



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 269 429**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/02 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01951775 .4**
86 Fecha de presentación : **04.07.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1297176**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2003**

54 Título: **Microorganismos que tienen una acción moduladora de glicosilación de superficie de las células intestinales.**

30 Prioridad: **04.07.2000 FR 00 08672**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es: **COMPAGNIE GERVAIS DANONE**
126 rue Jules Guesde
92300 Levallois Perret, FR

72 Inventor/es: **Antoine, Jean-Michel;**
Freitas, Miguel;
Cayuela, Chantal y
Trugnan, Germain

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Microorganismos que tienen una acción moduladora de glicosilación de superficie de las células intestinales.

5 La presente invención tiene por objeto los microorganismos que tienen un efecto modulador de la glicosilación de superficie o de la composición en azúcares en la superficie de las células intestinales, así como un método de selección de dichos microorganismos, y sus utilizaciones en los dominios alimenticio y médico.

10 La mucosa gastrointestinal consiste en una capa simple de células epiteliales recubierta al menos parcialmente del lado de la cavidad intestinal por una capa viscoelástica constituida principalmente por glicoconjugados. Las células epiteliales sintetizan los glicoconjugados presentes en su superficie, que son los intermediarios de numerosas interacciones, en particular con unas lectinas o adhesinas, con unas toxinas bacterianas, o con unos anticuerpos, unas bacterias, unos virus, unos parásitos. Estos glicoconjugados constituyen por lo tanto unos intermediarios importantes en las relaciones entre el huésped y la flora intestinal.

15 Estos glicoconjugados son, como su nombre indica, unos compuestos glicosilados, es decir sobre los que están injertadas unas cadenas de azúcares más o menos largas y eventualmente ramificadas. En el intestino humano sano, estos azúcares pueden ser la galactosa (Gal), la fucosa (Fuc), el ácido N-acetilneuramínico o el ácido siálico, la N-acetilglucosamina (GlcNAc), la N-acetilgalactosamina (GalNAc), unidos entre sí por diferentes enlaces. Tres de entre
20 ellos pueden estar en posición terminal; se trata de la galactosa, de la fucosa y el ácido siálico.

Un huésped y su microflora intestinal funcionan como un sistema complejo en el que la microflora tiene un impacto significativo sobre el huésped. En el caso de microorganismos no patógenos o probióticos, a menudo aparece una relación simbiótica o de cooperación entre el huésped y los microorganismos, siendo necesaria la presencia de estos
25 últimos para el buen equilibrio y el buen funcionamiento del intestino del huésped. Por el contrario, la presencia de microorganismos patógenos, más rara, puede tener consecuencias negativas, impidiendo o disminuyendo la presencia de los microorganismos probióticos, incluso teniendo una acción de parasitismo directamente nefasta para el huésped.

El frágil equilibrio entre el huésped y la microflora está directamente unido al entorno intestinal y en particular
30 a la presencia cuantitativa y cualitativa de los glicoconjugados de superficie. En efecto, se sabe que ciertos microorganismos, probióticos o patógenos, serán sensibles a ciertos azúcares en posición terminal. Las bacterias intestinales pueden modular el esquema de glicosilación de los glicoconjugados presentes en la superficie de las células intestinales, sin que su modo de acción sea completamente aclarado como se verá seguidamente. Las bacterias pueden, por un lado, inducir la presencia de tal o cual azúcar en el momento de la glicosilación y, por otro lado, degradar los azúcares
35 presentes en la posición terminal de una cadena, lo que modifica cualitativamente y/o cuantitativamente los azúcares presentes en la posición terminal.

Esta modulación del esquema de glicosilación de superficie de las células epiteliales provoca una modificación del entorno intestinal, pudiendo favorecer el entorno modificado la implantación de ciertos microorganismos y/o limitar,
40 incluso impedir, la implantación de otros microorganismos. Una modificación del entorno, eventualmente generada por la microflora, tiene por lo tanto un impacto directo sobre el equilibrio entre el huésped y la microflora.

