



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 265 331**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00900789 .9**

(86) Fecha de presentación : **17.01.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1141235**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

(54) Título: **Utilización de (*Bifidobacterium*) en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.**

(30) Prioridad: **15.01.1999 IE 990033
20.09.1999 IE 990782**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

(73) Titular/es: **Enterprise Ireland (Trading as BioResearch Ireland)
Glasnevin
Dublin 9, IE
University College Cork-National University of Ireland, Cork**

(72) Inventor/es: **Collins, John, Kevin;
O'Sullivan, Gerald, Christopher;
O'Mahony, Liam y
Shanahan, Fergus**

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Utilización de (*Bifidobacterium*) en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

5 Introducción

Esta invención se refiere a cepas de *Bifidobacterium* probióticas que tienen diversas aplicaciones en productos alimenticios y en medicina. Más particularmente, la invención se refiere a cepas probióticas de bifidobacterias que son capaces de modificar beneficiosamente y por consiguiente aliviar los síntomas observables en una enfermedad inflamatoria.

Los consumidores cada vez se enteran más de materias que pueden ser necesarias para mantener su medio ambiente, salud, y nutrición. En respuesta, la investigación científica se ha centrado en los papeles que pueden jugar la dieta, estrés y prácticas médicas modernas (por ejemplo, antibióticos y radioterapia) en la amenaza a la salud humana. En particular, el cambio dinámico de la población hacia sociedades más viejas está aumentando la incidencia de enfermedad que puede estar provocada por una microflora deficiente o comprometida tal como infecciones del trato gastrointestinal (GIT), estreñimiento, síndrome del intestino irritable (IBS), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) - enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, alergias a los alimentos, diarrea inducida por antibióticos, enfermedad cardiovascular, y ciertos cánceres (por ejemplo, cáncer colorrectal).

20 Los agentes probióticos se han definido como suplementos alimenticios microbianos vivos que afectan de manera beneficiosa al hospedador mejorando el equilibrio microbiano intestinal, o más ampliamente, como microorganismos vivos, que después de su ingestión en ciertas cantidades, ejercen efectos sobre la salud más allá de la nutrición básica inherente. Los cócteles de diversos microorganismos, particularmente especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, se han usado tradicionalmente en productos lácteos fermentados para promover la salud.

30 En los últimos años, la fabricación comercial y comercialización de alimentos funcionales (alimentos que afectan a las funciones del cuerpo de un modo dirigido de modo que provocan efectos positivos sobre la fisiología y la nutrición), particularmente yogures probióticos (*Acidophilus-Bifidus*), se han propagado desde el mercado japonés bien establecido hasta la Unión Europea lucrativa y en expansión. Aunque ahora se han explotado comercialmente varias bacterias probióticas de origen humano (por ejemplo, *L. acidophilus LA-1*), muchos consumidores, organizaciones de consumidores, y miembros de la comunidad científica son escépticos sobre dichos productos y sus reivindicaciones probióticas publicadas. La industria alimenticia láctea, por lo tanto, está bajo una presión considerable para validar científicamente estos nuevos productos alimenticios probióticos.

35 Los criterios que se han sugerido para la selección de microorganismos probióticos potencialmente eficaces pueden resumirse del siguiente modo: origen humano, comportamiento no patogénico, resistencia a procesos tecnológicos (es decir, viabilidad y actividad en vehículos del suministro), resistencia a la acidez gástrica y toxicidad biliar, adhesión al tejido epitelial del intestino, capacidad de colonizar el GIT, producción de sustancias antimicrobianas, capacidad de modular las respuestas inmunes, y la capacidad de influir sobre las actividades metabólicas (por ejemplo, asimilación del colesterol, actividad lactasa, producción de vitaminas) (Huls in't Veld J, Shortt C. Selection criteria for probiotic micro-organisms. In: Leeds, A.R., Rowland, I.R. eds. Gut Flora and Health - Past, Present and Future. London: The Royal Society of Medicine Press Ltd., 1996:19-26).

