 horas, preferentemente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora, preferentemente entre 0,5 y 30 minutos, lo más preferentemente entre 1 minuto y 30 minutos.

El tratamiento térmico se aplica preferentemente a pacientes anestesiados. Por lo tanto, el tiempo durante el cual se realiza el tratamiento puede ser igual o menor que la cantidad de tiempo de la anestesia. Por tanto, puede realizarse un tratamiento térmico posiblemente durante más de 6 horas, por ejemplo, si un paciente está anestesiado durante más de 6 horas.

En otra realización, el uso terapéutico de la presente invención se caracteriza por la cantidad de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas utilizados durante la terapia. Esta cantidad de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas se relaciona con la carga de nanopartículas magnéticas de las bacterias y con la carga de material magnético de la nanopartícula. Esta cantidad se calcula midiendo la cantidad de material magnético presente en la suspensión de las bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas, que se administra. La cantidad de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas, que debe inyectarse, depende esencialmente del volumen del tumor tratado, de la temperatura requerida durante el tratamiento y del método de inyección. A mayor volumen tumoral y a mayor temperatura mayor será la cantidad de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas administrada.

En otra realización, la concentración de la suspensión de las bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas varía típicamente entre 1 mg/ml y 100 mg/ml, preferentemente entre 10 mg/ml y 50 mg/ml, donde esta concentración representa la cantidad de material magnético, preferentemente óxido de hierro, más preferentemente maghemita, contenida en la suspensión.

En otra realización, se repite la administración al sujeto de las bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas. El número de repeticiones depende de la cantidad de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas, que se administra a la vez. Si sólo se administra a la vez una pequeña cantidad de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas, la etapa de administración puede repetirse varias veces hasta que se administre a un paciente la cantidad deseada de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas.

En otra realización se repite el tratamiento térmico iniciado por la aplicación del campo magnético alternativo. Los tratamientos térmicos sucesivos aplicados después de la administración de una cantidad determinada de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas se denominan ciclo térmico.

La cantidad determinada de bacterias asociadas a nanopartículas magnéticas utilizadas para cada ciclo térmico puede haberse administrado a través de una sola administración o a través de varias administraciones sucesivas como se explicó anteriormente. Los diferentes tratamientos térmicos dentro de un ciclo térmico están separados entre sí por un tiempo de descanso. El tiempo de descanso puede ser igual a 1 segundo o mayor de 1 segundo, preferentemente igual a 1 minuto o mayor de 1 minuto, más preferentemente igual a 10 minutos o mayor de 10 minutos, preferentemente igual a, o mayor de, 30 minutos.

En una realización, los diferentes tratamientos térmicos dentro de un ciclo térmico están separados entre sí por un tiempo de descanso más largo que los citados anteriormente. Este tiempo de descanso puede variar entre 1 día y 15 días.

En una realización, el ciclo térmico se repite de 1 a 648 000 veces, en particular de 1 a 101 000 veces, más particularmente de 1 a 100 veces, típicamente de 1 a 10 veces. La tasa de repetición más alta de 648 000 veces se calcula suponiendo que el tratamiento se realiza durante un tiempo muy corto, típicamente de aproximadamente un segundo, durante 15 días con un tiempo de descanso muy corto, típicamente un tiempo de descanso de aproximadamente 1 segundo de separación de cada tratamiento. El número de repeticiones del tratamiento depende de la duración del tratamiento. Preferentemente cuanto más largo sea el tratamiento menor será la repetición siempre que se fijen los otros parámetros de la terapia (tales como la intensidad y o la frecuencia del campo magnético aplicado).

La transformación de la energía magnética a la ablación térmica se ha demostrado ampliamente para inducir el suministro de fármacos con control espacial y temporal en función de las operaciones de activación-desactivación ("on-off") del campo magnético de alta frecuencia aplicado (J. Liu, Y. Zhang, C. Wang, R. Xu, Z. Chen, N. Gu, J. Phys. Chem. C 114 (2.010) 7.673 a 7.679). Como un ejemplo, nanopartículas de magnetita con ibuprofeno en polímero de alcohol polivinílico (PVA) y Pluronic F68, y una fina capa de sílice muestran un comportamiento de suministro de fármaco rápido activado magnéticamente (S. H Hu, Y.Y. Chen, T.C. Liu, T.H. Tung, D.M. Liu, S.Y. Chen, Chem. Commun. 47 (2011) 1776-1778). Por lo tanto, en otra realización, la bacteria de la invención que comprende una nanopartícula magnética comprende además un agente terapéutico útil en el tratamiento del cáncer. En una realización, el agente se codifica en un vector capaz de expresar al menos un gen exógeno que codifica dicho agente. En esta realización, la bacteria de la invención se transforma con el vector. En una realización adicional el agente está ligado a la bacteria de la invención. El agente puede estar ligado, unido, fijado o acoplado o adherido químicamente a la bacteria de la invención o a la membrana de la bacteria o adherido/ligado por cualquier otro medio conocido por el experto en la materia. En una realización adicional, el agente está ligado a la nanopartícula metálica o encapsulado en la nanopartícula metálica. El método para ligar el agente a la nanopartícula metálica o para encapsular el agente en la nanopartícula metálica dependerá de la naturaleza del agente, y es conocido por el experto en la materia.

La expresión "agente terapéutico útil en el tratamiento del cáncer", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un agente adecuado para utilizar en el tratamiento del cáncer, tal como un agente citotóxico, un agente antiangiogénico o un agente antimetastático.

Los agentes citotóxicos que pueden utilizarse de acuerdo con esta realización del uso terapéutico de la invención para el tratamiento de cáncer incluyen, pero sin limitación, antibióticos de antraciclina tales como la doxorubicina y daunorubicina, taxanos tales como Taxol™ y docetaxel, alcaloides de la vinca tales como vincristina y vinblastina, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán, idarrubicina, mitomicina C, oxaliplatino, raltitrexed, tamoxifeno, cisplatino, carboplatino, metotrexato, actinomicina D, mitoxantrona, blenoxano o mitramicina. Agentes antiangiogénicos que pueden utilizarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento de cáncer incluyen, pero sin limitación, un agente antiangiogénico seleccionado del grupo de paclitaxel, 2-metoxiestradiol, prinomastat, batimastat, BAY 12-9566, carboxiamidotriazol, ácido CC-1088 dextrometorfano acético, ácido acético de dimetilxantenona, endostatina, IM-862, marimastat, penicilamina, PTK787/ZK 222584, RPI.4610, lactato de escualamina, SU5416, talidomida, combretastatina, tamoxifeno, COL-3, neovastat BMS- 275 291, SU6668, anticuerpos dirigidos contra VEGF, Medi-522 (Vitaxin II), CAI, interleucina 12, IM862, amilorida, angiostatina, angiostatina KI-3, angiostatina KI-5, Captopril, DL-alfa-difluorometilornitina, clorhidrato de DL-alfa-difluorometilornitina, endostatina, fumagilina, herbimicina A, 4-hidroxiifenilretinamida, juglona, laminina, hexapéptido de laminina, pentapéptido de laminina, lavendustina A, medroxiprogesterona, minociclina, inhibidor de ribonucleasa de placenta, suramina, trombospondina, anticuerpos dirigidos contra factores proangiogénicos (por ejemplo, Avastin,

5 Erbitux, panitumumab, Herceptin); inhibidores de bajo peso molecular de tirosina cinasa de factores de crecimiento proangiogénicos (por ejemplo Tarceva, Nexavar, Sutent, Iressa), inhibidores de mTOR (por ejemplo Torisel); interferón alfa, beta y gamma, IL-12, inhibidores de metaloproteínasa de matriz (por ejemplo, COL3, marimastat, batimastat); ZD6474, SU1248, vitaxina; inhibidores de PDGFR (por ejemplo, Gleevec); NM3 y 2-ME2; ciclopéptidos
 10 tales como cilengtida. Agentes antimetastásicos que pueden utilizarse en combinación con los anticuerpos de la invención para el tratamiento de cáncer incluyen, pero si limitación, cualquier agente capaz de actuar como un agente antimetastásico, tales como agentes alquilantes, antimetabolitos tales como 5-fluorouracilo, pemetrexed (MTA), raltitrexed (TDR); agentes citotóxicos de platino tales como cisplatino u oxaliplatino; inhibidores de topoisomerasa, agentes antimicrotúbulos, antraciclinas, alcaloides vegetales; inhibidores de GTPasa; inhibidores de angiogénesis; inhibidores de metaloproteínasa de matriz; inhibidores de cinasa reguladora del ciclo celular, tales como inhibidores de cinasas dependientes de ciclina y de ciclina; inhibidores de señalización de Wnt; inhibidores del factor de transcripción E2F; inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de AKT cinasa o ATPasa.