Sería por lo tanto interesante disponer de un modelo que permita seleccionar de forma rápida y fácil unos microorganismos en función de su acción sobre el esquema de glicosilación. Así se podrían identificar microorganismos que
45 favorecen la presencia de tal o cual azúcar, y por lo tanto que favorecen la implantación de microorganismos benéficos como por ejemplo unos probióticos y/o limitar la implantación de microorganismos patógenos.

En efecto, según el conocimiento del solicitante, hasta la fecha no se han identificado unos microorganismos, en particular unas bacterias lácticas, capaces de actuar finamente, con precisión, sobre el esquema de glicosilación, y así
50 modular con precisión este esquema de glicosilación y por lo tanto la implantación de microorganismos.

Dichos microorganismos moduladores del esquema de glicosilación podrían encontrar utilización, en particular, en unas composiciones farmacéuticas o alimenticias o unos complementos alimenticios. En efecto, pueden permitir optimizar el funcionamiento de las células intestinales y el buen equilibrio de la microflora.

55 BioEssays, 1998, 20:336-343, haciendo entre otras referencia a Science, 1996, 273:1380-1383, describe unos métodos en los que los microorganismos son incubados *in vivo* y en los cuales es analizada la expresión de genes.

60 Estos documentos, así como el documento Digestive and Liver Disease, 2000, 32 (S1):A29, resumen N°: 100), describen unas cepas de unas bacterias lácticas que inducen una modulación de la glicosilación de superficies de las células epiteliales intestinales.

El documento WO-A-99 29833 describe la utilización de una cepa de bacterias lácticas para la preparación de una composición alimenticia.

65 El documento WO99/29833 describe una nueva cepa de bacterias que presenta ciertas propiedades, por ejemplo actividad antimicrobiana. De todas formas, las modalidades de su acción no son detalladas, y en particular no se ha abordado nunca la cuestión de la eventual acción de la bacteria sobre los azúcares.

Bry L. *et al.* en “A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem”, Science, Vol. 273, págs. 1380-1383, Sept. 6, 1996, han estudiado *in vivo* (en el ratón) la influencia del *Bacteroides thetaiotaomicron* en la fucosilación: el *Bacteroides thetaiotaomicron* forma parte de la flora intestinal en el hombre y en el ratón. De todas formas, el modelo utilizado está limitado al estudio de la fucosilación, excluyendo otros tipos de glicosilación. Por otra parte es por lo tanto más largo y complejo utilizar un modelo *in vivo* que un modelo *in vitro*.

De todas formas, este modelo ha permitido emitir la hipótesis de la existencia de un factor soluble secretado por *B. Thetaiotaomicron*, que desempeñaría la función de una señal que provocaría la modificación de la glicosilación de superficie. Este factor soluble, no identificado, actuaría por lo tanto sin que haya contacto directo entre las bacterias y las células diana.

Hasta la fecha, según el conocimiento de la sociedad solicitante, no se ha desarrollado ningún método que permita seleccionar *in vitro*, de manera fácil y rápida, diferentes microorganismos, en particular diferentes cepas de bacterias lácticas, en función de su acción precisa sobre el esquema de la glicosilación de las células epiteliales intestinales, y más precisamente sobre la modulación o variación de la composición en cada uno de los azúcares.

En el marco de la presente solicitud, el término “bacterias lácticas” designa las bacterias susceptibles de producir ácido láctico, y en particular las bacterias no patógenas escogidas en el grupo que comprende los *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* y *Leuconostoc*, en particular *B.breve*, *B. Lonum*, *L. Lactis*, *S. Thermophilus*, *L. Casei*, *L. Helveticus* y *L. Bulgaricus*.

