



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 291 896**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04742461 .9**  
86 Fecha de presentación : **08.04.2004**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1615656**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

54 Título: **Producto inmunomodulador obtenido a partir de un cultivo de *Bifidobacterium* y composiciones que lo contienen.**

30 Prioridad: **16.04.2003 FR 03 04746**  
**26.03.2004 FR 04 03158**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2008**

73 Titular/es: **COMPAGNIE GERVAIS DANONE**  
**17 boulevard Haussmann**  
**75009 Paris, FR**

72 Inventor/es: **Petay, Valérie;**  
**Lecroix, Francis;**  
**Perrin, Emmanuel;**  
**Gontier, Charles;**  
**Blareau, Jean-Pierre;**  
**Romond, Marie-Bénédicte;**  
**Singer, Elisabeth;**  
**Odou, Marie-Françoise y**  
**Demilly-Mullie, Catherine**

74 Agente: **Esteban Pérez-Serrano, María Isabel**

ES 2 291 896 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

Producto inmunomodulador obtenido a partir de un cultivo de *Bifidobacterium* y composiciones que lo contienen.

5 La presente invención se refiere a un producto inmunomodulador obtenido a partir de un cultivo de *Bifidobacterium*, a su utilización, particularmente como medicamento o como ingrediente alimentario, así como a composiciones farmacéuticas o alimentarias que lo contiene.

10 El género *Bifidobacterium* forma parte de la familia de los *Actinomycetaceae*, reúne a bacilos Gram positivos, anaerobios estrictos, que fermentan glucosa por la vía de la fructosa 6-fosfato fosfoacetolasa. Su pH óptimo de crecimiento está comprendido entre 6 y 7 y su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 37 y 46°C.

15 Las bifidobacterias forman parte de la flora intestinal humana normal y se les reconocen numerosos efectos beneficiosos para la salud. Se sabe particularmente que los lactantes a los que se da el pecho, que poseen una flora intestinal en la que predominan las bifidobacterias resisten mejor a las infecciones y presentan particularmente un riesgo de diarrea más reducido que los lactantes alimentados con preparaciones lácteas industriales convencionales.

20 El papel de las bifidobacterias en esta resistencia aumentada contra infecciones no se ha determinado completamente. Diferentes estudios indican que poseen un poder inmunomodulador que implicaría sustancias a base de polisacáridos asociadas a la pared bacteriana, o secretadas por las bacterias durante la fermentación anaerobia. Gomez *et al.*, (FEMS Microbiol. Lett., 1988, 56, 47-52) describen el efecto inmunomodulador de las fracciones exocelulares ricas en polisacáridos producidas por *Bifidobacterium adolescentis*; la solicitud de patente FR 2 652 590 describe un exopolímero inmunopotenciador de naturaleza polisacáridica producido por una cepa del continuum *Bifidobacterium infantis longum*; Honoso *et al.*, (Biosci. Biotech. Biochem., 1997, 61, 312-316 y Bioscience Microflora, 1998, 17, 97-104) describen polisacáridos inmunopotenciadores producidos por diferentes especies de *Bifidobacterium*. La acción inmunomoduladora de las bacterias se manifiesta mediante la regulación de la microflora intestinal en particular en detrimento del desarrollo de especies bacterianas patógenas. Romond *et al.* (Anaerobe, 1997, 3, 137-143 y J. Dairy Sci., 1998, 81, 1229-1235) describen por lo tanto fracciones ricas en glicoproteínas, producidas por *Bifidobacterium breve* en condiciones de fermentación anaerobia, e inducen *in vivo* un efecto regulador de la microflora intestinal.

30 Por lo tanto en el mercado se encuentran numerosos productos fermentados por bifidobacterias, opcionalmente asociadas a otras bacterias lácticas y cuya ingestión permite beneficiarse de dichos efectos inmunomoduladores de las bifidobacterias y de sus productos de fermentación.

35 Sin embargo, y en el caso particular de la alimentación infantil, estos presentan el inconveniente de ser muy ácidos y presentar particularmente en el caso de productos en polvo, un aspecto no homogéneo después de la reconstitución, debido a la coagulación de proteínas de la leche por la acidez generada durante la fermentación. Por lo tanto, a veces son mal aceptados por el niño y la madre.

40 Para remediar estos inconvenientes se ha propuesto ya en la solicitud internacional WO 01/01785, un procedimiento de preparación de un producto lácteo inmunoestimulador por bioconversión, sin fermentación y por lo tanto sin acidificación del producto final, de un sustrato lácteo con ayuda de bifidobacterias y en particular de la cepa *Bifidobacterium breve*, depositada según el tratado de Budapest el 31 de mayo de 1999, con el número I-2219 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos) que posee el Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, en París.

45 Sin embargo, el procedimiento de preparación descrito en esta solicitud internacional no permite preparar productos alimentarios diferentes de productos lácteos y necesita condiciones de puesta en práctica exigentes desde el punto de vista industrial, particularmente el mantenimiento de condiciones de cultivo aerobias, el mantenimiento del medio de cultivo a una presión osmótica correspondiente a de 0,93 a 0,97 de actividad de agua (AW) y/o el mantenimiento del medio de cultivo a una temperatura comprendida entre 40 y 48°C.

50 Por otro lado, las bacterias del género *Bacteroides fragilis* representan aproximadamente del 30 al 50% de la flora presente en las materias fecales del ser humano. Su ubicación es mayoritariamente a nivel del colon (10<sup>11</sup> bacterias por gramo de excrementos). Sin embargo, en caso de proliferación anormal, las bacterias del género *Bacteroides fragilis* son responsables del 80% de las infecciones bacterianas anaerobias y son cada vez más frecuentes debido a su resistencia creciente a los tratamientos con antibióticos. Su proliferación anormal en el organismo puede conllevar:

- 60 - la formación de abscesos (abdominal, del cerebro, del hígado, de la pelvis, del pulmón, del bazo),
- septicemia,
- diarreas, principalmente en niños pequeños,
- 65 - endocarditis,
- peritonitis,

- neumonías, particularmente necrotizantes.

Se ha informado de una tasa de mortalidad del 60% en caso de falta de tratamiento de las infecciones por *Bacteroides fragilis*.

5

Por lo tanto puede ser interesante poder disponer de un producto que permita controlar la proliferación de *Bacteroides fragilis*.

10

Por lo tanto, para remediar el conjunto de los inconvenientes que presentan los productos descritos en la técnica anterior y para proporcionar un producto inmunomodulador que pueda incorporarse en cualquier tipo de producto alimentario o utilizarse para la preparación de composiciones farmacéuticas inmunomoduladoras, los inventores han puesto a punto el objeto de la invención.

15

Los inventores han tomado también como objetivo proporcionar una composición alimentaria o farmacéutica que tenga un efecto regulador de la microflora intestinal, en particular en detrimento del desarrollo de especies bacterianas patógenas, particularmente *Bacteroides fragilis*.

20

La presente invención se refiere por lo tanto en primer lugar a un producto inmunomodulador caracterizado porque se obtiene de acuerdo con un procedimiento de preparación que comprende las siguientes etapas:

25

- siembra e incubación en condiciones aerobias o anaerobias, preferiblemente anaerobias, y a una temperatura comprendida entre 30 y 40°C aproximadamente, de *Bifidobacterium* que comprende al menos la cepa *Bifidobacterium breve* I-2219 en un sustrato acuoso que presenta un pH comprendido entre aproximadamente 6 y 8, y que comprende al menos los siguientes ingredientes:

30

i) permeado de lactosuero.

ii) un hidrolizado de proteínas de lactosuero.

iii) lactosa,

35

- eliminación de los *Bifidobacterium* del sustrato acuoso;

- ultrafiltración del sustrato acuoso en membranas de filtración que tengan un umbral de corte comprendido entre 100 y 300 kDa para obtener un retentado concentrado,

40

- deshidratación del retentado concentrado, preferiblemente por liofilización;

- disolución del retentado deshidratado en un tampón;

- cromatografía de exclusión en gel en una columna que presenta un umbral de exclusión de 600 kDa de la solución del retentado;

45

- recuperación de la fracción excluida después de la cromatografía que constituye el producto inmunomodulador.

La fracción excluida obtenida empleando el procedimiento de acuerdo con la invención presenta propiedades inmunomoduladoras; en particular permite estimular la proliferación de *Bifidobacterium* y disminuir la población de *Bacteroides fragilis* en la flora intestinal.

50

De acuerdo con la invención, el permeado de lactosuero que entra en la composición del sustrato acuoso puede presentarse en forma de polvo, obtenido por ultrafiltración de lactosuero, después del secado (por pulverización o por cualquier otra técnica de secado) de la fracción líquida, desmineralizada o no, que atraviesa la membrana durante la ultrafiltración del lactosuero.

