

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 962 302**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 1/16** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2016** **PCT/EP2016/080941**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017** **WO17102816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2016** **E 16812728 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023** **EP 3389680**

54 Título: **Tratamiento de la colestasis intrahepática y hepatopatías relacionadas**

30 Prioridad:

**14.12.2015 US 201562266771 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.03.2024**

73 Titular/es:

**METABOGEN AB (100.0%)**  
**Erik Dahlbergsgatan 11A**  
**411 26 Gothenburg, SE**

72 Inventor/es:

**KARLSSON, FREDRIK y**  
**MÖLLSTAM, BO**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 962 302 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

Tratamiento de la colestasis intrahepática y hepatopatías relacionadas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, de forma general, a la medicina. Más específicamente, la invención se refiere a productos para usar en tratamientos probióticos en mamíferos con riesgo de contraer o tener colestasis intrahepática gestacional.

10

**Antecedentes de la invención**

La colestasis intrahepática gestacional (CIG) es una enfermedad que aparece en la última etapa del embarazo con picazón (prurito) y complicaciones fetales. Es la hepatopatía específica del embarazo más prevalente y se asocia con un mayor riesgo de resultados fetales adversos, incluidos el parto prematuro y la muerte intrauterina. Además, la CIG se asocia con un mayor riesgo de preeclampsia, enfermedad tiroidea, diabetes y cáncer. Los siguientes factores pueden aumentar el riesgo de que una mujer contraiga CIG:

15

- Un familiar cercano que haya padecido CIG.
- Haber sufrido CIG en embarazos anteriores.
- Estar embarazada de gemelos, trillizos, etc. (embarazo múltiple)
- Tener antecedentes de daño hepático.
- Tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV).

20

25

30

Los criterios de diagnóstico de la CIG han variado a lo largo del tiempo y han incluido ictericia clínica, gravedad del prurito y niveles elevados de ácidos biliares. Hoy en día, el parámetro de laboratorio más adecuado para el diagnóstico de la CIG es el aumento de los ácidos biliares ( $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ ) junto con prurito sin causa aparente.

35

Adawi y col. 1999 (Microbial Ecology in Health and Disease, 11:1, 47-54) afirma que la modulación de la flora bacteriana del colon afecta de manera diferente a la translocación bacteriana y a la lesión hepática en un modelo de lesión hepática aguda.

El documento WO 00/71 138 se refiere a la administración oral de *Lactobacillus* para el mantenimiento de la salud en mujeres.

40

El documento WO 2007/093619 se refiere al uso de *Bifidobacterium longum* para la prevención y el tratamiento de la inflamación.

El documento WO 2015/051323 se refiere a composiciones que comprenden un microbioma definido y a métodos de uso de las mismas.

45

Lepercq y col. 2004 (FEMS microbiology letter, 235(1), 65-72) se refiere a la epimerización del ácido quenodesoxicólico a ácido ursodesoxicólico por *Clostridium baratii* aislado de materia fecal humana.

50

Un tratamiento farmacológico disponible para pacientes con CIG es el ácido ursodesoxicólico (AUDC). En un ensayo con doble ocultación, comparativo con placebo para mujeres con CIG, se estudiaron los efectos del tratamiento con AUDC. Se asignó a 130 mujeres al azar a tratamiento con AUDC, tratamiento con dexametasona o tratamiento con placebo. Se analizaron el prurito y los marcadores bioquímicos de la colestasis en el momento de la inclusión y después de 3 semanas de tratamiento. También se registraron las complicaciones fetales. El tratamiento con AUDC mejoró algunos marcadores bioquímicos de la CIG independientemente de la gravedad de la enfermedad, pero solo se encontró un alivio significativo del prurito y una reducción notable de los ácidos biliares séricos en pacientes con CIG grave (niveles de ácidos biliares  $\geq 40 \mu\text{mol/l}$ ) y, por lo tanto, es necesario un tratamiento más eficaz. Se pretende que la presente invención resuelva este problema.

55

**Resumen de la invención**

60

Las realizaciones de la invención se exponen en el conjunto de reivindicaciones anexas.

En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende actividad de desconjugación de los ácidos biliares y actividad de 7-epimerización, para usar en un método para tratar o reducir el riesgo de colestasis intrahepática en un sujeto, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional y en donde:

65

- (i) la composición comprende al menos dos cepas bacterianas que comprenden
- (a) una primera cepa bacteriana que comprende actividad de desconjugación de los ácidos biliares, y
- 5 (b) una segunda cepa bacteriana que comprende actividad de 7-epimerización; o
- (ii) la composición comprende al menos tres cepas bacterianas que comprenden
- (a) una primera cepa bacteriana que comprende actividad de desconjugación de los ácidos biliares,
- 10 (b) una segunda cepa bacteriana que comprende actividad 7 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH), y
- (c) una tercera cepa bacteriana que comprende actividad 7 $\beta$ -HSDH.
- 15 La presente invención se refiere a composiciones para usar en tratamientos probióticos en mamíferos con riesgo de contraer o tener colestasis intrahepática, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional.
- 20 La presente invención se refiere a composiciones para usar en tratamientos probióticos en mamíferos basadas en determinadas bacterias con características deseables.
- La composición para uso de la invención se puede utilizar para modular el nivel de los ácidos biliares en suero en un mamífero con riesgo de contraer o tener colestasis intrahepática gestacional.
- 25 La composición para uso de la invención se puede utilizar para reducir el prurito en un mamífero que tenga colestasis intrahepática gestacional. La composición para uso de la invención se puede utilizar en un método para prevenir el prurito en un mamífero con riesgo de contraer colestasis intrahepática gestacional.
- 30 La composición para uso de la invención se puede utilizar en métodos para reducir y/o prevenir el riesgo para el feto en mamíferos con riesgo de contraer o tener colestasis intrahepática gestacional.
- Un objeto primario de la invención es proporcionar bacterias, p. ej., bacterias probióticas, con capacidad de desconjugación/hidrólisis de los ácidos biliares y 7-epimerización para su uso en el tratamiento de la colestasis intrahepática gestacional. Se utilizan dos o más cepas bacterianas diferentes que ejercen juntas dichas acciones.
- 35 Como la epimerización incluye dos reacciones, oxidación del grupo 7 $\alpha$ -hidroxilo por una 7 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) y reducción estereoespecífica del grupo funcional 7-ceto por una 7 $\beta$ -HSDH, es otro objeto de la invención elegir dos cepas o especies bacterianas probióticas diferentes, una que comprenda la actividad enzimática 7 $\alpha$ -HSDH y la otra que comprenda la actividad enzimática 7 $\beta$ -HSDH para obtener la reacción de 7-epimerización. En otro objeto de la invención, la composición para uso de la invención comprende además una bacteria probiótica reductora de sulfato. En algunas realizaciones, la invención comprende varias cepas bacterianas para uso de la
- 40 invención que ejercen juntas las acciones descritas anteriormente.
- La gran mayoría de las sales biliares naturales están conjugadas, más habitualmente con glicina o taurina. Estas sales biliares conjugadas, cuando están presentes en el intestino delgado, se reabsorben activamente a través del
- 45 transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT) ubicado en el íleon. Los ácidos biliares desconjugados no se reabsorben activamente de esta manera y una proporción de ellos eventualmente se excretará en la materia fecal. Además, los ácidos biliares desconjugados son más hidrófobos que sus homólogos conjugados, por lo tanto, se reabsorben menos a través del intestino, lo que también da lugar a una mayor excreción en la materia fecal. En otras palabras, la desconjugación de los ácidos biliares (también denominada en el presente documento
- 50 hidrólisis de los ácidos biliares) reduce la recirculación enterohepática de los ácidos biliares y, de esta manera, reduce la reserva total de ácidos biliares, incluidos, por ejemplo, los niveles séricos o plasmáticos de los ácidos biliares. Los conjugados de glicina generalmente están presentes en una proporción mayor (3: 1) que los conjugados de taurina en la bilis humana. Por lo tanto, una cepa o especie bacteriana de la composición para uso de la invención comprende actividad enzimática hidrolizante. En algunas realizaciones, la enzima hidrolizante o la actividad de desconjugación de
- 55 los ácidos biliares de la cepa bacteriana pueden tener una mayor afinidad por los conjugados de glicina que, p. ej., los conjugados de taurina. Por lo tanto, aunque no se desea quedar ligados a teoría alguna, se cree que es la capacidad de las cepas bacterianas para lograr o estimular la desconjugación de los ácidos biliares lo que da lugar a una reducción de la reabsorción o un aumento de la excreción de dichos ácidos biliares, lo que a su vez da lugar a la reducción de los niveles séricos de los ácidos biliares. Las cepas con esta actividad encuentran, por lo tanto, utilidad
- 60 terapéutica en enfermedades o trastornos caracterizados por niveles séricos elevados de los ácidos biliares.
- En algunos aspectos, la cepa bacteriana hidrolizante (o cepa que comprenda actividad de desconjugación de los ácidos biliares) puede comprender una cepa de *Bifidobacterium*, por ejemplo, *Bifidobacterium longum*, por ejemplo, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.
- 65