15 Método no terapéutico

La asociación entre la nanopartícula metálica y la bacteria ácido láctica o bifidobacteria, que es estable en condiciones de pH estomacales, se rompe debido al valor relativamente alto de pH en el intestino. Esto produce en la liberación de la nanopartícula metálica en el tubo intestinal (ejemplo 2). Por otra parte, diferentes metales, tales como calcio o zinc, asociados a una bacteria ácido láctica o a una bifidobacteria, también se liberan en condiciones tanto intestinales como estomacales (ejemplo 2, figuras 6 y 7). Por lo tanto, la bacteria de la invención, cuando se administra por vía oral, es útil para el suministro de un compuesto de interés en el intestino de un sujeto.

25 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención también puede utilizarse en un método no terapéutico para el suministro de un metal en el intestino de un sujeto, que comprende la administración oral de la bacteria del primer aspecto o la bacteria puede obtenerse por el método del tercer aspecto o un cultivo biológicamente puro de la misma.

La expresión "método no terapéutico", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un proceso, acción, aplicación o similar en un sujeto que (i) no se dirige a la mejora de una afección o enfermedad, directa o indirectamente, o a la reducción de la velocidad de progresión de una afección o enfermedad, o a mejorar uno o más síntomas de una afección o enfermedad de dicho sujeto y (ii) no se dirige a retrasar la aparición del trastorno o enfermedad, o a impedir que el individuo desarrolle del todo el trastorno o la enfermedad.

35 Por tanto, el sujeto de acuerdo con el método de uso no terapéutico de la invención no padece ninguna enfermedad o afección relacionada con una deficiencia de metal o con cualquier otra enfermedad o afección que podría tratarse mediante la administración de la bacteria o el cultivo de la invención y no corre un alto riesgo de desarrollar dichas enfermedades.

Las expresiones "metal" y "administración oral" se han definido anteriormente en relación con los usos terapéuticos de la invención.

40 Las expresiones "intestino" o "cavidad intestinal", como se utilizan en el presente documento, se refieren al segmento del tubo digestivo que se extiende desde el esfínter pilórico del estómago hasta el ano. Las expresiones incluyen tanto intestino grueso como intestino delgado, que a su vez comprende el duodeno, el yeyuno y el íleon, y el intestino grueso, que comprende el ciego y el colon.

45 Agente de obtención de imágenes y método de obtención de imágenes

La bacteria de la invención tiene la capacidad de contrastar el tubo digestivo en un método de obtención de imágenes, tal como resonancia magnética (ejemplo 4). Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un agente de contraste que comprende una bacteria de acuerdo con el primer aspecto o una bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto o un cultivo biológicamente puro de la misma.

55 Las expresiones "agente de obtención de imágenes" y "agente de contraste" se utilizan en el presente documento de manera indistinta y se refieren al uso de un compuesto biocompatible cuyo uso facilita la diferenciación de las diferentes partes de la imagen, aumentando el "contraste" entre las diferentes regiones de la imagen. Preferentemente, el agente de contraste es un agente de contraste para la obtención de imágenes por resonancia magnética (IRM). El agente de contraste para la obtención de imágenes de imágenes por resonancia magnética incluye quelatos de gadolinio, quelatos de manganeso, quelatos de cromo y partículas de hierro. Los agentes de contraste de IRM pueden incluir complejos de metales seleccionados del grupo que consiste en cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y erbio (III).

60 En una realización particular, el agente de contraste comprende una bacteria que comprende una nanopartícula metálica que comprende hierro, más preferentemente óxido de hierro e incluso más preferentemente maghemita.

65

En una realización particular, la bacteria de acuerdo con el primer aspecto o la bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto o el cultivo de las mismas, pueden administrarse por vía oral o por vía intravenosa para su uso como agentes de contraste para la obtención de imágenes por resonancia magnética.

5 La expresión "obtención de imágenes por resonancia magnética" o "IRM", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una técnica médica de obtención de imágenes más comúnmente utilizada en radiología para visualizar la estructura y función del cuerpo. La técnica proporciona imágenes detalladas del cuerpo en cualquier plano. La IRM no utiliza radiación ionizante, sino que utiliza un poderoso campo magnético para alinear la magnetización nuclear de (generalmente) átomos de hidrógeno en agua en el cuerpo. Los campos de radiofrecuencia se utilizan para alterar sistemáticamente la alineación de esta magnetización, haciendo que los núcleos de hidrógeno produzcan un campo magnético giratorio detectable por el escáner. Esta señal puede manipularse por campos magnéticos adicionales para acumular suficiente información para construir una imagen del cuerpo. Cuando un sujeto se encuentra en un escáner, los núcleos de hidrógeno (es decir, protones) que se encuentran en abundancia en el cuerpo de un animal en moléculas de agua, se alinean con el fuerte campo magnético principal. Después, un segundo campo electromagnético que oscila a radiofrecuencias y que es perpendicular al campo principal, se pulsa para impulsar una proporción de los protones fuera de alineación con el campo principal. Después, estos protones se desvían de nuevo en alineación con el campo principal que, como tal, emite una señal de radiofrecuencia detectable. Dado que en los diferentes tejidos del cuerpo (por ejemplo, grasa frente a músculo) los protones se realinean a diferentes velocidades, pueden revelarse las diferentes estructuras del cuerpo. Los agentes de contraste pueden inyectarse por vía intravenosa para potenciar la presencia de los vasos sanguíneos, tumores o inflamación. La IRM se utiliza para obtener imágenes de cada parte del cuerpo, pero es particularmente útil en afecciones neurológicas, trastornos de los músculos y las articulaciones, para la evaluación de los tumores y muestra anomalías en el corazón y en los vasos sanguíneos.

25 La bacteria de acuerdo con el primer aspecto o la bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto, podrían utilizarse como un agente de contraste para la formación de imágenes por resonancia magnética de prácticamente cualquier parte del cuerpo. Sin querer ligarse a ninguna teoría en particular, se dice que ambas bacterias ácido lácticas y bifidobacterias son atraídas por ambientes tumorales hipóxicos y, en consecuencia, estas bacterias son especialmente útiles para la obtención de imágenes de tumores sólidos.

30 En una realización particular, la bacteria de acuerdo con el primer aspecto o la bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto o el cultivo de las mismas, se utiliza como un agente de contraste para la obtención de imágenes por resonancia magnética del tubo digestivo. La expresión "tubo digestivo", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una serie de órganos huecos unidos en un tubo retorcido y alargado que va de la boca al ano. El tubo digestivo incluye la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado, el intestino grueso o colon y el recto.