Un objeto de la presente invención es por lo tanto un método de selección *in vitro*, que comprende las etapas siguientes:

- puesta en contacto del sobrenadante del cultivo de la cepa de microorganismos, en particular unas bacterias lácticas, con unas células de un modelo de descendencia celular que representa las células epiteliales intestinales,
- incubación,
- extracción de las células e incubación con diferentes lectinas acopladas a un fluorocromo,
- lavado,
- medición de la intensidad de la fluorescencia media (IFM) de cada lectina, comparación con las mediciones realizadas sobre una muestra testigo para evaluar la variación de IFM inducida por las bacterias, selección de la cepa de microorganismos que inducen una variación de al menos 20% para al menos un azúcar.

Se puede realizar esta última etapa en particular sobre placas, siendo realizada la medición del IFM por una sonda, según técnicas conocidas por el experto en la materia, o por citometría de flujo. En el caso de la citometría de flujo, se puede también realizar la comparación del gráfico obtenido, que representa la evolución de la fluorescencia en función de número de células, con el obtenido con una muestra testigo, y seleccionar la cepa de microorganismos que inducen una variación del carácter del gráfico.

Se utiliza en este método de selección un modelo cualquiera de la descendencia celular que representa las células epiteliales intestinales. El experto en la materia sabrá escoger un modelo de descendencia apropiado entre los modelos conocidos, por ejemplo las descendencias Caco-2 ó HT29-MTX, que son unas células epiteliales intestinales cancerosas en cultivo. Se considera que estas descendencias reproducen total o parcialmente unos mecanismos de regulación de los sistemas *in vivo* y en particular la producción de glicoconjugados. Cualquier descendencia que presente esta característica puede ser utilizada en el método según la invención. Se podrá hacer referencia, refiriéndose a la descendencia HT29-MTX, a Lesuffleur *et al.*, “Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells”, 1990, Cancer Res., 50:6334-6343.

Se realiza una centrifugación y una filtración del medio de cultivo en el que ha sido incubada cada cepa de microorganismos a ensayar con la finalidad de extraer el sobrenadante (“ensayo”). Sin querer estar vinculado por cualquier teoría, el solicitante estima que el sobrenadante contiene el factor soluble que constituye la señal de modulación de la glicosilación. El sobrenadante constituye por lo tanto una fracción activa de cepa de microorganismos. Puesto en contacto con las células epiteliales intestinales, provocará o no tal o cual modificación de la glicosilación en función de la cepa de microorganismos ensayada.

Así, en los *Bacteroides*, el factor soluble ha sido identificado como una molécula de pequeño peso molecular (inferior a 8 kD) que es sensible al calor. Se puede suponer que el factor soluble de otra cepa presentará unas características similares sino idénticas.

El sobrenadante obtenido a partir del medio de cultivo que no ha estado en contacto con las bacterias es utilizado como control (“testigo”).

ES 2 269 429 T3

Se incorporan unas cantidades apropiadas de los sobrenadantes “ensayo” y “testigo” al medio de cultivo en el que se han colocado las células del modelo de descendencia celular, por ejemplo HT29-MTX, durante un periodo apropiado. Este periodo puede ser, por ejemplo, de 1 a 15 días.

5 En un modo de realización particular, se pueden añadir, en lugar del sobrenadante, unas bacterias. En este caso, se podrán añadir las bacterias en forma de una suspensión en presencia de penicilina G y de un tampón fuerte que permitan inhibir el desarrollo bacteriano sin impedir la viabilidad de las bacterias, y acidificación del medio.

10 Después de este periodo de incubación, las células del modelo de descendencia celular son separadas y suspendidas de nuevo, y el mismo número de células “ensayo” y “testigo” es incubado separadamente con una lectina de la que se conoce la especificidad con respecto a los azúcares (naturaleza del azúcar, naturaleza del enlace).

Cada lectina, que está acoplada a un fluorocromo, va a fijarse sobre el azúcar de la que es específica.

15 Las suspensiones celulares “ensayo” y “testigo” son cada una lavadas varias veces, y la reactividad de cada lectina es cuantificada por medición de la fluorescencia denominada IFM (Intensidad de fluorescencia media).