55

Los hidrolizados de proteínas de lactosuero utilizables en el marco de la presente invención pueden obtenerse mediante métodos utilizados habitualmente para la preparación de hidrolizados de proteínas, particularmente hidrólisis enzimática de proteínas de lactosuero con ayuda de proteasas, tales como tripsina, quimiotripsina, etc. Se conocen y están disponibles en el mercado numerosos concentrados o aislados de proteínas del suero al igual que los hidrolizados de proteínas de lactosuero, adecuados para la puesta en práctica de la invención.

60

Antes de su utilización, el sustrato acuoso se filtra preferiblemente en membranas, tales como por ejemplo polietilensulfona que tienen un umbral de corte comprendido entre 100 y 300 kDa y después el permeado se esteriliza en un autoclave a una temperatura de aproximadamente 120°C durante aproximadamente 30 minutos para evitar cualquier contaminación bacteriana indeseable del medio de cultivo.

65

Antes del empleo, el pH del sustrato acuoso puede ajustarse al valor deseado con ayuda de cualquier agente alcalinizante utilizado de forma convencional por el especialista en la técnica, tal como por ejemplo sosa o postasa.

## ES 2 291 896 T3

Los *Bifidobacterium* se siembran, preferiblemente, en el sustrato acuoso a razón de  $1 \cdot 10^4$  a  $4 \cdot 10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de sustrato. Esta siembra puede realizarse por ejemplo por adición al sustrato acuoso, en proporciones adecuadas, de un concentrado congelado de *Bifidobacterium* o de un precultivo en un medio que permita el crecimiento de bifidobacterias.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el pH del sustrato acuoso se mantiene a un valor comprendido entre aproximadamente 6 y 8 durante todo el periodo de incubación y aún más preferiblemente entre 6,5 y 7,5. El mantenimiento del pH se realiza preferiblemente mediante una neutralización continua del sustrato acuoso con ayuda de un agente alcalinizante tal como se ha descrito anteriormente o con una solución de amoníaco diluido (preferiblemente a la mitad).

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la temperatura del sustrato se mantiene a un valor comprendido entre aproximadamente 37 y 40°C durante todo el periodo de incubación, estando esta generalmente comprendida entre 10 y 20 horas.

De acuerdo con una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, los ingredientes del sustrato acuoso están presentes en las siguientes cantidades:

- i) permeado de lactosuero: de aproximadamente 3 a 80 g, y aún más preferiblemente de aproximadamente de 40 a 60 g,
- ii) hidrolizado de proteínas de lactosuero: de aproximadamente 2 a 80 g y aún más preferiblemente de aproximadamente 5 a 15 g,
- iii) lactosa: de aproximadamente 5 a 50 g, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 a 30 g,

estando dadas estas cantidades por litro de sustrato acuoso.

De acuerdo con una realización particular de la invención, el sustrato puede comprender además al menos un ingrediente adicional seleccionado entre extractos de levadura, sales tamponantes y clorhidrato de cisteína.

Cuando el sustrato acuoso comprende una sal tamponante, ésta se selecciona preferiblemente entre dihidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de potasio y representa preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 5 g y aún más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a 3 g por litro de sustrato acuoso.

Cuando el sustrato acuoso comprende un extracto de levadura, éste representa preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 5 g y aún más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a 3 g por litro de sustrato acuoso.

Cuando el sustrato acuoso comprende clorhidrato de cisteína, éste representa preferiblemente de aproximadamente 100 a 500 mg y aún más preferiblemente de aproximadamente 200 a 400 mg por litro de sustrato acuoso.

Al finalizar el periodo de incubación, la eliminación de los *Bifidobacterium* del medio de cultivo puede realizarse por ejemplo mediante microfiltración o mediante centrifugado del sustrato acuoso. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la eliminación de los *Bifidobacterium* del medio de cultivo se realiza por centrifugado del sustrato acuoso, por ejemplo a una velocidad de 3000 g durante aproximadamente 1 hora.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, el procedimiento comprende además, después de la etapa de eliminación de los *Bifidobacterium*, una etapa suplementaria de destrucción de las actividades enzimáticas residuales contenidas en el sustrato acuoso después de la incubación, por ejemplo por un tratamiento térmico de éste a una temperatura de aproximadamente 75°C durante aproximadamente 3 minutos.

La etapa de ultrafiltración del sustrato acuoso se realiza preferiblemente en membranas de polietersulfona, a una temperatura inferior a aproximadamente 60°C.

Al finalizar la etapa de ultrafiltración, el retentado concentrado obtenido de este modo se lava preferiblemente varias veces, por ejemplo con agua permutada antes de reconcentrarse finalmente, antes de deshidratarse por ejemplo por liofilización.

El tampón utilizado para la disolución del retentado deshidratado se selecciona preferiblemente entre tampones que presentan un pH comprendido entre 6 y 8 tales como el tampón Tris ajustado al pH deseado mediante adición de ácido clorhídrico.

La naturaleza de los geles utilizables para realizar la cromatografía de exclusión no es crítica, dado que estos presentan un umbral de exclusión de 600 kDa. Como gel pueden utilizarse particularmente los geles compuestos por dextrano y agarosa reticulada tales como el producto comercializado con la denominación comercial Superdex® 200 por la compañía Amersham Biosciences.

## ES 2 291 896 T3

Cuando se termina la cromatografía, la fracción excluida recuperada puede dializarse a continuación contra agua destilada y después diluirse opcionalmente para volver a la concentración inicial de la fracción excluida.

5 Finalmente, la fracción excluida que constituye el producto inmunomodulador puede utilizarse directamente o puede congelarse o liofilizarse para su conservación y posterior utilización.

Esta fracción excluida está compuesta esencialmente por un complejo de polisacáridos y proteínas en el que la fracción glucídica representa aproximadamente del 5 al 30% en peso, la fracción proteica representa aproximadamente del 70 al 95% en peso con respecto al peso total de dicho complejo.

10 De acuerdo con la invención, la fracción glucídica de la fracción excluida presenta la siguiente composición de monosacáridos (expresada en proporciones molares con respecto a ramnosa): galactosa: 5,5 a 8; manosa: 0,8 a 1,3; glucosa: 2,5 a 5; N-acetilgalactosamina: 0,3 a 1; N-acetilglucosamina: 0,07 a 0,3; ácido neuramínico 0 a 0,15 y ramnosa: 1.

15 De acuerdo con la invención la fracción proteica de la fracción excluida puede comprender al menos un péptido, obtenido mediante hidrólisis con tripsina, que responde al menos a una de las siguientes secuencias:

- 20 - RELGIGTPSFLHNGGQWYIYA (SEC ID N° 1)
- RVLNPGQYXYVR (SEC ID N° 2)
- EQATANGQVSSGQSTGGS AAP (SEC ID N° 3)

25 La invención también se refiere al producto inmunomodulador obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente como medicamento y en particular como medicamento inmunomodulador.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica caracterizada porque contiene, como principio activo, al menos un producto inmunomodulador obtenido de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable.

30 Por farmacéuticamente aceptable se entiende cualquier soporte que mientras conserva las propiedades del producto inmunomodulador obtenido según el procedimiento de acuerdo con la invención, particularmente sus propiedades inmunomoduladoras, permiten transportar dicho producto.

35 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención, puede presentarse en cualquier forma galénica deseada para una administración por vía oral al ser humano o a un animal, como por ejemplo en forma líquida para un jarabe o una solución, una pulverización, o en forma sólida como por ejemplo un polvo, un comprimido, una gragea, una cápsula, un polvo pulverizado, en sus diversas formas, de liberación inmediata o programada, una goma, una pasta, 40 gránulos o en cualquier otra forma adaptada para la administración por vía oral.

El producto inmunomodulador obtenido según el procedimiento de acuerdo con la invención también puede incorporarse, como ingrediente, en composiciones alimentarias.

45 Por consiguiente, la invención también se refiere a una composición alimentaria caracterizada porque contiene, como ingrediente, al menos un producto inmunomodulador obtenido según el procedimiento de acuerdo con la invención.

50 Dichas composiciones alimentarias, pueden destinarse a alimentación humana o animal y pueden presentarse particularmente en forma de preparación láctea o no, fermentada o no, de origen animal o vegetal, comprendiendo particularmente fórmulas infantiles o para adultos y ancianos y en particular en forma de una preparación láctea infantil, de leche líquida o en polvo, de productos frescos, de cereales, de galletas (relleno), de pequeñas copas, de postres, etc., o también en forma de productos alimentario o dietéticos para adultos, entre los cuales productos de hospitalización o complementos nutricionales.

55 La presente invención se entenderá mejor con ayuda del siguiente complemento de descripción, que se refiere a ejemplos de preparación del producto inmunomodulador de acuerdo con la invención, así como a las figuras adjuntas en las que:

60 - la figura 1 representa el cromatograma obtenido después de la inyección en una columna forrada con un gel Superdex<sup>®</sup> 200, de un medio de cultivo fermentado durante 15 horas por la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 (absorbancia en milivoltios en función del tiempo transcurrido en minutos);

65 - la figura 2 compara los cromatogramas obtenidos después de la inyección en una columna forrada con un gel Superdex<sup>®</sup> 200, de un medio de cultivo fermentado por la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 o por la cepa *B. breve* CFPL (Colección de la Facultad de Farmacia de Lille) C7 (absorbancia en milivoltios en función del tiempo transcurrido en minutos);

## ES 2 291 896 T3

- la figura 3 representa una ampliación de la figura 2.