35 En otra realización, la invención se utiliza en un método para la obtención de imágenes por resonancia magnética del tubo digestivo de un sujeto, que comprende:

- 40 (i) administrar por vía oral a dicho sujeto una bacteria de acuerdo con el primer aspecto, una bacteria que puede obtenerse por el método del segundo aspecto, un cultivo de las mismas o un agente de contraste de acuerdo con la invención, en el que el metal está comprendido en una nanopartícula y
- 45 (ii) detectar las nanopartículas metálicas en el tubo digestivo del sujeto.

Las expresiones "obtención de imágenes por resonancia magnética", "tubo digestivo", "sujeto", "administración oral" se han definido anteriormente.

50 La etapa de detectar las nanopartículas metálicas en el tubo digestivo del sujeto puede realizarla un experto en la materia, preferentemente un médico o técnico especializado, mediante un escáner con un equipo de IRM.

La parte del tubo digestivo que puede contrastarse mediante el método de obtención de imágenes de la invención, dependerá del tiempo transcurrido entre la administración oral de la bacteria o cultivo de la invención y la detección de las nanopartículas metálicas al explorar el tubo digestivo del sujeto. Por lo tanto, en una realización del método de obtención de imágenes por resonancia magnética, la exploración se realiza entre 1 y 5 horas después de la administración oral, preferentemente 3 horas después de la administración oral, obteniendo así imágenes del estómago, o entre 6 y 24 horas después de la administración oral, preferentemente 24 horas después de la administración oral, obteniendo así imágenes del intestino.

60 La invención se describe mediante los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Bacterias magnéticas artificiales como nanoimanes a temperatura ambiente

Materiales y métodos

Preparación de bacterias con nanopartículas de maghemita

- 5 Se preparó un cultivo de bacterias y se mantuvo a 37 °C y con agitación durante 24 h. A continuación, el cultivo bacteriano se mantuvo en hielo para enfriar las bacterias que después se recogieron por centrifugación a 100 g y la densidad óptica se midió a 600 nm para tomar 1×10^9 ufc/ml. Las bacterias se resuspendieron cuidadosamente en 1 ml de solución helada de MgCl₂, CaCl₂ (174,02 g de CaCl₂·2H₂O y 203,02 g de MgCl₂·6H₂O y disueltos en 1 litro de agua destilada) se recogieron para eliminar con lavado todas las impurezas y bacterias a 3000 g, 10 minutos.
- 10 Después de esto, los tubos se mantuvieron en posición invertida durante 1 min para drenar el agua y, a continuación, con las bacterias, se mezclaron 66,6 µl de una solución de las nanopartículas de maghemita (0,95 M) a pH 2. La mezcla se rellenó con agua hasta 1 ml y las bacterias se recogieron por centrifugación a 100 g, 20 minutos, para eliminar el exceso de iones.
- 15 Las nanopartículas de maghemita se prepararon de acuerdo con el método de Massart (Massart, R. IEEE Trans. Magn. 1981, 1247-1248) por coprecipitación de sales de Fe (II) y Fe (III) en una estequiometría de 0,5. Ajustando tanto el pH (12 y 11 para 4 y 6 nm, respectivamente) como la fuerza iónica (NaNO₃ 2 y 1 M para 4 y 6 nm, respectivamente), el tamaño de las nanopartículas de magnetita resultantes puede controlarse (Vayssieres, L.; Chaneac, C.; Tronc, E.; Jolivet, JPJ Colloid Interface Sci. 1998, 205, 205-212). Todas las soluciones se desgasificaron cuidadosamente con argón. Después de la oxidación, se obtuvo un coloide estable de nanopartículas de maghemita a pH 2.
- 20

Resultados

- 25 En el presente documento, se presenta una metodología sencilla y eficaz para sintetizar bacterias magnéticas artificiales por la deposición de nanopartículas magnéticas en una plataforma biológica como la superficie de bifidobacterias grampositivas. La carga negativa de la superficie externa de las bacterias y la carga positiva de las nanopartículas permiten la interacción. La posibilidad de esta interacción electrostática puede requerir la presencia de biopelículas de SPE. De manera más interesante, también se muestra que también posible la orientación y la manipulación de las bacterias magnéticas artificiales como las formadas por un campo magnético externo. Por otra parte, la orientación magnética se produce a temperatura ambiente, un hecho que contempla diversas y atractivas aplicaciones en diferentes dispositivos magnéticos de registro. La metodología implica condiciones suaves y puede adaptarse a la fabricación a gran escala, lo que permite la producción de componentes más asequibles y más respetuosos con el medio ambiente para los dispositivos del futuro.
- 30
- 35 La deposición es impulsada por las interacciones electrostáticas existentes entre las nanopartículas de maghemita positivas (8 nm de tamaño) y toda la superficie externa de las bifidobacterias. La interacción física se controla cambiando la carga superficial de las nanopartículas de maghemita, de modo que el nivel de adsorción de las nanopartículas de maghemita en las bifidobacterias presenta un nivel de adhesión diferenciado y muy controlable.
- 40 La Figura 1 muestra la distribución de la densidad de las partículas en función de la carga superficial de las nanopartículas magnéticas. Como puede observarse, las nanopartículas de maghemita positivas se adhieren selectivamente a la cubierta de peptidoglucano (a) mientras que las negativas no presentan ninguna afinidad para la deposición (b).
- 45 Las condiciones más favorables se observaron cuando la especie *Bifidobacterium breve* se incubó en medio MRS con nanopartículas de maghemita 8 nm de tamaño a un pH de 2, para obtener soluciones homogéneas de color rojo que se centrifugaron y se lavaron cinco veces con una solución de NaCl. Las soluciones se examinaron mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). Una imagen típica obtenida del material muestra núcleos de electrones densos y distintos, que son regulares en cuanto a forma y tamaño (Figura 2).
- 50 El diámetro medio, medido estadísticamente, era de $8 \pm 0,5$ nm. La espectroscopia por dispersión de energía confirmó que las partículas contenían Fe, que no se detectó fuera de las partículas.
- 55 En la cubierta externa de las bacterias se produce una gran acumulación de nanopartículas magnéticas formando como un budín de pasas, donde las nanopartículas magnéticas son "papas" cargadas positivamente, rodeado por un "budín" cargado negativamente, formado por la red de peptidoglucano.
- 60 Las bacterias marcadas con nanopartículas de maghemita se dispersaron fácilmente en agua formando una solución de color rojo oscuro. La centrifugación seguida de lavado no eliminó las nanopartículas de la superficie de las bacterias, destacando la fuerte interacción entre las nanopartículas y la red de peptidoglucano. Las bacterias magnéticas se orientan fácilmente en campos magnéticos bajos y pueden retirarse de las soluciones con pequeños imanes permanentes (fig. 3). La orientación en los campos magnéticos bajos a temperatura ambiente fue inesperada ya que se ha demostrado que sólo las nanopartículas de maghemita con un tamaño mayor de 20 nm son atraídas de la solución por gradientes magnéticos moderados. El hecho de que las bacterias magnéticas se comporten como imanes a temperatura ambiente indica la existencia de un orden magnético extenso, debido a la interacción dipolar-dipolar como consecuencia de la gran acumulación y distancias cortas entre las nanopartículas en la cubierta de
- 65

peptidoglucano. En este sentido, es interesante observar que la solución de color amarillo presente en el fondo, obtenida después de la aplicación del imán (Figura 3b), que solo contenía nanopartículas de maghemita, no se desplazaba con la aplicación de un campo magnético externo, es decir, el imán permanente no atraía a las nanopartículas de maghemita de 8 nm.