Una bifidobacteria hidrolizante (u otra especie o cepa bacteriana que comprenda actividad de desconjugación/hidrólisis de los ácidos biliares como se describe en otro lugar en el presente documento) de la composición para uso de la invención se puede administrar a un mamífero junto con un prebiótico, por ejemplo, que mejore la actividad de las bifidobacterias (u otras bacterias). Un prebiótico puede ser, pero no se limita a, inulina, almidón, fructooligosacáridos (FOS) o galactooligosacáridos (GOS).

El ácido ursodesoxicólico (AUDC) se ha utilizado para el tratamiento de la CIG desde hace algún tiempo. La absorción del ácido ursodesoxicólico es lenta e incompleta debido a su escasa solubilidad e inhibe competitivamente la absorción de otros ácidos biliares. Varias especies de bacterias pueden convertir el ácido ursodesoxicólico en ácido ursodesoxicólico mediante una reacción de 7-epimerización. Por ello, en lugar de agregar ácido ursodesoxicólico, los inventores utilizan la actividad enzimática de las bacterias y su capacidad para cambiar la composición de los ácidos biliares. Esto provocará, por ejemplo, una reducción de la cantidad de ácidos biliares en el torrente sanguíneo. También se pueden producir niveles reducidos de ácido litocólico. La epimerización incluye dos reacciones, la oxidación del grupo 7 $\alpha$ -hidroxilo por una 7 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) y la reducción estereoespecífica del grupo funcional 7-ceto por una 7 $\beta$ -HSDH.

Las cepas bacterianas que tienen acción de 7-epimerización incluyen, entre otras, bacterias tales como *Clostridium*, p. ej., *Clostridium baratii*, p. ej. *Clostridium baratii* ATCC 27638. En otro aspecto de la invención, se pueden elegir una segunda y una tercera especies bacterianas, una capaz de reducir de forma estereoespecífica el grupo funcional 7-ceto mediante una 7 $\beta$ -HSDH y la otra que tiene actividad enzimática 7 $\alpha$ -HSDH. Los ejemplos no limitativos de cepas bacterianas probióticas que tienen actividad enzimática 7 $\alpha$ -HSDH incluyen especies de *Bacteroides*, por ejemplo, *Bacteroides fragilis* (p. ej., *Bacteroides fragilis* ATCC 25285) y *Bacteroides thetaiotaomicron* (p. ej., *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079) y un ejemplo no limitativo de una cepa que tiene actividad enzimática 7 $\beta$ -HSDH incluye especies de *Collinsella*, por ejemplo, *Collinsella aerofaciens* (p. ej., *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986).

Como puede haber más ácidos biliares en forma desconjugada debido a la administración de una cepa bacteriana hidrolizante, puede producirse un aumento de la concentración de taurina libre. Por lo tanto, en un objeto adicional de la invención, la composición para uso comprende además una bacteria reductora de sulfato, evitando de esta manera los efectos negativos del aumento de la taurina. Dichas bacterias reductoras de sulfato incluyen, entre otras, especies de *Desulfovibrio*, por ejemplo, *Desulfovibrio piger* (p. ej., *Desulfovibrio piger* DSM 32187). En algunas realizaciones, se prefiere el uso de dichas bacterias reductoras de sulfato.

### Descripción detallada de la invención

Por lo tanto, la presente invención se refiere, de forma general, a una composición de cepas bacterianas probióticas para usar en un método para tratar o prevenir (reducir el riesgo de) la colestasis intrahepática, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional. Dichos tratamientos se basan en la selección de dos o más cepas (o especies) bacterianas para proporcionar una composición que comprenda actividad de desconjugación (o hidrólisis) de ácidos biliares y actividad de 7-epimerización. Las dos o más cepas para usar en los métodos terapéuticos tendrán actividad tanto de desconjugación de ácidos biliares como de 7-epimerización, proporcionada por medio de una combinación de cepas. Dichas dos o más cepas son para usar en un método para tratar o prevenir (reducir el riesgo de) la colestasis intrahepática, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional. Dichos tratamientos terapéuticos se basan generalmente en la capacidad de dichas cepas bacterianas para modular y preferiblemente reducir el nivel sérico de los ácidos biliares, p. ej., modular (p. ej., reducir) el nivel de ácidos biliares, p. ej., el nivel de ácidos biliares en fluidos corporales, tal como el nivel sérico de ácidos biliares.

Los anteriores y otros aspectos de la presente invención se describirán ahora en mayor detalle con respecto a la descripción y los métodos proporcionados en la presente memoria. Debe apreciarse que la invención puede realizarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en la presente descripción. Más bien, estas realizaciones se proporcionan de tal modo que la presente descripción sea minuciosa y completa, y transmita completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

La terminología utilizada para describir la invención en la presente descripción únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa de la invención.

Como se usa en la descripción de las realizaciones de la invención, se pretende que las formas en singular “un”, “una” y “el/la” también incluyan las formas en plural, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. También, como se usa en la presente descripción, “y/o” se refiere y abarca todas y cada una de las posibles combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados.

Además, el término “aproximadamente”, como se utiliza en la presente memoria cuando se refiere a un valor medible, tal como una cantidad de un compuesto, dosis, tiempo, temperatura y similares, se refiere a variaciones del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 % o incluso 0,1 % de la cantidad especificada.

Cuando se usa un intervalo (p. ej., un intervalo de x a y) significa que el valor medible es un intervalo de aproximadamente x a aproximadamente y, o cualquier intervalo en este, tal como de aproximadamente  $x_1$  a aproximadamente  $y_1$ .

5 Se entenderá, además, que las expresiones “comprende” y/o “comprendiendo/que comprende”, cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de características, elementos integrantes, etapas, operaciones, elementos y/o componentes, pero no excluyen la presencia o adición de otra u otras características, elementos integrantes, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos adicionales.

10 En algunas realizaciones de la invención, las composiciones, por ejemplo, no contienen ningún ingrediente o componente activo más allá de los especificados, p. ej., consisten en esos ingredientes o componentes activos. Por lo tanto, por ejemplo, cuando en el presente documento se describen composiciones que comprenden cepas bacterianas particulares, en algunas realizaciones las composiciones consistirán en esas cepas bacterianas y no contendrán ninguna otra cepa bacteriana. En otras realizaciones, dichas composiciones no contendrán ningún  
15 ingrediente o componente activo adicional.

Salvo que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones, incluidos los términos y expresiones técnicas y científicas, usados en la descripción tienen el mismo significado que entendería comúnmente el experto en la técnica a la que pertenece la presente invención.