### Ejemplo 1

#### 5 *Preparación de un producto inmunomodulador obtenido por cultivo de Bifidobacterium*

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

5 - 50 g/l de permeado de lactosuero,

10 - 10 g/l de hidrolizado de proteínas de lactosuero,

- 20 g/l de lactosa,

15 - 2 g/l de extracto de levadura,

- 2,5 g/l de hidrogenofosfato de potasio,

20 - 0,3 g/l de clorhidrato de cisteína.

El medio de cultivo se ultrafiltra en casetes Centramate® comercializadas por la compañía PALL, equipadas con membranas de polietersulfona que tienen un umbral de corte de 200 kDa y el permeado se esteriliza en un autoclave durante 30 minutos a 120°C. El pH del medio de cultivo se ajusta entonces a un valor de 6,5 con ayuda de una solución de amoníaco diluido a un cuarto.

25 El medio de cultivo se siembra a continuación con las bifidobacterias a razón de 6‰ (v/v) de un concentrado congelado de la cepa de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 que contienen  $5 \cdot 10^{10}$  UFC de bifidobacterias por ml de concentrado congelado. La población inicial de bacterias es de  $3 \cdot 10^8$  UFC de bifidobacterias por ml de medio de cultivo. Las bifidobacterias se cultivan en anaerobiosis a una temperatura comprendida entre 37 y 40°C. Durante el  
30 cultivo, el pH del medio de cultivo se regula a 6,5 por medio de una solución de amoníaco diluido a un cuarto. El tiempo de cultivo es de 15 horas y la población de *Bifidobacterium* al finalizar el cultivo es de aproximadamente  $2 \cdot 10^7$  UFC por ml de medio de cultivo.

35 Al finalizar el cultivo, las bacterias se eliminan del medio de cultivo fermentado mediante un centrifugado de 1 hora a 3000 g. Las actividades enzimáticas residuales contenidas en el sobrenadante del centrifugado se destruyen mediante un tratamiento térmico de 3 minutos a 75°C.

40 El sobrenadante se ultrafiltra en casetes Centramate® comercializadas por la compañía PALL, equipadas con membranas de polietersulfona que tienen un umbral de corte de 300 kDa a una temperatura de aproximadamente 40°C. De este modo, se concentra 3 veces y después se lava 3 veces con agua permutada. Durante el último lavado, se realiza una concentración de 7 veces de la parte retenida por la membrana. De este modo se obtiene un concentrado llamado retentado. El retentado se deshidrata por liofilización y después se vuelve a colocar en un tampón Tris-NaCl a pH 8.

#### 45 1) *Estudio de la composición del retentado obtenido*

La composición del retentado se estudia mediante cromatografía de exclusión.

50 Para realizar esto, se inyectan 25  $\mu$ l de retentado a un caudal de 0,6 ml por minuto en una columna de gel Superdex®200 comercializada por la compañía Amersham Biosciences y que presenta un umbral de exclusión de 600 kDa, acoplada a un detector UV con un medidor de diodos (200-300 nm). La integración de la señal se realiza con ayuda del programa KromaSystem® 2000 comercializado por la compañía Kontron Instruments. De este modo se separan dos fracciones: una fracción excluida del gel se eluye después de 12,5 minutos a partir de la inyección y una fracción filtrada se eluye de 12 a 32 minutos a partir de la inyección.

55 Los resultados obtenidos en el retentado después de 15 horas de fermentación se representan en la figura 1 adjunta que representa la absorbancia (en milivoltios) en función del tiempo transcurrido (en minutos) después de la inyección del retentado en la columna. Estos resultados representan un cromatograma típico que muestra la fracción excluida y la fracción filtrada del retentado analizado de este modo.

60 Las figuras 2 y 3 representan cromatogramas obtenidos después del análisis de un retentado obtenido a partir de un cultivo realizado como se ha descrito anteriormente y de un retentado obtenido a partir de un cultivo realizado en las mismas condiciones pero con una cepa diferente de bifidobacterias (*B. breve* CFPL C7).

65 La figura 2 representa la absorbancia (en milivoltios) en función del tiempo transcurrido (en minutos) después de la inyección en la columna de los retentados correspondientes a dos cultivos realizados respectivamente con la cepa *B. breve* CNCM I-2219 y con la cepa *B. breve* CFPL C7. Estos resultados demuestran que, al contrario que el retentado del cultivo realizado con la cepa *B. breve* CNCM I-2219, el cromatograma del retentado del cultivo realizado con la cepa *B. breve* CFPL C7 no presenta ningún pico correspondiente a la fracción excluida ni a la fracción filtrada del

## ES 2 291 896 T3

retentado. Por el contrario, la figura 3 que representa una ampliación de la figura 2, muestra que es necesario aumentar considerablemente la escala de absorbancia de la figura 2 para hacer aparecer la fracción excluida y la fracción filtrada del retentado correspondiente al cultivo realizado con la cepa *B. breve* CFPL C7. Estos resultados demuestran de esta manera que la cepa *B. breve* CFPL C7 no presenta el potencial de producción de principios activos que presenta la cepa *B. breve* CNCM I-2219.

### 2) Preparación de la fracción excluida del retentado

El retentado concentrado, que se ha vuelto a colocar previamente en un tampón Tris-NaCl a pH 8, se somete a una cromatografía preparativa. La separación se realiza por cromatografía en columna de gel Superdex® 200 comercializado por la compañía Amersham Biosciences de 50 mm de diámetro y 100 cm de altura, alimentado con un caudal de 5 ml por minuto y que presenta un umbral de exclusión de 600 kDa. Las fracciones se recogen en 10 ml y su absorbancia se mide a 280 nanómetros.

De este modo se separan dos fracciones:

- una fracción excluida del gel de peso molecular superior a 600 kDa (tiempo de retención de 130 a 180 minutos +/- el 10%),

- una fracción filtrada de peso molecular comprendido entre 200 y 600 kDa (tiempo de retención de 187 a 370 minutos +/- el 10%).

La fracción excluida o parte activa se dializa contra agua destilada y después se diluye para volver a la concentración del retentado. Esta fracción puede conservarse a continuación en forma congelada o liofilizada. La fracción filtrada también puede conservarse de la misma manera.

### Ejemplo 2

*Análisis de la composición glucídica y proteica de la parte activa (fracción excluida) preparada a partir de un cultivo de Bifidobacterium*

#### 1) Análisis de la composición glucídica de la parte activa

El polvo liofilizado de fracción excluida, tal como se ha preparado anteriormente en el ejemplo 1 (10 mg), se recoge con hidrazina anhidra pura (200-300 µl). La mezcla se incuba durante una noche a 110°C, se seca en flujo de nitrógeno y se recoge en 1 ml de agua. A continuación la solución se fracciona mediante permeación en gel en columna Fractogel TSK comercializada con la referencia HW40 por la compañía Merck y la elución se realiza en agua. La presencia de azúcares en las diferentes fracciones recogidas se busca mediante el método del orcinol y mediante cromatografía en capa fina. Los resultados obtenidos (que no se representan) muestran que la mayoría de los azúcares están en la fracción no retenida en el gel (> 10 kDa) y migra muy poco después de la cromatografía en capa fina. La parte glucídica de la fracción excluida constituye por lo tanto un polisacárido de masa molar superior a 10 kDa. La parte glucídica de la fracción excluida representa aproximadamente del 15 al 20% en masa de ésta.

La composición molar de la fracción de la fracción glucídica de la parte activa se determina por cromatografía en fase gaseosa, después se metanoliza con ayuda de una mezcla de ácido clorhídrico 0,5M y metanol durante 24 horas a 80°C.

Se analizan dos muestras de la fracción excluida (muestras 1 y 2 CNCM I-2219: respectivamente M1 y M2) que proceden de dos ensayos diferentes realizados de acuerdo con el ejemplo 1.

Como comparación, se han realizado los mismos análisis sobre una muestra en la que la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 se ha sustituido con la cepa *Bifidobacterium breve* CFPL C7 (muestra C7) cultivada en las mismas condiciones, así como en una muestra en la que la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 se ha cultivado en un medio de lactosa no de acuerdo con la invención (muestra de medio de lactosa; ML) de la siguiente composición:

- 60 g/l de lactosa;

- 2 g/l de extracto de levadura;

- 0,3 g/l de clorhidrato de cisteína.

Siendo las siguientes etapas de extracción y de purificación comparables en todo momento a las descritas anteriormente.

Las proporciones molares de monosacáridos dados (expresados con respecto a la ramnosa) obtenidos para la fracción excluida de estas diferentes muestras se reúnen en la Tabla 1 a continuación:

TABLA I

	M1	M2	C7*	ML*
Galactosa	6,50	7,60	2,00	3,80
Manosa	0,92	1,10	2,70	6,20
Glucosa	3,20	4,30	3,50	2,70
N-acetil galactosamina	0,80	0,47	1,00	0,10
N-acetil glucosamina	0,17	0,10	0,38	0,10
Ácido neuramínico	0,08	-	0,49	-
Ramnosa	1,00	1,00	0	1,00

\*: muestra comparativa que no forma parte de la invención.