20 Se puede realizar esta medición mediante cualquier medio apropiado, en particular mediante la citometría de flujo (FACScan, Bencton-Dickinson) o mediante mediciones fluorimétricas directas sobre placas.

Cuando se utiliza la citometría de flujo, se obtiene para cada lectina, un gráfico que representa la evolución de la fluorescencia en función del número de células. Para cada gráfico de citometría de flujo, la intensidad de la fluorescencia media corresponde a su valor medio.

25 Dos comparaciones son posibles. Por un lado, sea cual sea el medio de medición de la intensidad de la fluorescencia, se puede comparar cuantitativamente el IFM “ensayo” con el IFM “testigo”. Por un lado, en el caso de la citometría de flujo, se puede también comparar cualitativamente el resultado “ensayo” con el resultado “testigo”, y más precisamente comparar el gráfico obtenido con la suspensión “ensayo” con el obtenido con la suspensión “testigo”, es decir comparar el carácter de las curvas.

30 Se estima que una disminución o un aumento de este IFM de al menos aproximadamente 20%, preferentemente al menos aproximadamente 28% más preferentemente aún de al menos aproximadamente 35%, revela un cambio significativo de la reactividad de cada lectina, por lo tanto de la composición en azúcares de las glicoproteínas presentes en la superficie de las células epiteliales.

35 Este método permite por lo tanto observar y cuantificar de forma simple y rápida la presencia de cada lectina en las cadenas de azúcar, por lo tanto cuantificar el azúcar del cual la lectina es específica. Se pueden entonces comparar los valores obtenidos sin y con microorganismos, y así evaluar los efectos moduladores de la glicosilación de cada cepa de microorganismos, con la finalidad de seleccionar las cepas que tienen el efecto deseado: aumento de tal azúcar, disminución de tal otro.

40 La invención tiene también por objeto las cepas de microorganismos, en particular de bacterias lácticas, susceptibles de modular el esquema de glicosilación de superficie de las células epiteliales intestinales, y más particularmente las cepas de microorganismos, en particular unas bacterias lácticas, caracterizadas por el hecho de que inducen una variación del carácter del gráfico obtenido por citometría de flujo y/o de la intensidad de fluorescencia media de al menos aproximadamente 25%, para al menos un azúcar escogido entre la galactosa (Gal), la Fucosa (Fuc), el ácido N-acetilneuramínico, la N-acetilglucosamina (GlcNAc), la N-acetilgalactosamina (GalNAc), en un test que comprende las siguientes etapas:

- 50
- puesta en contacto del sobrenadante de cultivo de la cepa de bacterias con unas células HT29-MTX, modelo de descendencia celular que representa las células epiteliales intestinales,
 - incubación,

55

 - extracción de las células e incubación con diferentes lectinas acopladas a un fluorocromo,
 - lavado;

60

 - medición de la intensidad de la fluorescencia media (IFM) de cada lectina, y comparación con las mediciones realizadas sobre una muestra testigo para evaluar la variación de IFM inducida por las bacterias.

65 Dichos microorganismos permiten por lo tanto modular la glicosilación, y por lo tanto restablecer o modificar el entorno intestinal con la finalidad de favorecer la implantación de microorganismos probióticos y evitar o limitar la implantación de microorganismos patógenos.

Se sabe por ejemplo que el receptor que permite la adhesión de *Escherichia coli* contiene galactosa y ácido siálico; para *Streptococcus pyogenes* y *Listeria monocytogenes*, se trata de la galactosa; para *Helicobacter pylori*, se trata de la fucosa; y para *Entamoeba histolytica*, se trata de la galactosa y de la N-acetyl galactosamina.

ES 2 269 429 T3

Las cepas objeto de la invención, pueden ser en particular las siguientes: N° de colección CNCM I-2492, N° de colección CNCM I-2493, N° de colección CNCM I-2494 (CNCM= Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos- Instituto Pasteur- 28, calle del Dr. Roux- 75724 Paris Cedex 15- Francia), depositados el 20 de junio 2000.