Por otra parte, la solución de color amarillo presente en el fondo obtenida después de la separación del imán (Figura 3b) carecía de bacterias. Esto demuestra que i) todas las bacterias se marcaron con nanopartículas magnéticas, ii) las bacterias actúan como plataformas biológicas donde se produce un orden magnético extenso entre nanopartículas de maghemita de 8 nm de tamaño.

Puesto que estas bacterias magnéticas pueden desplazarse en presencia de un campo magnético de gradiente bajo a temperatura ambiente, se ensayó la formación de una película orientada magnéticamente aplicando un campo magnético externo a una sola gota de bacterias magnéticas artificiales depositada sobre diferentes sustratos. Con el fin de visualizar las bacterias magnéticas, éstas se marcaron previamente con el colorante fluorescente SYTO9 (verde), que se utiliza comúnmente para el marcaje de bacterias vivas. Como ejemplo, en la figura 4 se muestra el efecto de un imán permanente moderado sobre las bacterias magnéticas artificiales cuando se depositan en vidrio de polilisina.

Las bacterias magnéticas artificiales fluorescentes se comportan como imanes a temperatura ambiente y se alinean siguiendo las líneas del campo magnético externo que dan lugar a una organización nanoestructurada de bacterias magnéticas donde la posición y la orientación de nano-objetos se controla gracias a una entrada externa (el campo magnético).

En conclusión, la presente invención muestra la posibilidad de preparar bacterias magnéticas artificiales y la posibilidad de controlar la orientación magnética de estos nano-objetos a temperatura ambiente. Esta etapa es crucial en el uso de este sistema en dispositivos magnéticos de registro.

EJEMPLO 2

Estudio de suministro de hierro, calcio y zinc

Materiales y Métodos

Bacterias con minerales (adaptado de Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3ª ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.132-150)

Se preparó un lote de cuatro tipos de muestras diferentes: a) sólo bacterias (control), b) bacterias con calcio, c) bacterias con calcio y zinc y, finalmente, d) bacterias con calcio, zinc y hierro.

El procedimiento general es el siguiente:

1. Medir la DO600 del cultivo de 24 horas de *L. fermentum* para recoger 2×10^9 células/ml.
2. Enfriar los cultivos a 0 °C conservando los tubos en hielo durante 10 minutos.
3. Recuperar las células por centrifugación a 3 000 g, 20 minutos a 4 °C.
4. Decantar el medio de los sedimentos celulares. Colocar los tubos en posición invertida sobre una almohadilla de toallitas de papel durante 1 minuto para permitir el drenaje de las últimas trazas de medio.
5. Resuspender cada sedimento con movimientos circulares o agitación con vórtex suave en 1 ml de solución helada de $MgCl_2$, $CaCl_2$ (174,02 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 203,02 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y disueltos en 1 litro de agua destilada).
6. Recuperar las bacterias por centrifugación a 3 000 g durante 20 minutos a 4 °C.
7. Decantar el medio de los sedimentos celulares. Colocar los tubos en posición invertida sobre una almohadilla de toallitas de papel durante 1 minuto para permitir el drenaje de las últimas trazas de medio.
8. Resuspender el sedimento con movimientos circulares o agitación con vórtex suave en 1 ml de $CaCl_2$ 0,5 M helado.
9. Añadir 5 µl de $Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (1 M).
10. Recuperar las bacterias por centrifugación a 3 000 g durante 20 minutos a 4 °C.
11. Añadir 100 µl de nanopartículas de maghemita (0,95 M, pH 2-5) al sedimento aislado.

Observación 1: cuando se prepara un control solo con bacterias (control), después de la etapa 7, el sedimento se resuspende con movimientos circulares o agitación con vórtex suave en 1 ml de agua destilada y después se pasa a la etapa 11.

Observación 2: cuando se preparan bacterias solo con $CaCl_2$ eliminar las etapas 9 y 10.

Observación 3: cuando se preparan bacterias con $CaCl_2$ y zinc eliminar la etapa 11.

Observación 4: cuando se preparan bacterias con $CaCl_2$, zinc y hierro, la secuencia seguida para añadir minerales es, calcio, zinc y hierro.

12. Transferir los tubos a una gradilla colocada en un baño de agua circulante precalentada a 42 °C. Dejar los tubos en la gradilla durante exactamente 90 segundos. No agitar los tubos.

13. Transferir rápidamente los tubos a un baño de hielo. Dejar que las bacterias se enfríen durante 1-2 minutos.

14. Recuperar las bacterias por centrifugación a 3 000 g durante 20 minutos a 4 °C.

15. Lavar las bacterias dos veces en agua destilada.

Las muestras de bacterias resultantes se incubaron en jugo gástrico y gastrointestinal a 37 °C con agitación continua (170 rpm). Se tomó 1 ml de la muestra cada hora para completar 6 horas en el caso de la simulación de jugo gástrico y 4 horas en el caso de la simulación de jugo gastrointestinal. La liberación de metal se analizó por absorción atómica e ICP (espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente).

Composición de jugo gástrico simulado: disolviendo pepsina (0,01 g), mucina gástrica (0,015 g) y NaCl (0,088 g) en 10 ml de agua destilada con un pH de 1,3, ajustado utilizando HCl 1M, se preparó jugo gástrico simulado.

Por lo tanto, la composición final de la muestra en la celda de reacción fue, 1 mg/ml de pepsina, 1,5 mg/ml de mucina gástrica y 8,8 mg/ml de NaCl (0,15 mM).

Composición de jugo gastrointestinal simulado: disolviendo extracto de bilis (0,05 g), lipasa (0,016 g) y CaCl₂ (0,007 g) en 10 ml de agua destilada con un pH de 7,0, ajustado con HCl o NaOH 1 M, se preparó jugo gastrointestinal simulado.

Por lo tanto, la composición final de la muestra en la celda de reacción fue, 5 mg /ml de extracto de bilis, 1,6 mg/ml de lipasa, CaCl₂ 5 mM.

Resultados

Las muestras (M1-M18) de *L. fermentum* preparadas especialmente con maghemita, se colocaron en recipientes adecuados que contenían los jugos estomacales e intestinales simulados, según sea apropiado, y se incubaron a 37 °C con agitación continua. Se tomaron muestras en los siguientes momentos: 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas. Las muestras se centrifugaron para decantar las bacterias y se tomaron 900 µl de los sobrenadantes para el análisis. Los resultados muestran una pequeña liberación de Fe en condiciones estomacales. La liberación es significativamente mayor en condiciones colónicas y se produce principalmente en la primera hora (figura 5).

Siguiendo el mismo protocolo, la liberación de calcio y zinc metálicos se analizó en presencia y en ausencia de nanopartículas magnéticas (Figuras 6 y 7).

EJEMPLO 3

Incorporación de metal en la superficie bacteriana

Materiales y Métodos

La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una de las técnicas más poderosas para estudiar estructuras finas superficiales. Las imágenes de MEB se registraron utilizando un microscopio electrónico de barrido Zeiss SUPRA40VP junto con un analizador de energía dispersiva de rayos X (EDX) X-Max 50mm. La EDX es una técnica analítica utilizada para el análisis elemental o caracterización química. Las muestras se recubrieron con carbono mediante el método de descarga de arco para MEB-EDX.

Resultados

Para determinar la composición elemental de la superficie de bacterias individuales, Se utilizó Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDX). La obtención de imágenes por MEB de la figura 8 muestra las bacterias después de la incubación con Ca²⁺. El espectro EDX mostró el pico K α a 3,8 eV característico de Ca, lo que representa un valor de aproximadamente 10 % en peso (figura 8b).