Puede observarse la ausencia de ramnosa en la muestra C7 en la que la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 se ha sustituido con la cepa *Bifidobacterium breve* CFPL C7. También puede constatarse que la distribución de los azúcares entre las muestras M1 y M2 es diferente a la de la muestra ML que corresponde a la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 cultivada en un medio con lactosa no de acuerdo con la invención. En particular, las muestras M1 y M2 contienen más galactosa y N-acetilgalactosamina que la muestra ML y menos manosa que la muestra ML.

## 2) Análisis de la composición proteica de la parte activa

La fracción proteica de la parte activa representa aproximadamente del 80 al 85% en masa de esta última.

La secuenciación de la parte proteica de la parte activa se realiza después de una etapa de proteólisis con ayuda de una solución de tripsina al 1% en un tampón Tris 0,1 M a pH 8,5, como se describe en el artículo Rosenfeld J. *et al.*, Analytical Biochemistry, 1992, 203, 173-179.

Los péptidos se purifican con HPLC de fase inversa en una columna Ultrasphere® ODS (octadecilsilano) de un diámetro de 2 mm y una longitud de 200 mm comercializada por la compañía Beckmann. La elución se realiza con un gradiente lineal de acetonitrilo en una solución de ácido trifluoroacético al 0,1%.

Los péptidos aislados se secuencian (de acuerdo con el método descrito en el artículo de Rosenfeld J. *et al.*, mencionado anteriormente) en un aparato de referencia Procise 492 comercializado por la compañía Perkin-Elmer.

A continuación se comparan las secuencias a las contenidas en las siguientes bases de datos: GenBank CDS translation, PDB (*Protein Data Bank*), SwissProt, PIR (*Protein Information Resource*), PRF (*Protein Research Foundation*), utilizando el programa BLAST 2.2 (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*).

Este análisis ha permitido demostrar que la fracción proteica de la parte activa está constituida principalmente por péptidos del medio lácteo (lactoferrina, beta-lactoglobulina, albúmina del suero), que por un lado presenta una buena homología (mínimo del 60%) con una secuencia de proteínas de *Bifidobacterium longum* (RELGIGTPSFLHNGGQW-YIYA (SEC ID N° 1) y de la que, por otro lado, no se ha podido determinar homología significativa con secuencias conocidas y que poseen las siguientes secuencias:

- RVLNPGQYXYVR (SEC ID N° 2)

- EQATANGQVSSGQQSTGGSAAAP (SEC ID N° 3).

## ES 2 291 896 T3

### Ejemplo 3

#### *Estudio de la actividad inmunomoduladora de la fracción excluida del retentado*

##### 5 1) Efecto de la fracción excluida sobre la flora intestinal de ratones

Se ha estudiado el efecto de la fracción excluida (parte activa), obtenida de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente en el ejemplo 1, sobre la evolución de la flora intestinal de ratones.

10 El ensayo se ha realizado en ratones macho C3H que son ratones de segunda generación de una línea de animales axénicos, a los que se les ha implantado una flora intestinal de ser humano adulto (procedente del CDTA, Centro de Distribución, Tipificación y Archivo Animal, CNRS, Orleáns, Francia).

15 Los ratones se mantienen en jaulas de aislamiento para evitar cualquier modificación de su nueva flora intestinal. En el momento de su recepción, los ratones tienen 8-10 semanas de edad. Se deja a los ratones un periodo de adaptación de al menos 2 semanas después de la recepción para suprimir cualquier estrés debido al transporte y para que se aclimaten a su nuevo entorno.

20 Durante todo este periodo de adaptación y hasta el comienzo del experimento, cada ratón dispone de agua estéril como bebida.

Durante toda el periodo del experimento, el alimento utilizado como base alimentaria es un régimen convencional de gránulos RO3 comercializados por la compañía UAR esterilizados mediante irradiación que contienen el 25% de proteínas, el 49,8% de glúcidos, el 5% de lípidos y el 4% de celulosa.

25 Durante los 21 días de ensayo, el agua de los biberones se sustituye con diferentes productos a ensayar, es decir la fracción filtrada y la fracción excluida a razón de 6 ml por día y por ratón. Se realiza un cambio diario de los biberones para evitar cualquier modificación de la composición de los productos a ensayar por proliferación bacteriana. Se recogen los excrementos para el análisis antes del tratamiento (T0) y después al 7º, al 15º, y al 21º día durante la administración del producto. (T7, T15, T21).

Cada producto se ensaya en un lote de al menos 6 ratones y se sigue la evolución de las bacterias *Bifidobacterium* y *Bacteroides fragilis* en la flora intestinal de los ratones.

35 Las extracciones de excremento se realizan en tubos de hemólisis estériles y se pesan de forma aséptica y después se diluyen en solución pre-reducida de Ringer, diluida a un cuarto y suplementada con clorhidrato de cisteína (0,3 g/l), para obtener diluciones a un décimo que varían entre  $10^{-1}$  y  $10^{-4}$ . El contenido se deposita finalmente a razón de 100  $\mu$ l por placa, en diferentes medios de cultivo contenidos en placas de Petri.

40 - medio de Beerens (Be) (constituido por 35 g/l de base de agar-agar Columbia, 5 g/l de glucosa, 0,3 g/l de clorhidrato de cisteína, el 0,5% de ácido propiónico y ajustado a pH 5) para la búsqueda y el recuento de *Bifidobacterium*, después de la presentación de diluciones que varían de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ;

45 - medio Bacteroides Bile Esculine (BBE) (constituido por 37 g/l de triptona, 32 g/l de *Bile Esculin Agar* (DIFCO), 0,5 g/l de esculina, 0,5 g/l de citrato de hierro amoniacal, el 0,2% de una solución de hemina a 5 mg/ml, el 0,25% de una solución de gentamicina a 40 mg/ml y 10 g/l de agar; ajustado a pH 7 y esterilizado en un autoclave 15 minutos a 120°C) para la búsqueda y el recuento de *Bacteroides fragilis*, después de la presentación de diluciones que varían de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ .

50 La presentación se realiza con ayuda de esferas de vidrio estériles sobre los medios indicados y la lectura de los medios se realiza después de 5-7 días de incubación en anaerobiosis a 37°C.

La identificación de las bacterias se realiza, por un lado, después de la descripción de las colonias obtenidas en cada uno de los medios y, por otro lado, con ayuda de una tinción de Gram.

55 Los resultados que se refieren a la evolución de *Bifidobacterium* y *Bacteroides fragilis* en los excrementos de los ratones se presentan respectivamente en las siguientes Tablas II y III:

60

65

## ES 2 291 896 T3

TABLA II

<i>Bifidobacterium</i>				
	T0	T7	T15	T21
<b>Fracción filtrada</b>	3,8 ± 0,5 (9)	4,3 ± 0,55 (11)	4,75 ± 1,15 (9)*	nd
	n = 18	n = 18	n = 18	-
<b>Fracción excluida</b>	4,02 ± 0,74 (8)	4,54 ± 1,0 (11)	4,56 ± 0,36 (12)*	4,76 ± 0,27 (6)*
	n = 18	n = 18	n = 12	n = 6
nd: no determinado, *: p < 0,025				

TABLA III

<i>Bacteroides fragilis</i>				
	T0	T7	T15	T21
<b>Fracción filtrada</b>	4,4 ± 0,7 (15)	4,4 ± 0,5 (12)	4,3 ± 0,7 (12)	4,1 ± 0,9 (7)
	n = 18	n = 18	n = 18	n = 12
<b>Fracción excluida</b>	4,28 ± 0,35 (18)	3,99 ± 0,37 (8)	3,74 ± 0,28 (9)	3,2 ± 0,16 (4)**
	n = 18	n = 18	n = 12	n = 6
nd: no determinado, *: p < 0,025; **: p < 0,05				

En estas tablas, los resultados obtenidos se expresan en media y desviación típica del log del número de UFC/g de excrementos y n es el número de ratones utilizados para cada producto y días ensayados (comparación de rango mediante el ensayo de Wilcoxon para muestras emparejadas), los asteriscos indican los resultados significativos con respecto al tiempo T0. En estas tablas, la cifra mencionada entre paréntesis corresponde al número de ratones en los que la bacteria en cuestión está presente por debajo del umbral de detección. Los resultados correspondientes al medio no sembrado son similares al valor obtenido en T0 y permanecen constantes a lo largo del tiempo durante los 21 días del experimento (resultados que no se representan en las tablas).

Estos resultados demuestran que la administración de una cualquiera de las dos fracciones (excluida o filtrada) conduce efectivamente a un aumento de los *Bifidobacterium* pero que únicamente la fracción excluida es eficaz para provocar una disminución de la población de *Bacteroides fragilis* en la flora intestinal de los ratones.