20 La “cantidad eficaz” o dosis como se utiliza en la presente memoria se refiere a una cantidad de una composición bacteriana de la invención que es suficiente para producir un efecto deseado, que puede ser un efecto terapéutico y/o beneficioso. La cantidad o dosis eficaz variará con la edad, el estado general del sujeto, la gravedad de la afección que se esté tratando, la composición particular administrada, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier  
25 tratamiento concomitante, el vehículo farmacéuticamente aceptable utilizado y factores similares dentro del conocimiento y experiencia de los expertos en la técnica. Según sea apropiado, un experto en la técnica puede determinar una “cantidad eficaz” o dosis en cualquier caso individual por referencia a los textos y la bibliografía pertinentes y/o utilizando experimentación rutinaria.

30 Por las expresiones “tratar”, “que trata” o “tratamiento de” (y las variaciones gramaticales de las mismas) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto se reduce, mejora o se mitiga al menos parcialmente y/o que se consigue algún alivio, mitigación o disminución de al menos un síntoma clínico y/o que hay un retraso en la progresión de la enfermedad o el trastorno.

35 Como quedará claro a partir de la descripción en otra parte del presente documento, las composiciones para uso de la presente invención son adecuadas para reducir el riesgo de enfermedad o para prevenir enfermedades así como para tratar las enfermedades de forma activa (por ejemplo, tratamiento de enfermedades preexistentes), en donde la enfermedad es colestasis intrahepática, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional. Por tanto, el tratamiento profiláctico también está abarcado por la invención.

40 Dichos aspectos preventivos (o protectores) pueden llevarse a cabo convenientemente en sujetos sanos, normales o en riesgo y pueden incluir tanto la prevención completa como la prevención significativa. De manera similar, la prevención significativa puede incluir el escenario en donde se reduce la gravedad de la enfermedad o los síntomas de la enfermedad (p. ej., se reduce de manera medible o significativa) en comparación con la gravedad o los síntomas  
45 esperados si no se administrara ningún tratamiento.

Una cantidad “terapéuticamente eficaz”, como se utiliza en la presente memoria, es una cantidad que es suficiente para tratar (según se define en la presente memoria) al sujeto. Los expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no tienen por qué ser completos o curativos, siempre que se proporcione algún beneficio al sujeto.

50 Como se utilizan en la presente memoria, los términos “modulación”, “modular”, “modula” o variaciones gramaticales de los mismos, significan una alteración, por ejemplo, de la cantidad o el nivel de un componente en un fluido corporal (p. ej., sangre, suero y similares) de un sujeto, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende al menos dos especies o cepas bacterianas, p. ej., bacterianas probióticas, aumentando  
55 o reduciendo de esta manera la cantidad o el nivel del componente. En realizaciones de la invención donde se modulan los niveles de ácidos biliares en los fluidos corporales, p. ej., en sangre o suero, entonces, preferiblemente, se reduce o disminuye la cantidad o el nivel de los ácidos biliares.

60 Los términos “aumentar”, “aumentando”, “aumentado”, “mayor”, “mejorar”, “mejorado”, “mejorando” y “mejora” (y variaciones gramaticales de los mismos), como se utilizan en la presente memoria, describen una elevación, por ejemplo, una elevación de la cantidad o el nivel de un componente en un fluido corporal (p. ej., sangre, suero y similares) de un sujeto (p. ej., una elevación de al menos aproximadamente 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 % o más). Este aumento de la expresión, la cantidad o el nivel, se puede observar, por ejemplo, comparando la cantidad o el nivel de un  
65 componente en un fluido corporal de un sujeto con la cantidad o el nivel del mismo componente en el fluido corporal de un sujeto de control al que, por ejemplo, no se le ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz de una

composición que comprende al menos dos especies o cepas bacterianas, p. ej., bacterianas probióticas, como se describen en la presente memoria.

Como se utilizan en la presente memoria, los términos “reducir”, “reducido”, “reduciendo”, “reducción”, “disminuir”, “suprimir” y “bajar” (y variaciones gramaticales de los mismos), describen, por ejemplo, una disminución en la cantidad o el nivel de un componente en un fluido corporal (p. ej., sangre, suero y similares) de un sujeto, p. ej., en comparación con un control como se describe en la presente memoria. Por lo tanto esta disminución de la cantidad o el nivel se puede observar, por ejemplo, comparando la cantidad o el nivel de un componente en un fluido corporal de un sujeto con la cantidad o el nivel del mismo componente en el fluido corporal de un sujeto de control al que, por ejemplo, no se le ha administrado una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende al menos dos especies o cepas bacterianas probióticas como se describen en la presente memoria. En realizaciones preferidas de la invención, se obtienen disminuciones de los niveles de ácidos biliares en un fluido corporal de un sujeto (p. ej., los niveles séricos de los ácidos biliares), p. ej., en comparación con un sujeto de control.

Una persona experta en la técnica identificaría fácilmente a sujetos de control adecuados que podrían incluir a un sujeto no tratado o tratado con placebo (o una población del mismo) o podrían incluir un nivel de un parámetro particular, p. ej., nivel de los ácidos biliares, en el mismo sujeto individual medido en un momento anterior, tal como antes del tratamiento (p. ej., comparación con un nivel “de referencia” en ese sujeto). Preferiblemente, el aumento o la disminución (según corresponda) será significativo, por ejemplo, clínica o estadísticamente significativo, por ejemplo, con un valor de probabilidad de  $\leq 0,05$ , en comparación con un nivel o valor de control adecuado.

Un “sujeto” de la invención incluye cualquier animal que tenga o sea susceptible a la colestasis intrahepática (o cualquier otra enfermedad o trastorno para tratamiento mediante la presente invención como se describe en otra parte del presente documento). En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un mamífero. Los sujetos mamíferos incluyen, entre otros, seres humanos, primates no humanos (p. ej., gorila, mono, babuino y chimpancé, etc.), perros, gatos, cabras, caballos, cerdos, vacas, ovejas y similares, y animales de laboratorio (p. ej., ratas, cobayas, ratones, jerbos, hámsteres y similares). Los sujetos adecuados incluyen tanto hombres como mujeres y sujetos de cualquier edad, incluidos los sujetos embrionarios (p. ej., en el útero, en el óvulo o fetales), infantiles, juveniles, adolescentes, adultos y geriátricos. En algunas realizaciones, un sujeto de la presente invención es un ser humano. En realizaciones representativas, el sujeto es una mujer humana. En otras realizaciones representativas, el sujeto es una mujer humana embarazada y/o su feto o bebé por nacer, que puede padecer efectos adversos a causa de la colestasis intrahepática (u otras enfermedades o trastornos como se describen en la presente memoria).

Un “sujeto” o un “sujeto necesitado” de los métodos de la invención puede ser un sujeto que se sabe que tiene o que se sospecha que tiene o está en riesgo de contraer colestasis intrahepática, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis gestacional. En realizaciones representativas, un sujeto o un sujeto necesitado puede ser un sujeto que se sabe que tiene o se sospecha que tiene o está en riesgo de contraer colestasis intrahepática gestacional (CIG). Un sujeto o un sujeto necesitado también puede ser un sujeto que se sabe que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de contraer prurito (en particular, prurito que surge como un síntoma de la CIG). En algunas realizaciones, un sujeto o sujeto necesitado puede ser un sujeto que se sabe que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de contraer cálculos biliares, dispepsia biliar, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hepatitis crónica activa, hepatitis C y/u otras hepatopatías relacionadas.

Las composiciones para uso de la invención también se pueden usar para tratar, aliviar (reducir o mitigar) o prevenir (reducir el riesgo de) síntomas o efectos secundarios de la colestasis intrahepática gestacional, por ejemplo, el prurito.