La obtención de imágenes por MEB de la figura 9 muestra las bacterias después de la incubación con maghemita y Ca²⁺. El espectro EDX mostró los picos K α a 6,2 eV y 3,8 eV característicos de Fe y Ca, respectivamente (figura 9b). El hierro representa un valor de aproximadamente 20 % en peso, mientras que el porcentaje de calcio es de 10 %.

EJEMPLO 4

Bacterias que contienen nanopartículas de maghemita como agentes de contraste oral por IRM

Materiales y Métodos

Las mediciones de IRM se realizaron con un sistema de tomografía Biospec 4.7T (Bruker, Karlsruhe, Alemania) que funciona a 200 MHz y que tiene un imán de 33 cm de diámetro (Oxford Ltd., UK).

Experimentos in vivo

5 En los experimentos *in vivo*, se utilizaron ratones Balb-c normales que pesaban aproximadamente 20 g. Los agentes de contraste se administraron por vía oral a diferentes dosis de Fe.

Resultados

10 La IRM (obtención de imágenes por resonancia magnética) es una de las modalidades no invasivas más poderosas para el diagnóstico de muchas enfermedades en seres humanos.

15 Se ensayó la eficacia en el contraste de las imágenes por resonancia magnética de las bacterias, una vez marcadas las nanopartículas de maghemita. Las principales ventajas del sistema son las siguientes:

1. Las bacterias sirven como soportes orales de nanopartículas de maghemita superparamagnéticas.
 2. Las bacterias no suministran nanopartículas de maghemita en el estómago y, por lo tanto, se pueden recogerse imágenes de resonancia magnética (figura 10). Para una adquisición óptima por IRM, es necesario realizar un control del nivel de saturación de las partículas en las bacterias o de la cantidad de bacterias.
 3. Las bacterias liberan las nanopartículas de maghemita a medida que aumenta el pH, por lo que el suministro de estas partículas tiene lugar durante su paso a lo largo de los intestinos (figura 11).
- 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una bacteria seleccionada de una bacteria ácido láctica y una bacteria del género *Bifidobacterium*, que comprende al menos una nanopartícula unida a su superficie, en la que la nanopartícula comprende un metal y en la que el metal está en forma de óxido.
2. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la nanopartícula es una nanopartícula magnética.
- 10 3. La bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la nanopartícula comprende un metal seleccionado del grupo que consiste en hierro, manganeso, cobalto, níquel, calcio, zinc, magnesio, potasio, cobre, cromo, selenio, silicio, yodo y combinaciones de los mismos.
4. La bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el óxido metálico es óxido de hierro.
- 15 5. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el óxido de hierro se selecciona del grupo que consiste en maghemita, magnetita, hematita, goethita y ferrihidrita.
6. La bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que adicionalmente comprende al menos un metal adicional diferente del metal comprendido en la nanopartícula.
- 20 7. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 6, en la que al menos un metal adicional se selecciona del grupo que consiste en hierro, manganeso, cobalto, níquel, calcio, zinc, magnesio, potasio, cobre, cromo, selenio, silicio, yodo y combinaciones de los mismos.
- 25 8. La bacteria de acuerdo con la reivindicación 7, en la que al menos un metal adicional se selecciona del grupo que consiste en calcio, zinc, selenio o una combinación de los mismos.
9. La bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la nanopartícula tiene un tamaño entre 2 y 50 nm.
- 30 10. La bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la bacteria ácido láctica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus bulgaricus* y la bacteria del género *Bifidobacterium* se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantum* y *Bifidobacterium animalis*.
- 35 11. Un método para obtener una bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende poner en contacto dicha bacteria con al menos dicho metal, en el que dicha puesta en contacto se realiza en presencia de al menos una sal de un catión divalente y a una temperatura en la que se reduce sustancialmente el crecimiento de dicha bacteria y a un pH en el que dicha nanopartícula tiene una carga electrostática superficial positiva.
- 40 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la nanopartícula tiene un tamaño entre 2 y 50 nm.
- 45 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, que comprende poner en contacto dicha bacteria con un primer metal comprendido en una nanopartícula a un pH en el que dicha nanopartícula tiene una carga electrostática superficial positiva, y con al menos un metal adicional, en el que el primer metal y el al menos un metal adicional son diferentes.
- 50 14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el primer metal es maghemita y es metal adicional es una combinación de calcio y zinc.
- 55 15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en el que la bacteria ácido láctica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus bulgaricus* y la bacteria del género *Bifidobacterium* se selecciona del grupo que consiste en *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium infantum* y *Bifidobacterium animalis*.
- 60 16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en el que la sal de un catión divalente se selecciona del grupo que consiste en una sal de calcio, una sal de magnesio y una combinación de las mismas.
- 65 17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la sal de un catión divalente se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, cloruro de magnesio y una combinación de los mismos.

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que la puesta en contacto entre la bacteria y el metal se realiza a una temperatura comprendida entre 0 °C y 10 °C.
- 5 19. Una bacteria que puede obtenerse por el método de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 18.
20. Un cultivo biológicamente puro o un producto alimenticio que comprende una bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una bacteria de acuerdo con la reivindicación 19, o una composición farmacéutica que comprende una bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una bacteria de acuerdo con la reivindicación 19.
- 10 21. Una bacteria seleccionada de la bacteria de las reivindicaciones 1 a 10 y la bacteria de la reivindicación 19, o un cultivo biológicamente puro de acuerdo con la reivindicación 20, para su uso en
- 15 - el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o afección asociada con una deficiencia de metal, en el que la bacteria comprende el metal que es deficiente en dicha enfermedad o afección y en el que la bacteria o el cultivo se administra por vía oral o
- en el tratamiento del cáncer, en el que el metal está comprendido en una nanopartícula magnética.
- 20 22. La bacteria, o el cultivo biológicamente puro de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que
- 25 - la enfermedad o afección asociada con una deficiencia de metal se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad o afección asociada con deficiencia de hierro, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de manganeso, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de cobalto, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de níquel, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de calcio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de zinc, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de magnesio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de potasio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de cobre, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de cromo, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de selenio, una enfermedad o afección asociada con deficiencia de silicio y una enfermedad o afección asociada con deficiencia de yodo o
- 30 - el cáncer es un cáncer gastrointestinal.
- 35 23. Un agente de contraste que comprende una bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la bacteria de acuerdo con la reivindicación 19 o un cultivo biológicamente puro de acuerdo con la reivindicación 20.
- 40 24. Bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o bacteria de acuerdo con la reivindicación 19 o cultivo biológicamente puro de acuerdo con la reivindicación 20, para su uso como agente de contraste en la obtención de imágenes médicas por resonancia magnética, en el que el metal está comprendido en una nanopartícula magnética.
- 45 25. Bacteria o cultivo biológicamente puro para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que la bacteria o el cultivo se administra por vía oral o intravenosa.
26. Bacteria o cultivo biológicamente puro para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25, en el que el uso es la obtención de imágenes por resonancia magnética del tubo digestivo.
- 50 27. Bacteria o cultivo biológicamente puro para su uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que la obtención de imágenes por resonancia magnética del tubo digestivo de un sujeto comprende:
- (i) administrar por vía oral a dicho sujeto, una bacteria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una bacteria de acuerdo con la reivindicación 19, o un cultivo biológicamente puro de acuerdo con la reivindicación 20, o un agente de contraste de acuerdo con la reivindicación 23,
- (ii) detectar las nanopartículas metálicas en el tubo digestivo del sujeto.
- 55 28. Bacteria o cultivo biológicamente puro para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la detección de las nanopartículas en el tubo digestivo del sujeto se realiza entre 1 y 5 horas después de la administración oral, obteniendo así imágenes del estómago, o entre 6 y 24 horas después de la administración oral, obteniendo así imágenes del intestino.