### 2) Efecto de la fracción excluida sobre la regulación de la translocación intestinal de los microorganismos

La medición de la translocación intestinal de los microorganismos en ratones se realiza en ratones machos de la línea C3H con flora de ser humano adulto (criada en el CDTA-CNRS, Orleáns, Francia). Durante todo el periodo de adaptación y hasta el comienzo del experimento, estos ratones disponen de agua estéril como bebida.

Durante todo el periodo del experimento, estos ratones se alimentarán con gránulos RO3 esterilizados mediante irradiación.

A la edad de 10-12 semanas, comienzo del experimento, se forman tres grupos, un grupo de 18 ratones que recibirá durante todo el periodo del experimento la fracción excluida de los metabolitos de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 en lugar del agua de los biberones, a razón de 8-10 ml por día y por ratón, mientras que los otros dos grupos de 12-23 ratones recibirán respectivamente la fracción filtrada o continuarán recibiendo agua estéril (grupo de control).

## ES 2 291 896 T3

En el 21<sup>er</sup> día, se realiza una extracción de excrementos como se ha descrito anteriormente y los ratones se sacrifican para realizar un estudio bacteriológico.

Se obtienen dos tipos de datos a partir del análisis de los órganos de los ratones sacrificados:

- la translocación por órgano diana, es decir la evaluación del número de ratones que tengan el órgano contaminado y el porcentaje de la población que presenta una contaminación del órgano diana.

- diseminación bacteriana, es decir la intensidad de la diseminación bacteriana representada por el número de órganos positivos así como el número de ratones y el porcentaje de la población que presenta una diseminación de una intensidad dada.

Para extraer los órganos a analizar, el animal se saca de la jaula de aislamiento, se transfiere en condiciones asépticas a una campana de flujo laminar y se sacrifica por inhalación de cloroformo.

La piel se descontamina con alcohol de 70°, y después se extraen los órganos de cada ratón de forma aséptica en el siguiente orden: sangre del corazón, pulmones, hígado, bazo, y riñón. Para evaluar el peso, se suspende una fracción de cada órgano en 9 ml de una solución de Ringer (diluida a un cuarto, suplementada con clorhidrato de cisteína (0,3 g/l) y regenerada en agua hirviendo durante 15 minutos). A continuación se trituran los órganos con ayuda de una pipeta Pasteur estéril de uso único "Pastette®" comercializada por la compañía VWR o "Liquipette®" comercializada por la compañía Gosselin. A continuación, se presentan 100 µl de la suspensión madre y de la siguiente dilución decimal, con ayuda de esferas de vidrio estériles en agar-agar Columbia (comercializado por la compañía Beckton-Dickinson) suplementado con glucosa (5 g/l), clorhidrato de cisteína (0,3 g/l) y sangre de caballo (al 5% v/v, comercializa por la compañía Eurobio). Después de una incubación en anaerobiosis durante 7 días a 37°C, se realiza el recuento de cada tipo de colonias y después se determina la morfología de las bacterias después de una tinción de Gram.

Los resultados obtenidos en relación con el análisis de la translocación por órgano diana, se reúnen en la siguiente Tabla IV:

TABLA IV

Órgano diana	Grupo de control	Fracción filtrada	Fracción excluida	p <sup>c</sup>
Riñón	12 <sup>a</sup> (52,2) <sup>b</sup>	8 (66,7)	7 (38,9)	NS
Bazo	13 (56,5)	9 (75,0)	3 (16,7)*	P < 0,01
Hígado	10 (43,5)	8 (66,7)	5 (27,8)	NS
Pulmón	11 (47,8)	7 (58,3)	2 (11,1)*	P < 0,02

<sup>a</sup> = número de ratones que tienen el órgano diana contaminado  
<sup>b</sup> = porcentaje de la población que presenta contaminación del órgano diana  
<sup>c</sup> = comparación de los grupos que han consumido uno de los productos con respecto al grupo de control con ayuda de un ensayo exacto de Fisher

El grupo que presenta una diferencia significativa se marca con un asterisco

\*

Los resultados obtenidos de este modo muestran que el bazo y el pulmón se contaminan con menor frecuencia en la población para la que el agua de bebida se ha sustituido con la fracción excluida que en la población controlada de ratones que han recibido agua como bebida.

Por otro lado, estos resultados demuestran que la fracción filtrada no tiene efectos sobre la regulación de la translocación bacteriana.

Los resultados obtenidos con respecto a la diseminación bacteriana se reúnen en la siguiente Tabla V:

## ES 2 291 896 T3

TABLA V

Intensidad de diseminación	Grupo de control	Fracción filtrada	Fracción excluida	p <sup>d</sup>
Débil (0-1) <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup> (35) <sup>c</sup>	3 (25)	12 (66,7)*	P < 0,043
Media (2)	4 (17)	1 (8,3)	5 (27,8)	NS
Fuerte (3-4)	11 (48)	8 (66,7)	1 (5,5)*	P < 0,004

<sup>a</sup> = intensidad de la diseminación bacteriana representada (entre paréntesis) por el número de órganos positivos,  
<sup>b</sup> = número de ratones que presentan una diseminación de una intensidad dada,  
<sup>c</sup> = porcentaje de la población que presenta una diseminación de una intensidad dada,  
<sup>d</sup> = comparación de los grupos que hayan consumido uno de los productos con respecto al grupo de control con ayuda de un ensayo exacto de Fisher. El grupo que presenta una diferencia significativa se marca con un asterisco \*.

El número de ratones que presentan menos de un órgano contaminado (intensidad de diseminación débil) es mayor en la población para que el agua de bebida se sustituyó con la fracción excluida que en la población de control de ratones que recibieron agua como bebida.

Además, el número de ratones que presentan al menos tres órganos contaminados (intensidad de diseminación fuerte) es menor en la población para la que el agua de bebida se ha sustituido con la fracción excluida que en la población de control de ratones que recibieron agua como bebida.

Se constata por lo tanto que la diseminación de las bacterias es menos intensa en ratones que han recibido agua de bebida complementada con la fracción excluida. En este caso, la regulación de la translocación bacteriana es más eficaz.

### 3) Efecto de la fracción excluida sobre la expresión de las galectinas 1 y 3

La medición de la expresión de las galectinas 1 y 3 se realiza en ratones con flora de ser humano adulto descritos anteriormente.

A la edad de 12-14 semanas, comienzo del experimento, se forman dos grupos de ratones, un grupo de ratones que recibirá durante toda el periodo del experimento la fracción excluida que contiene los metabolitos de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 en lugar del agua de los biberones, a razón de 10 ml por día y por ratón, mientras que otro grupo de ratones continuará recibiendo agua (grupo de control).

Al 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> y 21<sup>er</sup> días se sacrifica un lote de ratones para realizar un estudio biológico sobre la expresión de las galectinas 1 y 3, evaluada mediante la dosificación de ARNm que codifica estas galectinas mediante RT-PCR cuantitativa (*Polymerase Chain Reaction*) (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los órganos extraídos de los ratones del grupo de control sacrificados al 7<sup>o</sup>, 15<sup>o</sup> y 21<sup>er</sup> día se han reunido por órgano para constituir una reserva que sirva como control durante todo el experimento.

La modificación de la expresión de las galectinas 1 y 3 en los órganos ensayados constituye un indicador del efecto de los metabolitos producidos por la cepa de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 contenidos en la fracción excluida.

Las galectinas 1 y 3 se dosifican en el bazo y en los pulmones de ratones que se han sacrificado como se ha descrito anteriormente.

Para hacer esto, una fracción de pulmón (un lóbulo) y la mitad del bazo se extraen de forma estéril y en este orden para cada ratón. A continuación los fragmentos se depositan en placas de Petri tratadas anteriormente durante 24 horas con una solución estéril de agua y de DEPC (DiEthyl PyroCarbonate, comercializado por la compañía Sigma) a

## ES 2 291 896 T3

1/1000. A continuación se perfunden los órganos una primera vez con tampón PBS con ayuda de una jeringa y de una aguja estéril para eliminar la sangre. A continuación los órganos se transfieren a otra placa de Petri que contiene 200 microlitros de PBS con la adición de 50 unidades de inhibidor de ARNasa (comercializado por la Compañía Applied Biosystems) y se perfunden de nuevo con esta solución. Finalmente los órganos se cortan en láminas inferiores a 5 ml que se depositan en tubo Biopur® (Eppendorf) que contiene 0,5 ml de una solución de estabilización de ARN, comercializada con la referencia RNA-Lafer® por la compañía Qiagen. A continuación los órganos se almacenan en un congelador a -20°C hasta el análisis.

### a) Extracción de los ARN totales de los órganos extraídos

El ARN total se extrae de los tejidos después de la lisis celular de acuerdo con el protocolo de utilización del kit de extracción NReasy protect® comercializado con la referencia 74126 por la compañía Qiagen.