En realizaciones preferidas, un sujeto o sujeto necesitado es un sujeto que se sabe que tiene, o se sospecha que tiene, o está en riesgo de contraer colestasis intrahepática, en particular colestasis intrahepática gestacional. Los métodos de la invención se pueden usar para tratar o reducir el riesgo de colestasis intrahepática gestacional asociada con o caracterizada por un nivel de ácidos biliares alterado y preferiblemente aumentado, en particular, el nivel sérico de ácidos biliares en suero, p. ej., niveles séricos de ácidos biliares de  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$  (p. ej., de 10 a  $39 \mu\text{mol/l}$ ) o  $\geq 40 \mu\text{mol/l}$  (p. ej., de 40 a  $79 \mu\text{mol/l}$ ) o  $\geq 80 \mu\text{mol/l}$ . En algunas realizaciones, se prefieren sujetos con niveles séricos de ácidos biliares de  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$  y  $< 40 \mu\text{mol/l}$ .

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión “administración concomitante” o “administración combinada” de una composición, agente terapéutico o fármaco conocido (p. ej., prebiótico) con una composición bacteriana para uso de la presente invención significa la administración de un medicamento o fármaco conocido y, además, las dos o más especies o cepas bacterianas de la composición para uso de la invención en un momento tal que tanto el fármaco conocido como las especies o cepas bacterianas tengan un efecto terapéutico. En algunos casos, este efecto terapéutico será sinérgico. Dicha administración concomitante puede implicar la administración simultánea (es decir, al mismo tiempo, en paralelo a la vez), previa o posterior (p. ej., secuencial) del fármaco conocido con respecto a la administración de una composición bacteriana para uso de la presente invención. Dicha administración concomitante o combinada también puede referirse a la administración de un compuesto (p. ej., cepas o especies bacterianas) para uso de la invención a través de diferentes rutas de administración por separado (p. ej., con al menos aproximadamente 2 o más horas de diferencia), secuencialmente (p. ej., dentro de aproximadamente 2 horas, p. ej., aproximadamente 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 11 min, 12 min, 13 min, 14 min,

15 min, 16 min, 17 min, 18 min, 19 min, 20 min, 21 min, 22 min, 23 min, 24 min, 25 min, 26 min, 27 min, 28 min, 29 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min, 60 min, 65 min, 70 min, 75 min, 80 min, 85 min, 90 min, 95 min, 100 min, 105 min, 110 min, 115 min y similares, y cualquier rango o valor en los mismos) y/o en paralelo al mismo tiempo (p. ej., simultáneamente) para lograr una cantidad o dosificación eficaz. Una persona experta en la técnica no tendría dificultad para determinar el momento, la secuencia y las dosis de administración adecuados para fármacos y composiciones bacterianas particulares para el uso de la presente invención.

Los “probióticos” son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedador.

La colestasis intrahepática gestacional (CIG) usualmente aparece durante el último trimestre del embarazo. Puede desencadenar un prurito intenso, especialmente en las manos y los pies (frecuentemente sin erupción cutánea), pero rara vez es motivo de preocupación para la salud de la madre a largo plazo. Sin embargo, puede causar complicaciones graves para el feto, tales como parto antes de término (premature), sufrimiento fetal, inhalación de meconio durante el parto, que dé lugar a dificultades respiratorias (p. ej., síndrome de aspiración de meconio) y también muerte intrauterina o muerte fetal. Por tanto, los métodos y usos de la invención pueden tratar o reducir el riesgo de tales complicaciones en el feto, así como tratar o reducir el riesgo de CIG y síntomas de la misma en la madre. Las mujeres que han padecido previamente CIG tienen mayor riesgo de contraer CIG durante sus embarazos posteriores; además, las mujeres con familiares que han tenido CIG tienen mayor riesgo de contraer CIG. Otros factores de riesgo asociados con la aparición de CIG son embarazos múltiples, antecedentes de daño hepático y tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV). Estas mujeres son ejemplos adicionales de sujetos o sujetos necesitados (p. ej., sujetos en riesgo) que pueden ser tratados según la presente invención.

Los criterios de diagnóstico de la CIG han variado a lo largo del tiempo y han incluido ictericia clínica, gravedad del prurito y niveles elevados de ácidos biliares, generalmente en la sangre, p. ej., el suero o el plasma. Hoy en día, el parámetro de laboratorio más adecuado para el diagnóstico de la CIG es el aumento de los ácidos biliares ( $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ ) junto con prurito sin causa aparente. En un estudio de cohorte prospectivo realizado en Suecia se descubrió que la incidencia de la CIG era del 1,5 %. Una forma leve de CIG (81 % de los pacientes con CIG) se puede definir como niveles de ácidos biliares  $< 40 \mu\text{mol/l}$  (pero  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$ ) y una forma grave de CIG (19 % de los pacientes con CIG) se define como niveles de ácidos biliares  $\geq 40 \mu\text{mol/l}$ , lo que también se asocia con una mayor tasa de complicaciones fetales. La probabilidad de complicaciones fetales aumentó entre un 1 % y un 2 % por  $\mu\text{mol/l}$  de aumento total de los ácidos biliares. Cualquier forma de CIG puede tratarse con los métodos de la presente invención. Por ejemplo, en una realización preferida, se tratan formas leves de CIG como se ha definido anteriormente. En otras realizaciones, se tratan formas graves de CIG como se ha definido anteriormente.

En el último trimestre, las hormonas del embarazo, especialmente la progesterona, hacen que el tejido muscular se relaje, lo que preparará el canal del parto antes del nacimiento. Esto también puede afectar al correcto funcionamiento de la vesícula biliar, que tiene la función de almacenar la bilis.

Los ácidos/sales biliares desempeñan un papel fundamental en la activación de las enzimas digestivas y en la solubilización de grasas y vitaminas liposolubles y están implicados en enfermedades hepáticas, biliares e intestinales. Los ácidos biliares se sintetizan en el hígado mediante una vía de múltiples orgánulos en varias etapas. Las sales biliares son excretadas por los hepatocitos hacia los canalículos para formar la bilis. Los canalículos drenan hacia los conductos hepáticos derecho e izquierdo y la bilis fluye hacia la vesícula biliar. La bilis se libera de la vesícula biliar y viaja al duodeno, donde contribuye al metabolismo y la degradación de las grasas.

Los ácidos biliares comunes se diferencian principalmente en el número y la orientación de los grupos hidroxilo en el anillo de esterol. La expresión ácido biliar primario se refiere a los sintetizados *de novo* por el hígado. En seres humanos, los ácidos biliares primarios incluyen el ácido cólico (ácido  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ ,  $12\alpha$ -trihidroxi- $5\beta$ -colánico) (“AC”) y el ácido quenodesoxicólico (ácido  $3\alpha$ ,  $7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta$ -colánico) (“ACDC”). La deshidroxilación de estos ácidos biliares por bacterias intestinales produce los ácidos biliares secundarios más hidrófobos, el ácido desoxicólico (ácido  $3\alpha$ ,  $12\alpha$ -dihidroxi- $5\beta$ -colánico) (“ADC”) y el ácido litocólico (ácido  $3\alpha$ -hidroxi- $5\beta$ -colánico) (“ALC”). Estos cuatro ácidos biliares AC, ACDC, ADC y ALC constituyen generalmente más del 99 por ciento de la reserva de sales biliares en los seres humanos. Los ácidos biliares secundarios que han sido metabolizados por el hígado se denominan en ocasiones ácidos biliares terciarios.