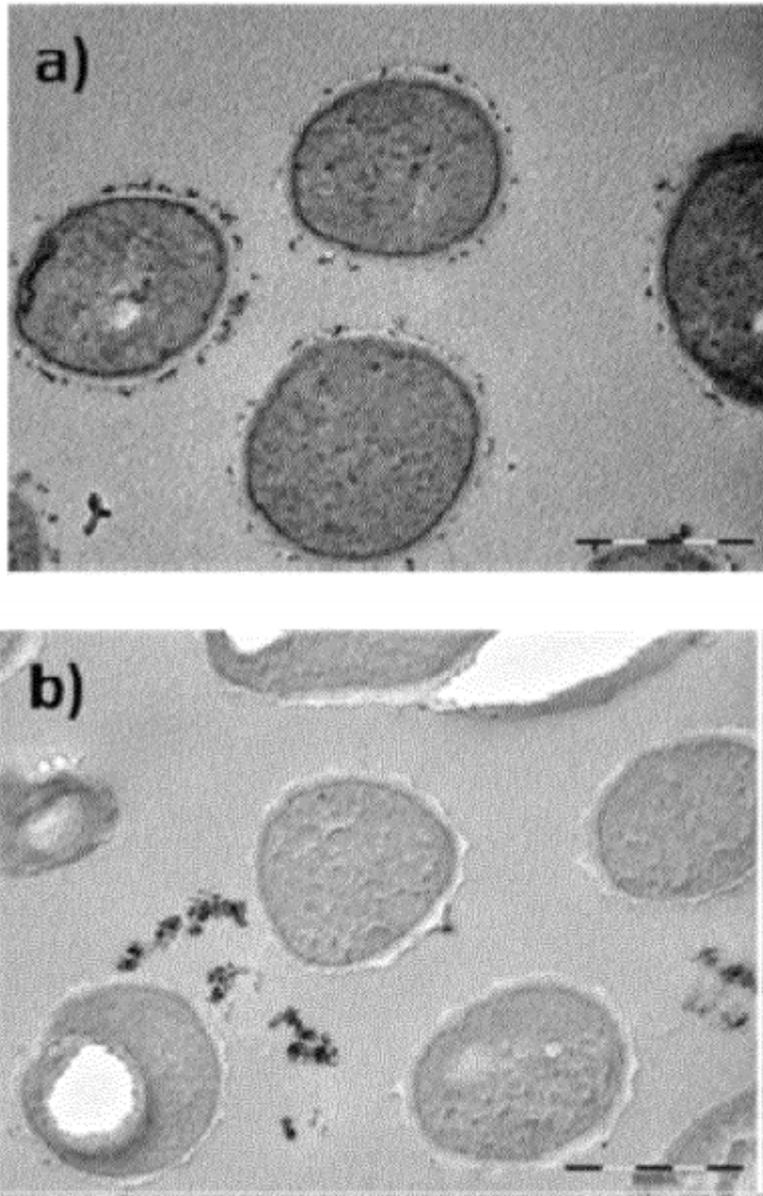


FIG. 1

c)

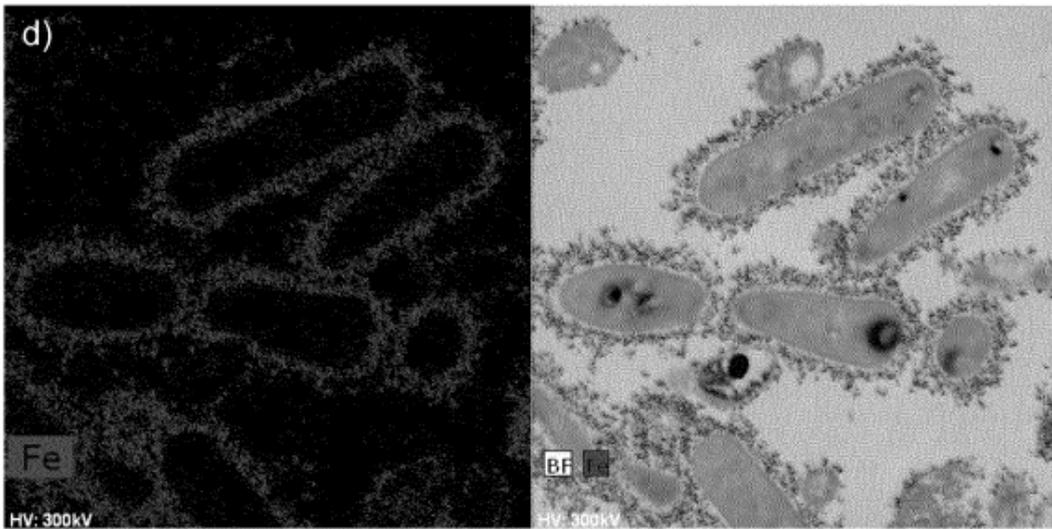
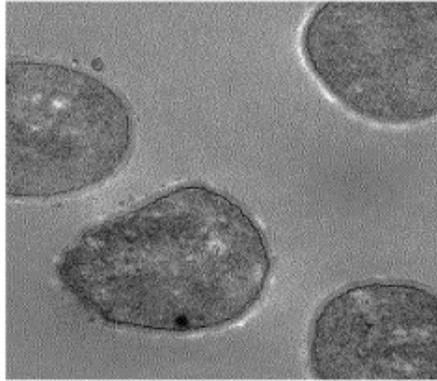


FIG. 1 (cont.)