Para hacer esto, la solución de estabilización se retira y se añaden una esfera de tungsteno tratado con DEPC así como 600 microlitros de una solución de lisis (tampón RLT contenido en el kit) a cada órgano. A continuación se trituran con ayuda de un triturador RETSCH MM2000, y después se centrifugan a 13000 g durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante se coloca en un tubo de 1,5 ml que contiene 600 µl de etanol al 70% y después se homogeneiza. Una parte de esta solución (700 µl) se deposita a continuación en una columna de filtración que permite atrapar los ARN, para centrifugarse a 8000 g durante 1 minuto a 4°C. Después de vaciar el tubo colector, se añaden 700 microlitros de un tampón de lavado (tampón RW1 contenido en el kit) en la columna que se centrifugará a 8000 g durante 1 minuto a 4°C. El tubo colector se vacía de nuevo y se añaden 500 microlitros de un segundo tampón de lavado que contiene etanol al 70% (tampón RPE contenido en el kit) en la columna para centrifugarse a 8000 g durante 1 minuto a 4°C. Esta última etapa se repite pero realizando un centrifugado a 13000 g durante 2 minutos a 4°C. Finalmente, se añaden 30 microlitros de un tampón de elución que permite separar los ARN de la columna (tampón RNase free contenido en el kit). A continuación se centrifuga el eluato a 8000 g durante 1 minuto a 4°C después de haberlo incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos. La etapa de elución se realiza de nuevo y las muestras obtenidas de este modo se congelan rápidamente a -80°C.

Se añade una cantidad equivalente a una unidad de ADNasa, comercializada por la compañía Boehringer, a cada muestra que a continuación se incuba al baño maría a 37°C durante 15 minutos.

Para evaluar la cantidad de ARN total de las muestras, éstas se diluyen a 1/8<sup>avo</sup> en agua estéril que se coloca en una microcubeta que permite la lectura de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV de referencia Genquant, comercializado por la compañía Pharmacia. Para obtener la concentración de ARN total de las muestras, el valor de la densidad óptica (DO) obtenido de este modo se multiplica por el factor de dilución y por 40 (una unidad de DO= 40 microgramos/ml de ARN).

### b) RT-PCR cuantitativa que utiliza la metodología Taq Man®

la RT-PCR cuantitativa se realiza con ayuda del kit qPCR™ Core Kit comercializado por la compañía Eurogentec en un termociclador de referencia Abi Prism 7700 (*Sequence Detection System*, Applied Biosystems) comercializado por la compañía Perkin Elmer. Se realiza la mezcla de reacción que se resumen en la Tabla VI a continuación:

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 291 896 T3

TABLA VI

Reactivos	Volumen en $\mu\text{l}$ /tubo	Concentración Final
Tampón PCR (10 x)*	5	1 x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)*	5	5 mM
dNTP (2,5 mM)*	6	300 $\mu\text{M}$
Cebador sentido (10 pM)	1	200 $\mu\text{M}$
Cebador antisentido (10 pM)	1	200 $\mu\text{M}$
Sonda (10 pM)	1	200 $\mu\text{M}$
Inhibidor de ARNasa (40 unidades)	0,5	20 unidades
Polimerasa Hot Gold Star (5 unidades)	0,25	1,25 unidades
MuIV (5 unidades)	0,25	12,5 unidades
ARN total	10	100 ng/tubo
Agua pura	csp 50 $\mu\text{l}$	
* producto proporcionado con el kit qPCR™ Core Kit		

La mezcla de reacción se somete al siguiente programa: 10 minutos a 65°C para eliminar las estructuras secundarias de los ARN, 30 minutos a 42°C para activar la transcriptasa inversa, 10 minutos a 95°C para activar la polimerasa, 15 segundos a 95°C para desnaturalizar las hebras de ADN y 1 minuto a 61°C para la hibridación y la elongación a partir de los cebadores. Se realizan 40 ciclos para las dos últimas etapas.

La expresión de las galectinas 1 y 3 se evalúa con respecto a la expresión de un gen de referencia, tal como el que codifica para  $\beta$ -actina cuya expresión es constante.

Las sondas y los cebadores utilizados y seleccionados gracias al programa Primer Express® comercializado por la compañía Perkin Elmer son los siguientes:

Galectina-1:

Sentido: 5'-TCA ATC ATG GCC TGT GGT CTG-3' (SEC ID N° 4)

Antisentido: 5'-AAG CTC TTG GCG TCC GAG G-3' (SEC ID N° 5)

Sonda: 5'-TCG CCA GCA ACC TGA ATC AAC CTG-3' (SEC ID N° 6)

Galectina-3:

Sentido: 5'-ATT GGC AGA CAG CTT TTC G-3' (SEC ID N° 7)

Antisentido: 5'-GAT CAT GGC GTG GTT AGC-3' (SEC ID N° 8)

Sonda: 5'-TTC CAC TTT AAC CCC CGC TTC AAT GAG AAC-3' (SEC ID N° 9)

## ES 2 291 896 T3

$\beta$ -actina:

Sentido: 5'-TGG CGC TTT TGA CTC AGG ATT-3' (SEC ID N° 10)

Antisentido: 5'-GGG ATG TTT GCT CCA ACC AAC-3' (SEC ID N°11)

Sonda: 5'-GCC GTC GCC TTC ACC GTT CCA GTT TTT-3' (SEC ID N° 12)

Para validar cada microplaca sometida a los ciclos de PCR, se prepara un calibrador a partir de órganos de un lote de 6 ratones C3H con flora de ser humano sometidos a un régimen alimentario convencional (agua estéril y gránulos RO3) en los que se han extraídos los pulmones y el bazo. Los ARN totales de cada órgano se han extraídos con ayuda del protocolo descrito anteriormente para los órganos de los lotes de los ratones a ensayar. Los diferentes extractos obtenidos de este modo se reúnen a continuación para cada órgano para constituir una reserva que sirve como calibrador durante todo el periodo del análisis.

Durante el análisis, las extracciones a ensayar se depositan por duplicado y la gama patrón realizada a partir de la muestra calibradora se deposita por triplicado. Se realiza entonces una media a partir de cada extracción y para la muestra calibradora.

Los resultados de la expresión relativa de la galectina 1 con respecto a  $\beta$ -actina se reúnen en la siguiente Tabla VII:

TABLA VII

Organo	Alimentación			
	Control	Fracción excluida		
		7j	15j	21j
<b>Bazo</b>	n = 17 <sup>a</sup>	n = 6	n = 6	n = 3
	2,7 <sup>b</sup> (1,6-3,47) <sup>c</sup>	1,15 (0,72-1,36) U = 0 p < 0,002 ensayo bilateral	4,5 (3,76-6,92) U = 7 p < 0,002 ensayo bilateral	12,51 (9,68-13,74) U = 0 p < 0,002 ensayo bilateral
<b>Pulmón</b>	n = 16	n = 6	n = 4	n = 6
	1,145 (0,69-1,93)	0,8 (0,56-1,08) U = 17,5 p < 0,05 ensayo bilateral	1,72 (1,67-1,88) U = 5 p < 0,02 ensayo bilateral	1,465 (0,86-1,77)

## ES 2 291 896 T3

Los resultados de la expresión relativa de la galectina-3 con respecto a  $\beta$ -actina se reúnen en la siguiente Tabla VIII

TABLA VIII

Organo	Alimentación			
	Control	Fracción excluida		
		7j	15j	21j
<b>Pulmón</b>	n = 16 <sup>a</sup>	n = 6	n = 3	n = 6
	1,295 <sup>b</sup> (0,56-2,26) <sup>c</sup>	1,04 (0,86-1,16)	0,76 (0,41-1) U = 8 p < 0,05 ensayo unilateral	0,91 (0,75-1,31)

En las Tablas VII y VIII:

- <sup>a</sup> = número de ratones por lote;
- <sup>b</sup> = mediana de la expresión relativa de galectina;
- <sup>c</sup> = resultados extremos de la expresión relativa de galectina;
- el valor designado por la letra U es el valor estadístico del ensayo U de Mann-Whitney;
- p indica el umbral de significación del método.

Estos resultados muestran que se observa un aumento de la expresión de galectina-1 en el bazo de ratones para los que el agua de bebida se ha sustituido con la fracción excluida. La expresión de la galectina-1 (inducción de apoptosis celular, en particular de linfocitos T activados) en animales de control es dos veces mayor con respecto a la de la actina, lo que parece estar en relación con la contaminación bacteriana del órgano (la expresión de la galectina-1 es significativamente inferior en ausencia de bacterias en el bazo U = 15, p < 0,05 -y aumenta en función del índice de contaminación bacteriana cuando hay bacterias-correlación r = 0,77, p < 0,05, ensayo de Spearman). La expresión de la galectina-1 se normaliza después de 7 días de toma de la fracción excluida y después aumenta posteriormente en un factor de 4 a 10 respectivamente a los 15 y 21 días de toma (independientemente de la contaminación bacteriana residual del órgano). En los pulmones, la expresión relativa de la galectina-1 es normal en los ratones de control y la disminución reducida pero significativa después de 7 días de toma de la fracción excluida viene seguida de un aumento (transitoriamente significativo a los 15 días de toma) y después de una normalización de la expresión de la galectina-1 después de 21 días de toma de la fracción excluida.