Los ácidos cetobiliares se producen de forma secundaria en los seres humanos como consecuencia de la oxidación de los grupos hidroxilo de los ácidos biliares, en particular el grupo 7-hidroxilo, por las bacterias del colon. Sin embargo, el hígado reduce rápidamente los ácidos cetobiliares a los correspondientes ácidos  $\alpha$  o  $\beta$ -hidroxibilares. Por ejemplo, el ácido cetobiliar correspondiente de un ACDC es el ácido 7-cetolítico y uno de sus productos de reducción con el ácido biliar beta-hidroxil correspondiente es el ácido ursodesoxicólico (ácido  $3\alpha$ - $7\beta$ -dihidroxi- $5\beta$ -colánico) (“AUDC”), un ácido biliar terciario.

El AUDC, un componente importante de la bilis de oso, se ha utilizado como agente farmacéutico para el tratamiento y la protección contra muchos tipos de hepatopatías durante poco más de 70 años. Sus usos medicinales incluyen la disolución de cálculos biliares radiotranslúcidos, el tratamiento de la dispepsia biliar, principalmente cirrosis biliar,

colangitis esclerosante primaria, hepatitis crónica activa y hepatitis C. En otras especies de mamíferos, los ácidos biliares que contienen un grupo 6 $\beta$ -hidroxilo, que se encuentran en ratas y ratones, se conocen como ácido muricólico y los ácidos 6 $\alpha$ -hidroxbiliares producidos por los cerdos se denominan ácido hiocólico y ácidos hiodesoxicólicos. Los ácidos 23-hidroxbiliares de los mamíferos acuáticos se conocen como ácidos focécólico y focedesoxicólico.

Típicamente, más del 99 por ciento de las sales biliares de origen natural secretadas en la bilis humana están conjugadas. Los conjugados son ácidos biliares en que un segundo sustituyente orgánico (p. ej., glicina, taurina, glucuronato, sulfato o, de forma infrecuente, otros sustituyentes) está unido al ácido carboxílico de la cadena lateral o a uno de los grupos hidroxilo anulares mediante un enlace éster, éter o amida. Los ácidos biliares conjugados son

menos citotóxicos que los ácidos biliares libres.

Alrededor del 95 % de las sales biliares que se liberan en el intestino delgado se reabsorben de forma activa. La reabsorción de sales biliares, en particular de los ácidos biliares conjugados, se produce a través del transportador apical de ácidos biliares dependiente de sodio (ASBT) presente en la membrana del borde en cepillo del enterocito. Una vez que las sales biliares alcanzan la membrana basolateral, son transportadas a la sangre. Un pequeño porcentaje de las sales biliares no se reabsorbe de forma activa y experimenta desconjugación por parte de la microbiota intestinal antes de ser absorbidas o convertidas en ácidos biliares secundarios, desoxicolato (DCA, de colato) y litocolato y ursodesoxicolato (ALC y AUDC, de quenodesoxicolato). Los ácidos biliares secundarios se absorben pasivamente o se excretan en la materia fecal. Los ácidos y sales biliares primarios y secundarios absorbidos se transportan de vuelta al hígado, donde la mayoría, pero no todos, se transportan de forma activa a los hepatocitos. Una vez en el hígado, los ácidos biliares se reconjugan y, a continuación, se vuelven a secretar junto con las sales biliares recién sintetizadas. Este proceso general constituye un ciclo de lo que se llama circulación enterohepática. Dentro de la luz intestinal, las concentraciones de ácidos biliares varían y la mayor parte de la recaptación se produce en el intestino distal. Los ácidos/sales biliares alteran el crecimiento de la flora bacteriana en el intestino. La reserva de ácidos biliares contiene alrededor de 2 a 4 g de ácidos biliares y esta reserva se recicla a través de la circulación enterohepática del orden de seis a diez veces al día. De la reserva total de sales biliares, alrededor de 0,2 a 0,6 g se excretan en la materia fecal cada día. Esta fracción perdida de sales biliares se repone mediante la síntesis *de novo* de ácidos biliares hepáticos a partir del colesterol.

La presente invención se basa en el principio de que las combinaciones de determinadas bacterias podrían disminuir el nivel sérico de los ácidos biliares y aliviar el prurito en mujeres que padezcan colestasis intrahepática gestacional. Por lo tanto, la presente invención se refiere a composiciones para usar para tratamientos probióticos en mamíferos con riesgo de contraer o tener colestasis intrahepática, o que se sospeche que la tengan, en donde la colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional.

Las composiciones para uso de la invención pueden modular (p. ej., reducir) el nivel sérico de ácidos biliares y tratar o reducir el prurito o el riesgo de prurito en un sujeto, p. ej., mamífero, que tenga colestasis intrahepática en donde los mamíferos o sujetos tienen riesgo de contraer o tener colestasis intrahepática gestacional, o se sospecha que la tienen.

La composición para uso de la invención que comprende bacterias probióticas que tienen capacidad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares y 7-epimerización es para su uso en el tratamiento de la colestasis intrahepática gestacional. La composición para usar comprende una combinación de varias cepas o especies bacterianas (es decir, más de una, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6 y especies o cepas bacterianas similares) que ejercen o proporcionan juntas las capacidades descritas anteriormente.

Como se describe en otra parte del presente documento, los ácidos biliares desconjugados no son reabsorbidos de forma activa por el ASBT y una proporción de ellos se excretará finalmente en la materia fecal. Además, los ácidos biliares desconjugados son más hidrófobos que sus homólogos conjugados, por lo tanto, se reabsorben menos a través del intestino, lo que también da lugar a una mayor excreción en la materia fecal. En otras palabras, la desconjugación de los ácidos biliares reduce la recirculación enterohepática de los ácidos biliares, reduciendo de esta manera la reserva total de ácidos biliares. La absorción del ácido ursodesoxicólico (AUDC) es lenta e incompleta debido a su escasa solubilidad e inhibe competitivamente la absorción de otros ácidos biliares. Varias especies de bacterias pueden convertir el ácido quenodesoxicólico en ácido ursodesoxicólico mediante una reacción de 7-epimerización. La epimerización incluye dos reacciones, la oxidación del grupo 7 $\alpha$ -hidroxilo por una 7 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) y la reducción estereoespecífica del grupo funcional 7-ceto por una 7 $\beta$ -HSDH.

En una realización, una combinación de cepas de bacterias probióticas puede comprender una cepa con capacidad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares y otra cepa que tiene capacidad de 7-epimerización. En algunas realizaciones, la cepa bacteriana hidrolizante puede comprender *Bifidobacterium*, p. ej., *Bifidobacterium longum*, p. ej., *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Los conjugados de glicina generalmente tienen una proporción mayor (3:1) que los conjugados de taurina en la bilis humana; por lo tanto, en algunas realizaciones, la actividad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares de la cepa bacteriana puede tener una mayor afinidad o actividad para los conjugados de glicina, p. ej., que para los conjugados de taurina. En algunas realizaciones, una cepa bacteriana que tiene actividad enzimática 7-epimerizante puede comprender *Clostridium*, p. ej., *Clostridium baratii*, p. ej., *Clostridium baratii* ATCC 27638.