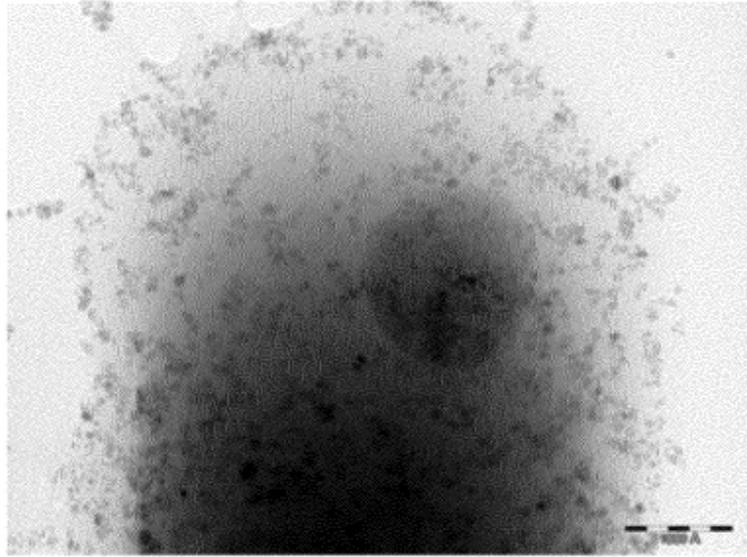


FIG. 2

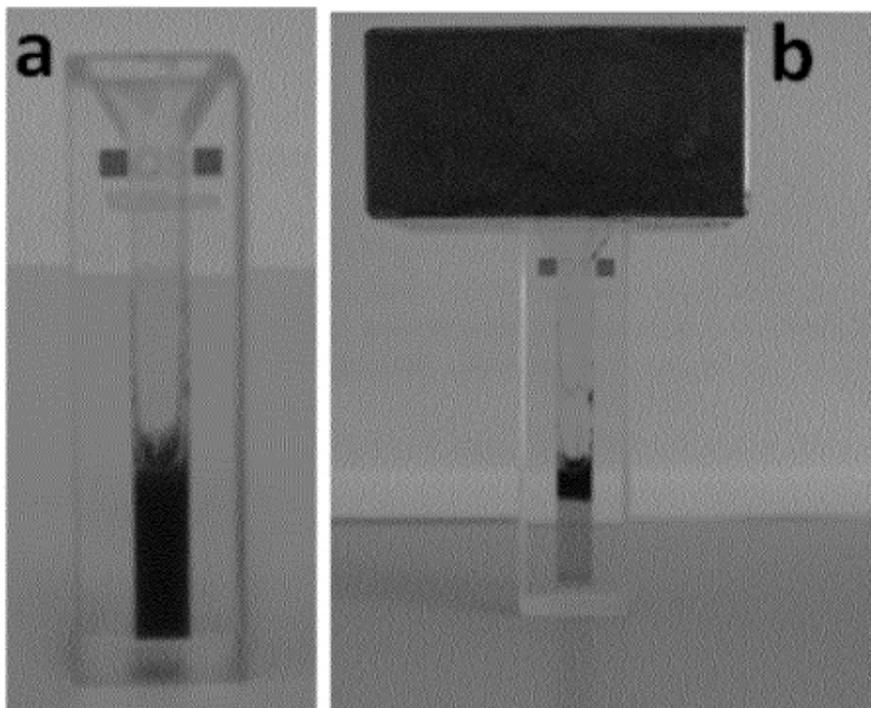


FIG. 3

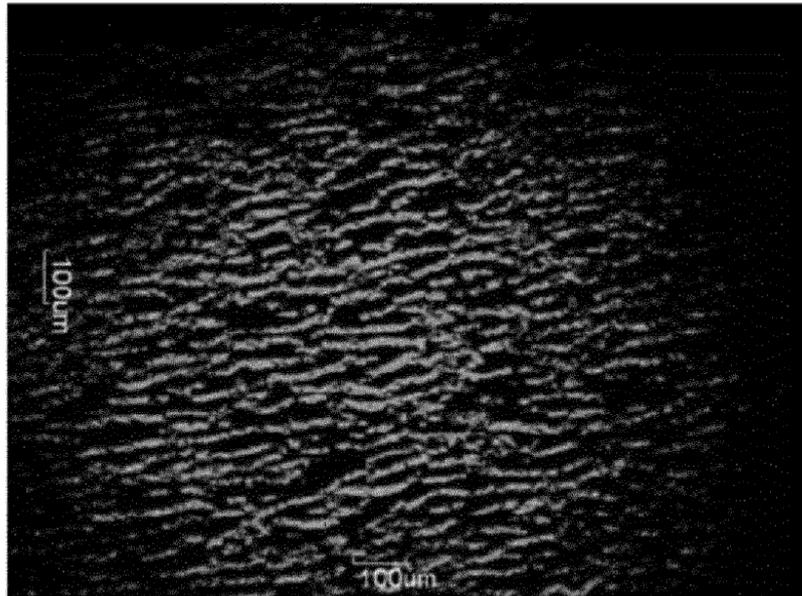


FIG. 4

% de eliminación de hierro

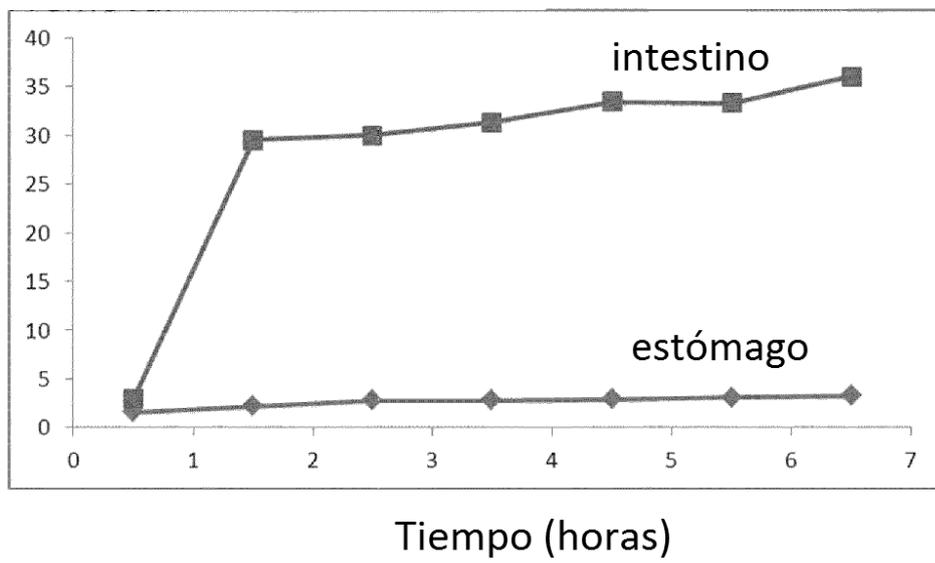


FIG. 5

% de liberación de Ca

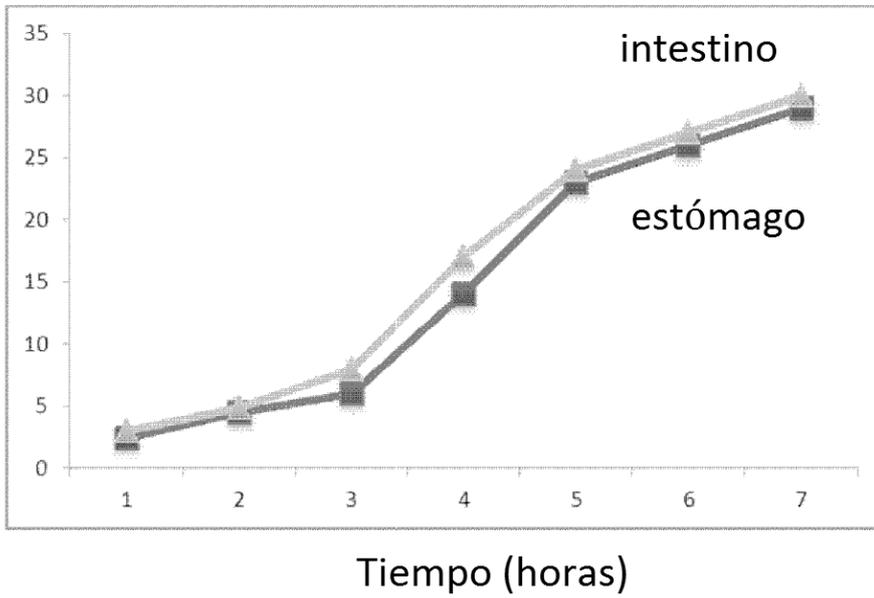


FIG. 6.