Estos resultados muestran también que se observa una disminución de la expresión de galectina-3 en los pulmones de ratones para los que el agua de bebida se ha sustituido con la fracción excluida.

El conjunto de estos resultados demuestra que la fracción excluida (producto inmunomodulador obtenido según el procedimiento de acuerdo con la invención) tiene un efecto inmunomodulador y permite aumentar la población de *Bifidobacterium* y disminuir la población de *Bacteroides fragilis*.

### Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

### Documentos de patentes citados en la descripción

- FR 2652590
- FR 0304746
- WO 0101785 A
- FR 0403158

## ES 2 291 896 T3

### Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- **GOMEZ** *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 1988, vol. 56, 47-52.
- 5 • **HONOSO** *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1997, vol. 61, 312-316. *Bioscience Microflora*, 1998, vol. 17, 97-104.
- **ROMOND** *et al.* *Anaerobe*, 1997, vol. 3, 137-143. *J. Dairy Sci.*, 1998, vol 81, 1229-1235.
- 10 • **ROSENFELD** J. *et al.* *Analytical Biochemistry*, 1992, vol. 203, 173-179.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Producto inmunomodulador, **caracterizado** porque se obtiene de acuerdo con un procedimiento de preparación que comprende las siguientes etapas:

10 - siembra e incubación en condiciones aerobias o anaerobias, preferiblemente anaerobias, y a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 y 40°C, de *Bifidobacterium* que comprende al menos la cepa *Bifidobacterium breve* I-2219 en un sustrato acuoso que presenta un pH comprendido entre aproximadamente 6 y 8 que comprende al menos los siguientes ingredientes:

15 i) permeado de lactosuero.

ii) un hidrolizado de proteínas de lactosuero.

15 iii) lactosa,

- eliminación de los *Bifidobacterium* del sustrato acuoso;

20 - ultrafiltración del sustrato acuoso en membranas de filtración que tengan un umbral de corte comprendido entre 100 y 300 kDa para obtener un retentado concentrado;

- deshidratación del retentado concentrado;

25 - disolución del retentado deshidratado en un tampón;

- cromatografía de exclusión en gel en una columna que presenta un umbral de exclusión de 600 kDa de la solución del retentado;

30 - recuperación de la fracción excluida después de la cromatografía que constituye el producto inmunomodulador.

2. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los *Bifidobacterium* se siembran en el sustrato acuoso a razón de  $1 \cdot 10^4$  a  $4 \cdot 10^9$  unidades formadoras de colonias por ml de sustrato.

35 3. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque la temperatura del sustrato se mantiene a un valor comprendido entre 37 y 40°C durante todo el periodo de incubación.

4. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el pH del sustrato acuoso se mantiene a un valor comprendido entre 6 y 8 durante todo el periodo de incubación.

40 5. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado** porque el pH del sustrato acuoso se mantiene a un valor comprendido entre 6,5 y 7,5 durante todo el periodo de incubación.

45 6. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los ingredientes del sustrato acuoso se presentan en las siguientes cantidades:

i) permeado de lactosuero: de 3 a 80 g,

ii) hidrolizado de proteínas de lactosuero: 2 a 80 g

50 iii) lactosa: de 5 a 50 g,

estando estas cantidades dadas por litro de dicho sustrato acuoso.

55 7. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado** porque los ingredientes del sustrato acuoso están presentes en las siguientes cantidades:

i) permeado de lactosuero: de 40 a 60 g,

60 ii) hidrolizado de proteínas de lactosuero: 5 a 15 g,

iii) lactosa: de 10 a 30 g,

estando estas cantidades dadas por litro de dicho sustrato acuoso.

65 8. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el sustrato acuoso comprende además al menos un ingrediente adicional seleccionado entre sales tamponantes, extractos de levadura y clorhidrato de cisteína.

## ES 2 291 896 T3

9. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el sustrato acuoso comprende una sal tamponante seleccionada entre dihidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de potasio que representa de 0,5 a 5 g por litro de sustrato acuoso.

5 10. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el extracto de levadura representa de 0,5 a 5 g por litro de sustrato acuoso.

10 11. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el clorhidrato de cisteína representa de 100 a 500 mg por litro de sustrato acuoso.

12. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la eliminación de los *Bifidobacterium* del medio de cultivo se realiza por microfiltración o por centrifugado del sustrato acuoso.

15 13. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 12, **caracterizado** porque la eliminación de los *Bifidobacterium* del medio de cultivo se realiza por centrifugado del sustrato acuoso.

20 14. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el procedimiento comprende además, después de la etapa de eliminación de los *Bifidobacterium*, una etapa suplementaria de destrucción de las actividades enzimáticas residuales contenidas en el sustrato acuoso después de la incubación.

25 15. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la cromatografía de exclusión se realiza en un gel de dextrano y de agarosa reticulado.

30 16. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la fracción excluida está esencialmente constituida por un complejo de polisacáridos y proteínas en el que la fracción glucídica representa del 5 al 30% en peso, representando la fracción proteica del 70 al 95% en peso con respecto al peso total de dicho complejo.

35 17. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque la fracción glucídica de la fracción excluida presenta la siguiente composición de monosacáridos (expresada en proporciones molares con respecto a ramnosa): galactosa: 5,5 a 8; manosa: 0,8 a 1,3; glucosa: 2,5 a 5; N-acetil galactosamina: 0,3 a 1; N-acetil glucosamina: 0,07 a 0,3; ácido neuramínico 0 a 0,15 y ramnosa: 1.

40 18. Producto inmunomodulador de acuerdo con la reivindicación 16, **caracterizado** porque la fracción proteica comprende al menos un péptido que corresponde a al menos una de las siguientes secuencias:

- RELGIGTPSFLHNGGQWYIYA (SEC ID N° 1)

- RVLNPGQYXYVR (SEC ID N° 2)

- EQATANGQVSSGQQSTGGSAAAP (SEC ID N° 3).

45 19. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, como medicamento.

50 20. Producto inmunomodulador de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, como medicamento inmunomodulador.

21. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque contiene, como principio activo, al menos un producto inmunomodulador obtenido de acuerdo con el procedimiento tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable.

55 22. Composición farmacéutica según la reivindicación 21, **caracterizada** porque esta destinada para su administración por vía oral y en que se presenta en forma líquida o sólida.