En otra realización, dicha combinación de cepas bacterianas probióticas puede comprender una cepa y/o especie que comprenda la actividad enzimática de desconjugación/hidrólisis de los ácidos biliares y más de una cepa o especie para proporcionar la actividad enzimática 7-epimerizante, por ejemplo, otra cepa y/o especie que comprenda la actividad enzimática de 7 $\alpha$ -HSDH y otra cepa y/o especie más que comprenda la actividad enzimática de 7 $\beta$ -HSDH. La epimerización de los grupos hidroxilo de los ácidos biliares es el cambio reversible en la estereoquímica de la configuración  $\alpha$  a la configuración  $\beta$  (o viceversa). En el contexto de la presente invención, la actividad de 7-epimerización puede dar lugar al cambio reversible de ACDC a AUDC. El alcance de la oxidación y la reducción reversible de los grupos hidroxilo de los ácidos biliares por parte de la HSDH depende en parte del potencial redox del medio ambiente en el intestino. En la superficie de la mucosa se encuentra un potencial redox superior, que favorece la oxidación por parte de la 7 $\alpha$ -HSDH y, en la luz intestinal, se encuentra un potencial redox inferior, que favorece la reducción por parte de la 7 $\beta$ -HSDH. Cuando se utilizan dos cepas diferentes (una con actividad enzimática 7 $\alpha$ -HSDH y la otra con actividad enzimática 7 $\beta$ -HSDH) para obtener la reacción de 7-epimerización, se aprovecha la ventaja de utilizar el potencial redox variable. En algunas realizaciones, una cepa/especie bacteriana hidrolizante puede comprender *Bifidobacterium*, p. ej., *Bifidobacterium longum*, p. ej., *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. En algunas realizaciones, las especies o cepas bacterianas ilustrativas que tienen actividad enzimática 7 $\alpha$ -HSDH pueden incluir *Bacteroides*, p. ej., *Bacteroides fragilis*, p. ej., *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Bacteroides thetaiotaomicron*, p. ej., *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079. La *Collinsella*, p. ej., *Collinsella aerofaciens*, p. ej., *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986, es un ejemplo no limitante de una cepa o especie con actividad enzimática 7 $\beta$ -HSDH.

En algunas realizaciones, como puede haber más ácidos biliares en forma desconjugada debido a la administración de una cepa/especie bacteriana hidrolizante, es posible que se produzca un aumento de la concentración de taurina libre. Algunas bacterias patógenas tienen la capacidad única de metabolizar la taurina en sulfuro de hidrógeno, H<sub>2</sub>S, que es muy tóxico. Por lo tanto, en una realización adicional de la invención, la composición para uso de la invención puede también comprender una bacteria reductora de sulfato para superar la actividad metabólica de dichas bacterias patógenas, evitando así los efectos negativos de la taurina liberada. El *Desulfovibrio*, p. ej., *Desulfovibrio piger*, p. ej., *Desulfovibrio piger* DSM 32187, es un ejemplo de una cepa con capacidad reductora de sulfato.

En una realización de la invención, un ejemplo de una combinación de cepas/especies de bacterias probióticas puede ser *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Collinsella* o *Bifidobacterium* y *Clostridium*. Los ejemplos de bacterias adecuadas incluyen una o más o todas (p. ej., 2 o 3) de *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides fragilis* y *Collinsella aerofaciens*, o una o más o todas (p. ej., 2 o 3) de *Bifidobacterium longum*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Collinsella aerofaciens*. Los ejemplos de bacterias adecuadas también incluyen uno o ambos de *Bifidobacterium longum* y *Clostridium baratii*. Cualquiera de estas combinaciones puede también comprender bacterias *Desulfovibrio*, p. ej., *Desulfovibrio piger*.

Los ejemplos preferidos de cepas para usar en las combinaciones anteriores son una o más o todas (p. ej., 2, 3 o 4) de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986, *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079, *Clostridium baratii* ATCC 27638 o *Desulfovibrio piger* DSM 32187.

En una realización de la invención, un ejemplo de una combinación de cepas/especies de bacterias probióticas puede ser *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187. En una realización adicional de la invención, un ejemplo de una combinación bacteriana probiótica comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187. En otra realización más de la invención, una combinación de bacterias probióticas comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Clostridium baratii* ATCC 27638 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187. Otros ejemplos serían estas combinaciones sin *Desulfovibrio piger* DSM 32187.

Las composiciones para usar que comprenden las combinaciones anteriores de cepas o especies bacterianas proporcionan un aspecto adicional más de la invención. Tales composiciones pueden tomar la forma de composiciones farmacéuticas o composiciones nutricionales. Se proporcionan algunas composiciones ilustrativas en los ejemplos.

Las bifidobacterias (u otras bacterias como se ha analizado anteriormente) de la composición para uso de la invención se pueden administrar a un mamífero junto con un prebiótico que puede mejorar la actividad de las bifidobacterias (u otras bacterias). Un prebiótico puede incluir inulina. Otros ejemplos de prebióticos se describen en otra parte del presente documento.

En una realización de la invención, una combinación de cepas de bacterias probióticas como se describe en el presente documento puede utilizarse en mamíferos (o sujetos) con riesgo de contraer CIG. Los factores de riesgo incluyen haber padecido previamente CIG, familiares que hayan tenido CIG (es decir, factores genéticos), embarazos múltiples, antecedentes de daño hepático y tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV). En algunas realizaciones, la administración puede ser aproximadamente una, dos o tres veces/día y el tratamiento puede comenzar cuando la mamífera quede embarazada o preñada. La administración también puede iniciarse cuando la mamífera esté en proceso de quedar embarazada o preñada, si dicha mamífera tiene riesgo de contraer CIG. En otra realización, la administración puede ser aproximadamente una, dos o tres veces/día y el tratamiento puede comenzar en el segundo trimestre (alrededor de la semana 13 de embarazo).

En otra realización de la invención, una combinación de cepas de bacterias probióticas como se describe en el presente documento puede utilizarse en un mamífero (o sujeto) que tenga CIG. En algunas realizaciones, el grupo de tratamiento comprende un mamífero que tenga niveles de ácidos biliares que superen los 10  $\mu\text{mol/l}$  (o 40  $\mu\text{mol/l}$  u 80  $\mu\text{mol/l}$ ) y prurito inexplicable, o pacientes con CIG leve o grave como se describe en otra parte del presente documento. En algunas realizaciones, la administración puede ser una, dos o tres veces/día y durar uno, dos o tres meses o mientras dicha mamífera esté embarazada o preñada o hasta que nazca la cría o el bebé.

En algunas realizaciones de la invención, una combinación de cepas de bacterias probióticas como se describe en el presente documento puede utilizarse en un mamífero (o sujeto) con riesgo de contraer o tener CIG (p. ej., grupos de sujetos con CIG como se definen en otra parte del presente documento) para disminuir el riesgo para el feto y/o el bebé. La disminución del riesgo para el feto puede incluir una disminución del riesgo de parto prematuro, inhalación de meconio durante el parto, lo que provoca dificultades respiratorias y/o también muerte intrauterina o muerte fetal.

En la invención, una combinación de cepas de bacterias probióticas como se describe en el presente documento se utiliza en la colestasis intrahepática que comprende la colestasis intrahepática gestacional. En algunas de dichas realizaciones, el grupo de tratamiento comprende un mamífero que tiene niveles elevados de ácidos biliares, p. ej., niveles de ácidos biliares, en particular niveles de ácidos biliares en suero, que superan los 10  $\mu\text{mol/l}$  (o 40  $\mu\text{mol/l}$  u 80  $\mu\text{mol/l}$ ), p. ej., niveles séricos de ácidos biliares de  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$  (p. ej., de 10 a 39  $\mu\text{mol/l}$  o  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$  y  $< 40 \mu\text{mol/l}$ ), o  $\geq 40 \mu\text{mol/l}$  (p. ej., de 40 a 79  $\mu\text{mol/l}$  o  $\geq 40 \mu\text{mol/l}$  y  $< 80 \mu\text{mol/l}$ ) o  $\geq 80 \mu\text{mol/l}$ .

Los productos o composiciones preferidos para su uso como se describe en el presente documento comprenden bacterias congeladas, criodesecadas, liofilizadas (p. ej., polvo liofilizado) o secas y están preferiblemente en un formato de dosis unitaria, p. ej., una cápsula (p. ej., cápsula de gelatina) o comprimido, gel o bolsita. Las relaciones y dosis apropiadas (p. ej., en forma de cantidad de bacterias o UFC) para usar en dichos productos, etc., se describen en otras partes del presente documento y en los ejemplos. Otros componentes también pueden incluirse en estos productos para su uso, etc., por ejemplo, conservantes (p. ej., glicerol), desecantes, estabilizantes, agentes gelificantes y/o crioprotectores. En algunas realizaciones, dichos componentes adicionales son agentes no naturales. En algunas realizaciones se incluirá un prebiótico. En otra parte del presente documento se describen ejemplos de prebióticos.