% de liberación de Zn

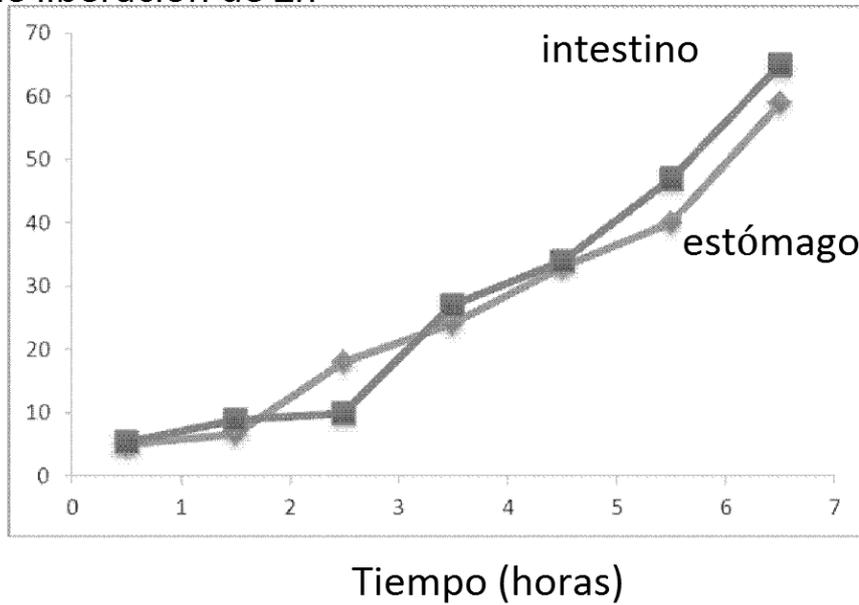
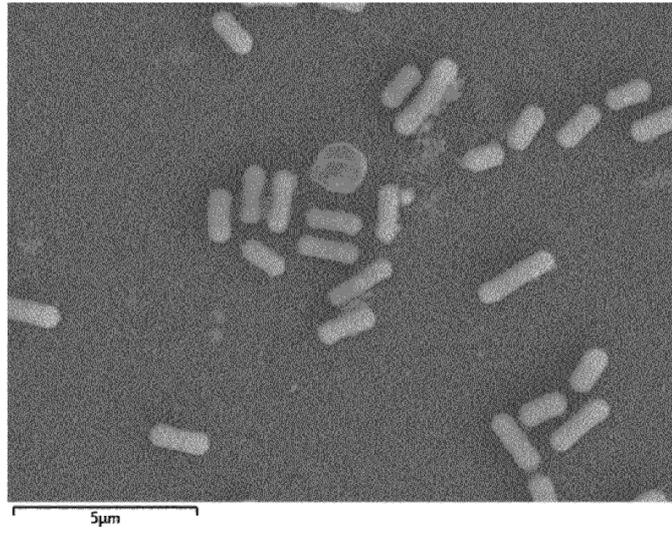


FIG. 7

A



B

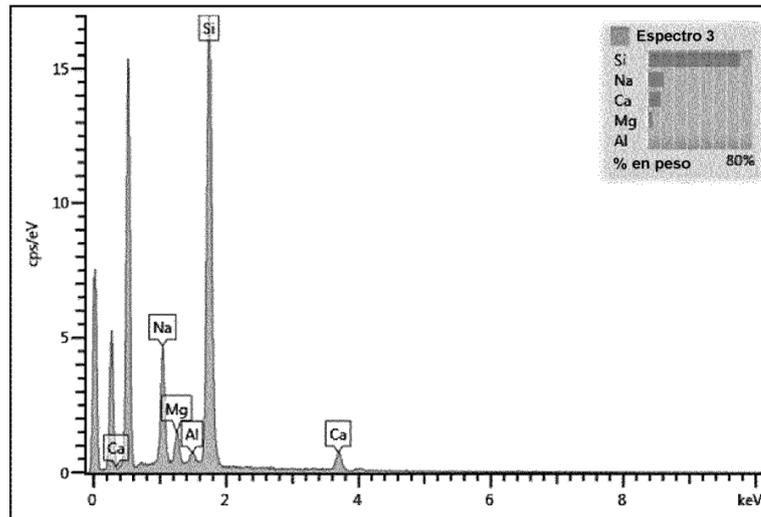
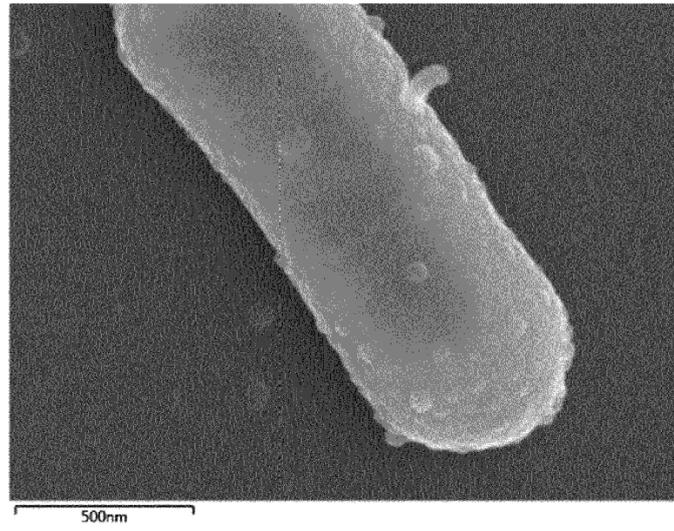


FIG. 8

A



B

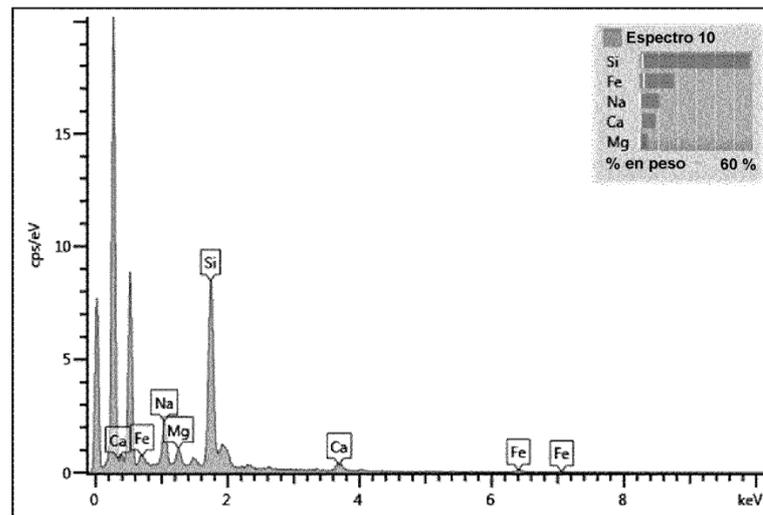


FIG. 9

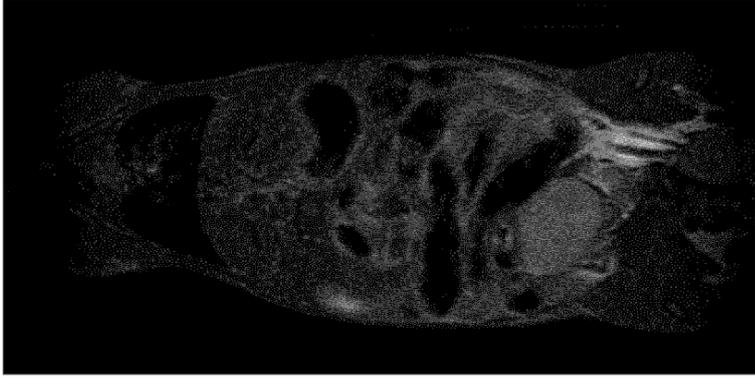


FIG. 11

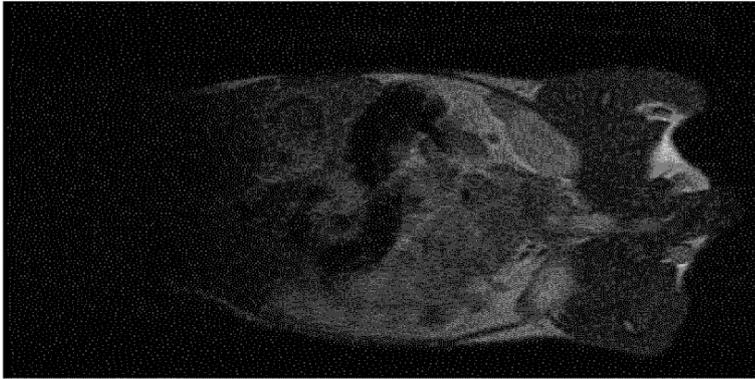


FIG. 10