60

65

FIGURA 1

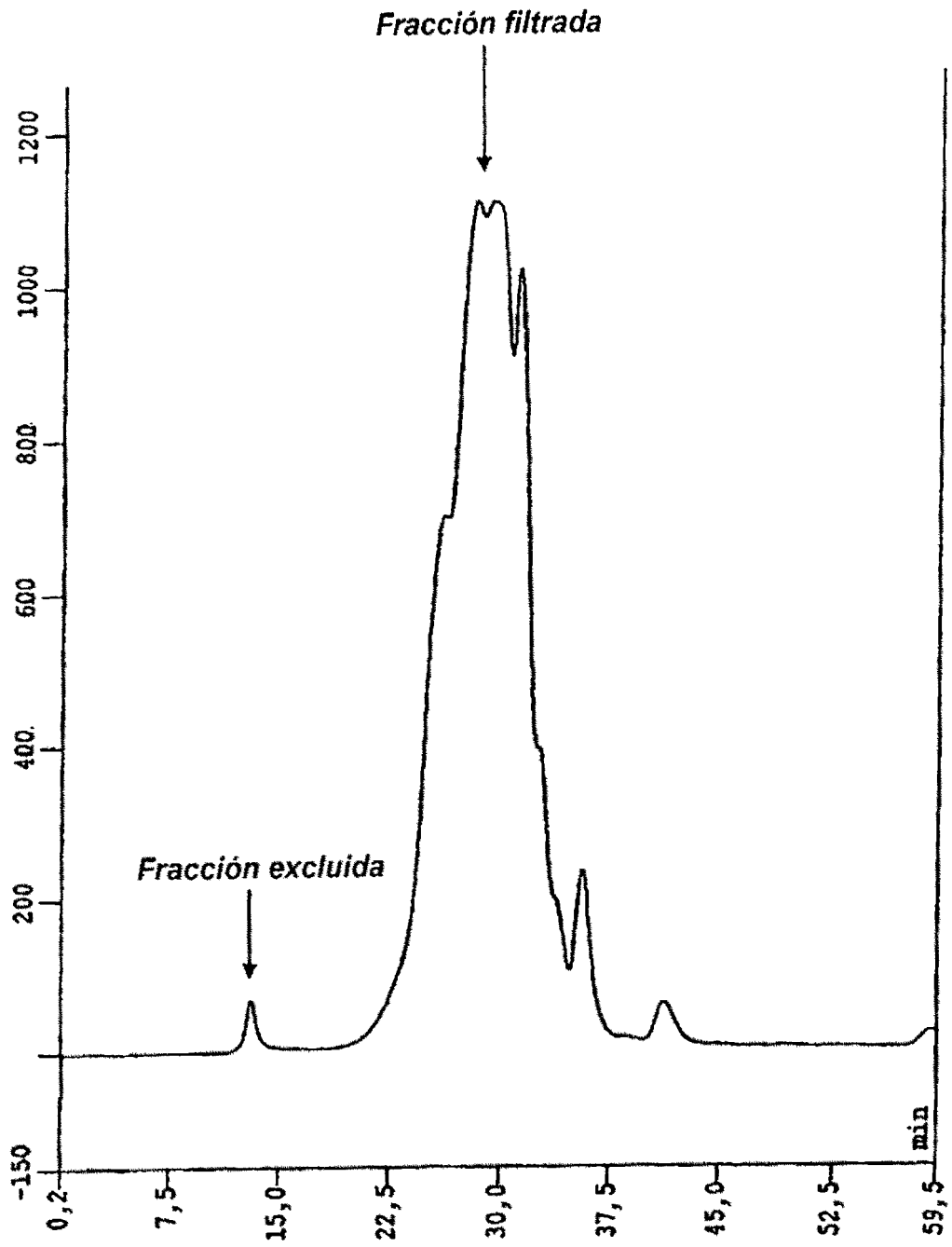


FIGURA 2

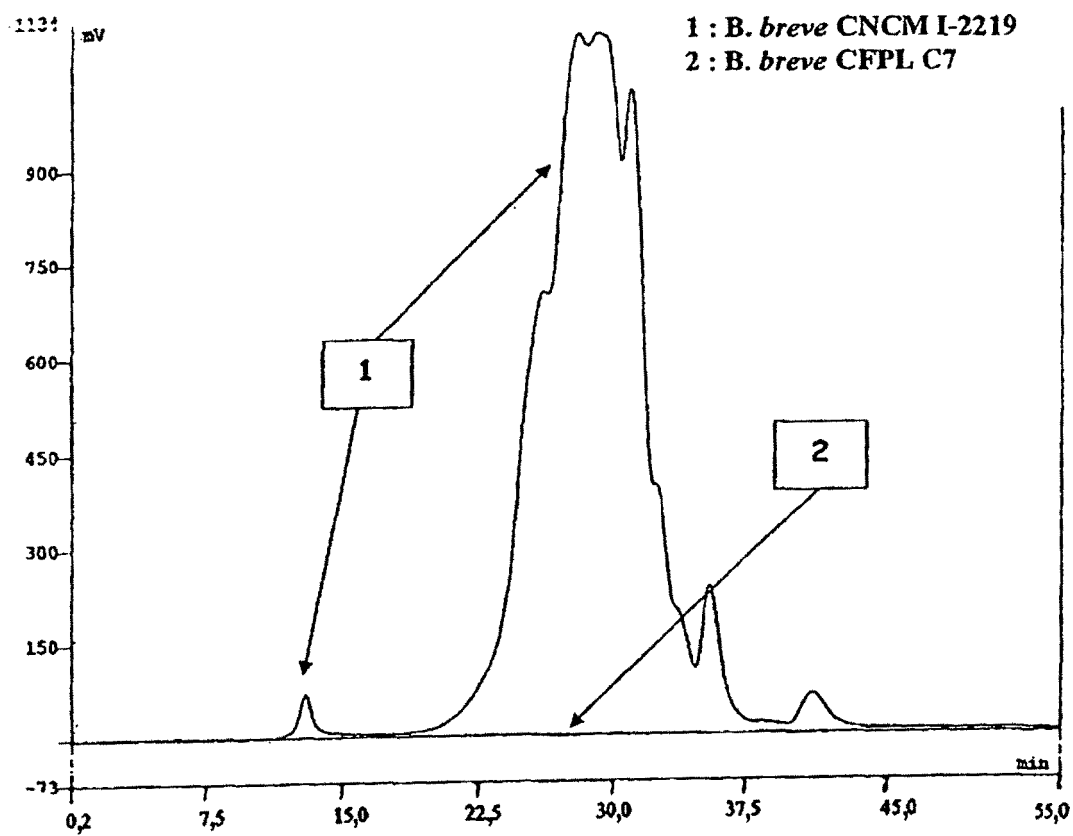
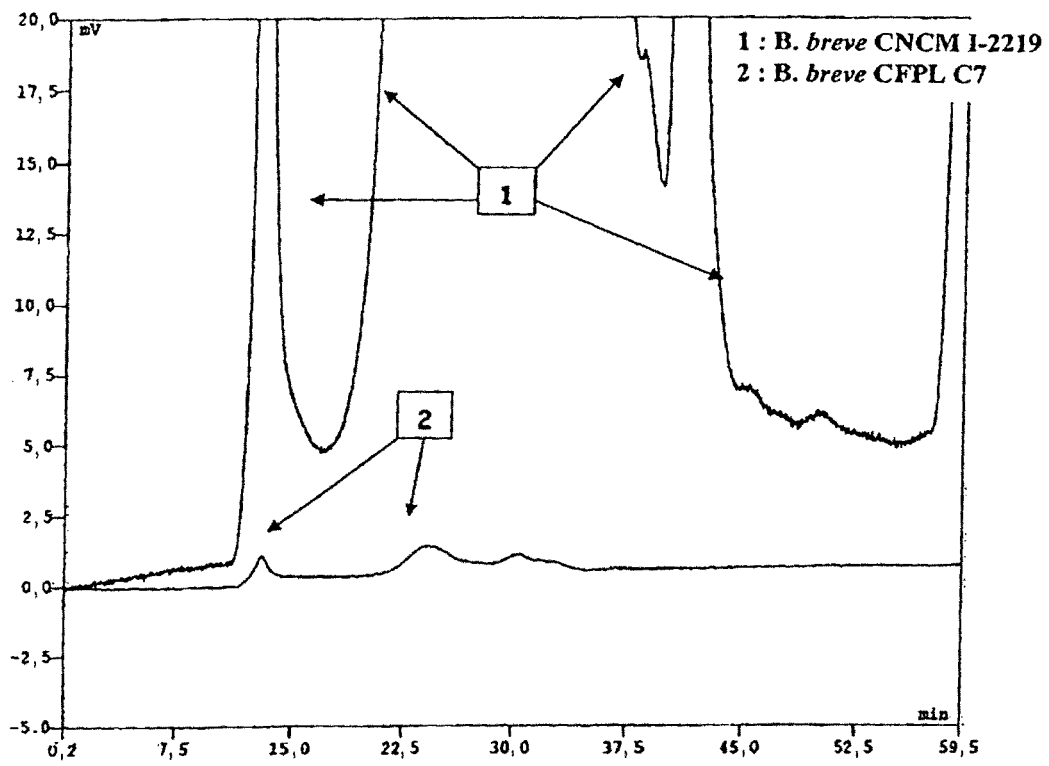


FIGURA 3



# ES 2 291 896 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> COMPAÑÍA GERVAIS-DANONNE  
5       PETAY, Valérie  
      LECROIX, Francis  
      PERRIN, Emmanuel  
      GONTIER, Charles  
      BLAREAU, Jean-Pierre  
10       ROMOND, Marie-Bénédicte  
      SINGER, Elisabeth  
      ODOU, Marie-Françoise  
      DEMAILLY-MULLIE, Catherine

<120> PRODUCTO INMUNOESTIMULADOR OBTENIDO A PARTIR DE UN CULTIVO DE *BIFIDOBACTERIUM* Y COMPOSICIONES QUE LO CONTIENEN  
15

<130> F191 EXT 189  
<150> FR0304746  
<151> 16-04-2003  
20 <150> FR0403158  
<151> 26-03-2004  
<160> 12  
<170> PatentIn versión 3.1  
25 <210> 1  
<211> 21  
<212> PTR  
30 <213> *Bifidobacterium breve*

<400> 1

35       Arg Glu Leu Gly Ile Gly Thr Pro Ser Phe Leu His Asn Gly Gly Gln  
      1                   5                   10                   15  
      Trp Tyr Ile Tyr Ala  
                  20

40 <210> 2  
<211> 13  
<212> PRT  
45 <213> *Bifidobacterium breve*  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(10)  
50 <223> cualquier ácido amino

<400> 2

55       Arg Val Leu Tyr Asn Pro Gly Gln Tyr Xaa Tyr Val Arg  
      1                   5                   10

<210> 3  
60 <211> 22  
<212> PRT  
<213> *Bifidobacterium breve*

65



## ES 2 291 896 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador de PCR	
	<400> 8	
10	gatcatggcg tggtagc	18
	<210> 9	
	<211> 30	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> sonda	
	<400> 9	
25	ttccacttta acccccgctt caatgagaac	30
	<210> 10	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
35	<400> 10	
40	tgccgctttt gactcaggat t	21
	<210> 11	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador de PCR	
50	<400> 11	
	gggatgtttg ctccaaccaa c	21
55	<210> 12	
	<211> 27	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
65	<400> 12	
	gccgtegctt tcaccgttcc agtttt	27