- 5 Se pueden utilizar dichos microorganismos, en particular dichas bacterias lácticas, o su fracción activa, es decir la fracción que comprende el factor soluble, para la preparación de unas composiciones alimenticias o de medicamentos o complementos alimenticios que modulan la glicosilación de superficie de las células epiteliales intestinales. Estas composiciones pueden comprender una cepa única, o varias cepas, de microorganismos que modulan la glicosilación.
- 10 Así, se dispone, de unas composiciones que permiten mantener o restablecer un equilibrio correcto huésped- microflora intestinal, o que permiten favorecer la implantación de tal o cual cepa de microorganismos. Permiten por lo tanto optimizar el funcionamiento de las células intestinales y el buen equilibrio de la microflora. Se pueden en particular utilizar bacterias lácticas, e incorporarlas a unos productos lácteos.
- 15 Las cepas ensayadas en los siguientes ensayos son dadas a título de ejemplos no limitativos.

Ensayos in vitro de bacteria lácticas

- 20 Se realiza una centrifugación y una filtración del medio de cultivo en el que se han incubado durante una noche unas bacterias lácticas (LAB=Lactic Acid Bacteria), con la finalidad de extraer el sobrenadante (“ensayo”).

Las cepas de LAB utilizadas son las siguientes; N° de colección CNCM I-2492, N° de colección CNCM I-2493, N° de colección CNCM I-2494.

- 25 El sobrenadante obtenido a partir del medio de cultivo que no ha estado en contacto con las bacterias es utilizado como control (“testigo”).

- 30 Se incorpora una cantidad óptima para cada sobrenadante (entre 10% y 30%) “ensayo” y “testigo” al medio de cultivo DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) en el que se ha colocado la descendencia celular HT29-MTX durante 5 a 15 días.

- 35 Después de este tratamiento, las células HT29-MTX son separadas y suspendidas de nuevo en una solución PBS (“Phosphate Buffered Saline Solution”) y es incubado separadamente el mismo número de células “ensayo” y “testigo” con una lectina específica de un azúcar (naturaleza del azúcar, naturaleza del enlace) a concentración óptima durante 30 minutos.

Las lectinas comerciales utilizadas y su(s) epítipo(s) son las siguientes:

40	Lectina Nombre	Lectina Abreviatura	Epítipo
	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Jak	Gal
	<i>Ricinus communis</i>	RCA I	Gal
45	<i>Griffonia simplicifolia I B4</i>	GSI-B4	Gal α 3Gal
	<i>Helix pomatia</i>	HPA	GalNAc
	<i>Datura stramonium</i>	DSA	GlcNAc
	<i>Wheat germ</i>	WGA	GlcNAc y ácido siálico
50	<i>Anguilla anguilla</i>	AAA	α -L-Fucosa
	<i>Ulex europaeus I</i>	UEA I	Fu α 2Gal β
	<i>Maackia amurensis</i>	MAA	ac. siálico α 2,3
55	<i>Sambucus nigra</i>	SNA	ac. siálico 2,6

Todas estas lectinas son comercializadas por EY Laboratories Inc. (San Mateo, CA, USA) salvo la RCA I, comercializada por Sigma Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, Francia).

- 60 Se obtienen por citometría de flujo, para cada cepa de bacterias lácticas ácidas, y para las células “testigo” y “ensayo”, los valores de intensidad de fluorescencia media siguientes:

65

ES 2 269 429 T3

CNCM I-2492

	Lectina	“testigo”	“ensayo”	Evolución
5	RCA	424	392	-7,5%
	Jak	422	431	+2%
	DSA	237	241	+1,6%
	SNA	57	48	-16%
10	HPA	334	350	+4,5%