En una realización de la invención, una combinación de cepas de bacterias probióticas descrita en el presente documento puede estar en forma de cápsula o bolsita u otras formas adecuadas y puede administrarse por vía oral al mamífero (o sujeto). En algunas realizaciones, la administración puede ser una, dos o tres veces/día y durar uno, dos o tres meses o mientras dicho mamífero siga padeciendo la enfermedad que se trata.

Las dosis apropiadas de las especies o cepas para usar en la invención pueden elegirse en función de la enfermedad o afección para tratar, el modo de administración y la formulación de que se trate. Por ejemplo, se elige un régimen de dosificación y administración de manera que la combinación probiótica de bacterias administradas al sujeto según la presente invención pueda dar lugar a beneficios terapéuticos o para la salud. Se selecciona una dosis adecuada de cada bacteria de manera que se observe un beneficio terapéutico o para la salud cuando todas las cepas estén presentes. Por ejemplo, se pueden usar dosis diarias de una o todas las bacterias de  $10^4$  a  $10^{12}$ , por ejemplo, de  $10^5$  a  $10^{10}$ , o de  $10^6$  a  $10^8$ , o de  $10^7$  a  $10^9$  o de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC totales de bacterias. Una dosis diaria preferida de una o todas las bacterias es de alrededor de  $10^8$  o  $10^9$  UFC totales, p. ej., de  $10^7$  a  $10^{10}$ , o de  $10^8$  a  $10^{10}$  o de  $10^8$  a  $10^9$ . Dichas dosis pueden estar en forma de UFC/g o UFC/forma farmacéutica unitaria (p. ej., por bolsita, cápsula, comprimido, etc.).

En los ejemplos se proporcionan regímenes ilustrativos.

Los usos de la invención se pueden realizar en cualquier animal o sujeto o paciente. En algunas realizaciones, un animal o sujeto puede ser un mamífero. En realizaciones representativas, el animal o sujeto puede ser un ser humano.

Por lo tanto, se proporciona una composición para usar en un método para tratar o reducir el riesgo de colestasis intrahepática en un sujeto que lo necesite, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende al menos dos especies o cepas bacterianas que comprenden actividad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares y actividad de 7-epimerización, tratando o reduciendo de esta manera el riesgo de colestasis intrahepática en un sujeto que lo necesite.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos dos especies o cepas bacterianas que comprenden actividad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares y actividad de 7-epimerización para usar en un método para tratar o reducir el riesgo de colestasis intrahepática en un sujeto, en donde dicha colestasis intrahepática comprende la colestasis intrahepática gestacional.

La composición para usar puede modular el nivel de ácidos biliares, p. ej., nivel sérico de ácidos biliares, en un sujeto que lo necesite. En realizaciones particulares, el sujeto tiene o está en riesgo de contraer colestasis, colestasis intrahepática (p. ej., colestasis intrahepática gestacional), cálculos biliares, el tratamiento de la dispepsia biliar, cirrosis

biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hepatitis crónica activa, hepatitis C y/u otras hepatopatías relacionadas.

En realizaciones preferidas, dicha modulación se realiza mediante una reducción o disminución del nivel de ácidos biliares.

El uso de la composición para uso de la invención puede comprender de forma adicional tratar o reducir el riesgo de contraer cálculos biliares, el tratamiento de la dispepsia biliar, la cirrosis biliar primaria, la colangitis esclerosante primaria, la hepatitis crónica activa, la hepatitis C y/u otras hepatopatías relacionadas, en un sujeto.

En algunas realizaciones, el uso de la composición para uso de la invención puede ser en un método para tratar o reducir el riesgo de prurito en un sujeto. En realizaciones particulares, el sujeto tiene o está en riesgo de contraer colestasis, colestasis intrahepática (p. ej., colestasis intrahepática gestacional), cálculos biliares, el tratamiento de la dispepsia biliar, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, hepatitis crónica activa, hepatitis C y/u otras hepatopatías relacionadas.

Dicho prurito puede estar asociado con la colestasis intrahepática que comprende la colestasis intrahepática gestacional.

En algunas realizaciones, la colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional.

En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En realizaciones representativas, el sujeto es una mujer, por ejemplo, una mujer embarazada.

En los métodos o usos de la presente invención se puede utilizar cualquier especie o cepa bacteriana adecuada, por ejemplo, cualquier especie o cepa bacteriana probiótica adecuada, siempre que tenga las propiedades funcionales descritas en el presente documento.

En los métodos y usos de la presente invención se utilizan al menos dos especies o cepas bacterianas en combinación (por ejemplo, se pueden usar 2, 3, 4 o 5 especies o cepas). Las cepas pueden ser de las mismas o diferentes especies de bacterias. Del mismo modo, en determinadas realizaciones, se puede usar más de una especie de bacterias.

Se administra una combinación o mezcla de cepas o especies bacterianas (terapia combinada). Dichas mezclas o combinaciones de bacterias se pueden administrar juntas en una sola (la misma) composición o por separado (p. ej., en diferentes productos o composiciones). Si se administran por separado, dicha administración puede ser secuencial o simultánea. Sin embargo, la administración separada forma parte del mismo régimen o método terapéutico.

En las realizaciones donde la administración de las dos o más cepas o especies es separada o secuencial, se prefiere que las administraciones se realicen con un plazo de tiempo razonable entre sí, como se describe en otra parte del presente documento. Por ejemplo, las administraciones separadas se realizan preferiblemente con horas (p. ej., una hora) o minutos (p. ej., en 15 o 30 minutos) de diferencia entre sí, más preferiblemente con un plazo de tiempo lo más corto posible (incluyendo la administración simultánea o prácticamente simultánea). Preferiblemente, las dos o más cepas o especies de bacterias se coadministran en una única composición.

En realizaciones donde se utilice más de una cepa de bacterias probióticas en una mezcla en una sola composición o donde se utilice más de una cepa de bacterias probióticas, pero se administren por separado, entonces se puede utilizar cualquier relación adecuada de las bacterias, siempre que la función deseada de las cepas (por ejemplo, la actividad de desconjugación/hidrólisis de los ácidos biliares o la actividad de 7-epimerización o la actividad reductora de sulfato) se mantenga en un grado útil. Dichas relaciones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia. Por ejemplo, se podría utilizar una combinación de este tipo de dos o más cepas o especies en una relación de 1:10, 1:5, 1:1, 5:1 o 10:1 o cualquiera entre estos extremos, p. ej., 1:1. Tales relaciones también se pueden usar en los productos, equipos, composiciones, etc., de la invención como se describe en otra parte del presente documento.

Dichas especies o cepas son generalmente especies o cepas aisladas, o cultivos puros, que luego pueden mezclarse si se utiliza una combinación de especies o cepas. En algunas realizaciones, dichas cepas no corresponderán a cepas de origen natural.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende al menos dos especies o cepas bacterianas, comprendiendo las al menos dos especies o cepas bacterianas una primera especie o cepa bacteriana que comprende actividad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares y una segunda especie o cepa bacteriana que comprende actividad de 7-epimerización.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende al menos tres especies o cepas bacterianas, comprendiendo las al menos tres especies o cepas bacterianas una primera especie o cepa bacteriana que comprende actividad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares, una segunda especie o cepa bacteriana que comprende actividad 7 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH) y una tercera especie o cepa bacteriana que comprende actividad 7 $\beta$ -HSDH.

En algunas realizaciones, la composición puede comprender además al menos una especie o cepa bacteriana que comprende actividad reductora de sulfato. Esta actividad puede ser proporcionada por una o más de las mismas especies o cepas bacterianas que proporcionan la actividad de desconjugación de ácidos biliares o 7-epimerización o puede ser proporcionada por al menos una especie o cepa bacteriana adicional (o diferente). En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana que comprende actividad reductora de sulfato puede ser *Desulfovibrio piger* DSM 32187. Esta cepa de *Desulfovibrio piger* para usar en la presente invención se ha depositado en cumplimiento del Tratado de Budapest en DSMZ (Instituto Leibniz DSMZ - colección alemana de microorganismos y cultivos celulares, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Brunswick, Alemania) el 20 de octubre de 2015.

En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana que comprende la actividad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares puede ser una bifidobacteria. En realizaciones representativas, la especie o cepa bacteriana que comprende la actividad de desconjugación/hidrólisis de ácidos biliares puede ser *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana que comprende actividad de 7-epimerización puede ser *Clostridium baratii* ATCC 27638.

En algunas realizaciones, la especie o cepa bacteriana que comprende actividad 7α-HSDH puede ser *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 o *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079 y/o la especie o cepa bacteriana que comprende actividad 7β-HSDH puede ser *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079 y *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 y *Clostridium baratii* ATCC 27638.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187.

En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Clostridium baratii* ATCC 27638 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187. En algunas realizaciones, la composición para uso de la invención además comprende administrar al sujeto un prebiótico, por ejemplo, en forma de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un prebiótico. En algunas realizaciones, el prebiótico se administra antes, simultáneamente o después de la administración de las bacterias probióticas. En algunas realizaciones, el prebiótico puede ser inulina. Otros ejemplos de prebióticos se describen en otra parte del presente documento.

El prebiótico puede estar en la misma composición que las bacterias probióticas o administrarse por separado, por ejemplo, en una composición diferente.

## Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos. Debe apreciarse que estos ejemplos tienen el propósito de ilustrar aspectos de la presente invención.

### Ejemplo 1

Se desarrolla un producto (producto A) que contiene las siguientes cepas bacterianas:

- 1) *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999
- 2) *Clostridium baratii* ATCC 27638
- 3) *Desulfovibrio piger* DSM 32187

Las cepas bacterianas en el producto están en una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/g/cepa bacteriana y en forma de polvo liofilizado en cápsulas de gelatina estándar de 500 mg.

Ejemplo 2

Se desarrolla y fabrica un producto (producto B) en forma de bolsita que contiene una composición de:

- 1) *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999:  $1 \cdot 10^8$  ufc/bolsita
- 2) *Bacteroides fragilis* ATCC 25285:  $1 \cdot 10^8$  ufc/bolsita
- 3) *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986:  $1 \cdot 10^8$  ufc/bolsita
- 4) Inulina: 3000 mg/bolsita

La composición se carga a temperatura ambiente en bolsas de papel de aluminio como es conocido en la técnica con desecante (10 cm x 12 cm, utilizando material de embalaje PET12/PE/ALU 12/PE/PE+desecante/PE de Alcan) en un banco LAF (Holten Laminair Modelo S-2010 1.2 de Heto-Holten A/S, Dinamarca). A cada bolsa, se añaden 3 g de polvo con *B. longum* ATCC BAA-999, *B. fragilis* ATCC 25285 y *C. aerofaciens* ATCC 25986 e inulina usando la balanza XP-600 de Denver Instrument GmbH, Alemania. A continuación, las bolsas de papel de aluminio llenas se sellan térmicamente con el dispositivo de sellado de película modelo F460/2 de Kettenbaum Folienschweisstechnik GmbH & Co. KG, Alemania.

Ejemplo 3

En un estudio, se incluye un grupo de prueba de mujeres embarazadas con CIG leve (niveles de ácidos biliares  $\geq 10 \mu\text{mol/l}$  y  $< 40 \mu\text{mol/l}$ ) que reciben el producto B probiótico (como se describe en el ejemplo 2). El tratamiento se realiza tres veces al día y dura tres meses o hasta el parto. Antes del tratamiento, se examina a la mujer mediante la obtención de muestras de sangre y el registro de la gravedad percibida del prurito/picazón. Las muestras de sangre se analizan con respecto a la concentración de ácidos biliares.

Después del tratamiento, las mujeres son examinadas nuevamente como se ha descrito anteriormente. Las mujeres que reciben tratamiento con el producto probiótico B muestran niveles reducidos de ácidos biliares en la sangre y experimentan un alivio del prurito/picazón.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende actividad de desconjugación de los ácidos biliares y actividad de 7-epimerización, para su uso en un método para tratar o reducir el riesgo de colestasis intrahepática en un sujeto, en donde dicha colestasis intrahepática comprende colestasis intrahepática gestacional, y en donde:
  - (i) la composición comprende al menos dos cepas bacterianas que comprenden
    - (a) una primera cepa bacteriana que comprende actividad de desconjugación de los ácidos biliares, y
    - (b) una segunda cepa bacteriana que comprende actividad de 7-epimerización; o
  - (ii) la composición comprende al menos tres cepas bacterianas que comprenden
    - (a) una primera cepa bacteriana que comprende actividad de desconjugación de los ácidos biliares,
    - (b) una segunda cepa bacteriana que comprende actividad 7 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSDH), y
    - (c) una tercera cepa bacteriana que comprende actividad 7 $\beta$ -HSDH.
2. La composición para su uso de la reivindicación 1, en donde:
  - la primera cepa bacteriana citada en la parte (i) es *Bifidobacterium*;
  - la segunda cepa bacteriana citada en la parte (i) es *Clostridium*;
  - la primera cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Bifidobacterium*;
  - la segunda cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Bacteroides*; y/o
  - la tercera cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Collinsella*.
3. La composición para su uso de la reivindicación 2, en donde:
  - la primera cepa bacteriana citada en la parte (i) es *Bifidobacterium longum*;
  - la segunda cepa bacteriana citada en la parte (i) es *Clostridium baratii*;
  - la primera cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Bifidobacterium longum*;
  - la segunda cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Bacteroides fragilis* y/o *Bacteroides thetaiotaomicron*; y/o
  - la tercera cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Collinsella aerofaciens*.
4. La composición para su uso de la reivindicación 3, en donde:
  - la primera cepa bacteriana citada en la parte (i) es *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999;
  - la segunda cepa bacteriana citada en la parte (i) es *Clostridium baratii* ATCC 27638;
  - la primera cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999;
  - la segunda cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y/o *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079; y/o
  - la tercera cepa bacteriana citada en la parte (ii) es *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986.
5. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición comprende además al menos una cepa bacteriana que comprende actividad reductora de sulfato.
6. La composición para su uso de la reivindicación 5, en donde la cepa bacteriana que comprende actividad reductora de sulfato es *Desulfovibrio*.
7. La composición para su uso de la reivindicación 6, en donde la cepa bacteriana que comprende actividad reductora de sulfato es *Desulfovibrio piger*.
8. La composición para su uso de la reivindicación 7, en donde la cepa bacteriana que comprende actividad reductora de sulfato es *Desulfovibrio piger* DSM 32187.
9. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,
  - en donde la composición comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, y *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986; o
  - en donde la composición comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079, y *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986; o
  - en donde la composición comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 y *Clostridium baratii* ATCC 27638; o

- 5 en donde la composición comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187; o en donde la composición comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Bacteroides thetaiotaomicron* DSM 2079, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187; o
- 10 en donde la composición comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, *Clostridium baratii* ATCC 27638 y *Desulfovibrio piger* DSM 32187.
10. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicho uso comprende además un prebiótico.
11. La composición para su uso de la reivindicación 10, en donde el prebiótico es inulina.
12. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el sujeto es un mamífero.
13. La composición para su uso de la reivindicación 12, en donde el sujeto es un ser humano.
14. La composición para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde dicho uso comprende tratar o reducir el riesgo de prurito en el sujeto.