CNCM I-2493

	Lectina	“testigo”	“ensayo”	Evolución
15	Jack	535	392	-26,7%
	SNA	48	36	-25,0%
20	HPA	354	379	+ 7,0%
	MAA	665	518	-22,0%
	WGA	1313	1376	+4,8%
	GSI	37	31	-16,0%
25	RCA	317	247	-22,0%
	DSA	176	165	-6,0%

CNCM I-2494

	Lectina	“testigo”	“ensayo”	Evolución
30	Jak	346	446	+29,0%
35	SNA	34	35	+2,9%
	HPA	748	593	-20,7%
	AAA	10	20	+100,0%
	MAA	668	644	-3,6%
40	WGA	302	290	-4,0%
	GSI	30	32	+6,7%
	RCA	258	369	+43,0%
	DSA	176	198	+11,0%

45 Así, se puede constatar inmediatamente la acción moduladora de la glicosilación de cada cepa de bacterias. Por ejemplo, se puede constatar que la cepa CNCM I-2494 provoca un aumento de Gal y de α -L-Fucosa, y una disminución de GalNAc.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método de selección de cepas de microorganismos que comprende las siguientes etapas:

- puesta en contacto del sobrenadante del cultivo de la cepa de microorganismos, con unas células de un modelo de descendencia celular que representa las células epiteliales intestinales,
- incubación,
- extracción de las células e incubación con diferentes lectinas acopladas a un fluorocromo,
- lavado,
- medición de la intensidad de la fluorescencia media (IFM) de cada lectina, comparación con las mediciones realizadas sobre una muestra testigo para evaluar la variación de IFM inducida, selección de la cepa de microorganismos que inducen una variación de al menos aproximadamente 20%, para al menos un azúcar.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la intensidad de fluorescencia media es medida por citometría de flujo, y corresponde al valor medio del gráfico obtenido que representa la evolución de la fluorescencia en función del número de células.

3. Método según una u otra de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque los microorganismos son unas bacterias, en particular unas bacterias lácticas.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la cepa de microorganismos seleccionada induce una variación de IFM de al menos aproximadamente 28%, preferentemente al menos aproximadamente 35%.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque las células del modelo de descendencia celular son unas células HT29-MTX.

6. Cepa de bacterias lácticas, **caracterizada** porque induce una variación del carácter del gráfico por citometría de flujo y/o de la intensidad de la fluorescencia media de al menos aproximadamente 25%, para al menos un azúcar escogido entre la galactosa (Gal), la Fucosa (Fuc), el ácido N-acetilneuramínico, la N-acetilglucosamina (GlcNAc), la N-acetilgalactosamina (GalNAc), en un test que comprende las siguientes etapas:

- puesta en contacto del sobrenadante de cultivo de la cepa de bacterias con unas células HT29-MTX, modelo de descendencia celular que representa las células epiteliales intestinales,
- incubación,
- extracción de las células e incubación con diferentes lectinas acopladas a un fluorocromo,
- lavado,
- medición de la intensidad de la fluorescencia media (IFM) de cada lectina, y comparación con las mediciones realizadas sobre una muestra testigo para evaluar la variación de IFM inducida por las bacterias.

7. Cepa de bacterias lácticas según la reivindicación 6, depositada con el número CNCM I-2493.

8. Cepa de bacterias lácticas según la reivindicación 6, depositada con el número CNCM I-2494.

9. Utilización de una cepa de bacterias según una u otra de las reivindicaciones 6 a 8, o de la fracción activa de una cepa de este tipo, para la preparación de una composición alimenticia o farmacéutica o un complemento alimenticio que modula la glicosilación de superficie de las células epiteliales intestinales.

10. Composición alimenticia o farmacéutica, **caracterizada** porque comprende al menos una cepa de bacterias según una de las reivindicaciones 6 a 8 o al menos una fracción activa de una de estas cepas.

11. Composición alimenticia o farmacéutica según la reivindicación 10, **caracterizada** porque modula la glicosilación de superficie de las células epiteliales intestinales.