45 Las bifidobacterias son unas de las varias bacterias cultivables predominantes presentes en la microflora del colon.

Las funciones de las bifidobacterias endógenas en el colon aún no se han dilucidado completamente. Sin embargo, se reconoce que los niños que se alimentan exclusivamente de leche materna tienen un riesgo reducido de diarrea en comparación con los niños alimentados con leche maternizada. El hecho de que estos niños tengan mayores cantidades 50 de bifidobacterias en el colon, puede explicar en parte esta ventaja sobre la salud observada ya que la ocupación de los nichos disponibles en el GIT por grandes cantidades de bifidobacterias no patogénicas puede ayudar a evitar una infección bacteriana. La patogénesis de la enfermedad de Crohn se cree que está relacionada con la microflora bacteriana del colon (Targan, S. and Shanahan, F. Inflammatory bowel disease: From bench to bedside. Williams and Wilkins 1994.). Recientemente se ha descubierto que pacientes que padecen enfermedad de Crohn activa tienen 55 significativamente menos bifidobacterias recuperables en sus heces en comparación con individuos sanos. Se observó que esta reducción en las cantidades de bifidobacterias se correlacionaba directamente con niveles disminuidos de la producción y actividad de β -D galactosidasa (Favier, C. et al; Dig. Dis. Sci. 1997; 42:817-822). La β -D galactosidasa es una enzima producida por las bifidobacterias. Estos resultados mantienen las sugerencias propuestas en otros estudios de que las cepas de bifidobacterias pueden jugar papeles importantes en el mantenimiento de una microflora intestinal sana y equilibrada.

60 Las bifidobacterias se consideran agentes probióticos ya que son organismos vivos que ejercen efectos sobre la salud más allá de la nutrición básica cuando se ingieren en cantidades suficientes. Las numerosas bifidobacterias ingeridas deben alcanzar el sitio de acción en el intestino para ejercer un efecto probiótico. Se ha sugerido un nivel mínimo de aproximadamente 10^6 - 10^7 bifidobacterias viables por gramo de contenido intestinal (Bouhnik, Y., Lait 1993; 73:241-247). Hay informes en la bibliografía que muestran que estudios *in vivo* completados en adultos y en niños indican que algunas cepas de bifidobacterias son capaces de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal. Se han observado diferencias significativas entre las capacidades de diferentes cepas de bifidobacterias de tolerar los

ES 2 265 331 T3

ácidos y sales biliares, indicando que la supervivencia es un criterio importante para la selección de cepas probióticas potenciales.

La ingestión de bifidobacterias puede mejorar el tránsito gastrointestinal.

5 Además, la evidencia indirecta en seres humanos demuestra que consumir leche fermentada por bifidobacterias puede conducir a niveles reducidos de ciertas enzimas fecales tales como β -D galactosidasa implicada en la conversión de procarcinógenos en carcinógenos (Bouhnik Y. et al ; Eur. J. Clin. Nutr. 1996; 50:269-273). Los metabolitos de putrefacción contenidos en las heces, tales como *p*-cresol, indol o amoníaco también se redujeron cuando los sujetos 10 consumieron leche fermentada por *Bifidobacterium longum* y *S. thermophilus* (Takiguchi, R. et al. *Bifidus - Flores, Fructus et Semina* 1996; 9:135-140).

Se ha informado de que la actividad antimicrobiana está asociada con las bifidobacterias. Además, las bifidobacterias han demostrado modular diversos parámetros del sistema inmune.

15 Se ha informado de que la inflamación de la mucosa en ratones deficientes en IL-10 se reduce alimentando a los sujetos animales con una preparación de bacterias acidolácticas (Madsen, K. et al. Gastroenterol. 1997; 112:A1030.). Estudios adicionales completados en ratas han demostrado que la ingestión de bifidobacterias puede suprimir la formación en el colon de focos críticos aberrantes (lesiones preneoplásicas tempranas) (Kulkarni, N. and Reddy, B. Proc. 20 Soc. Experim. Biol. Med. 1994; 207; 278-283.) además de disminuciones significativas en la incidencia de tumor de colon y la cantidad de tumores presentes (Singh, J. et al Carcinogenesis 1997;18:833-841).

25 Hay una investigación en curso de cepas probióticas con efectos beneficiosos particulares sobre la nutrición y terapia y en líneas generales sobre la salud.

Declaraciones de la invención

La invención proporciona una cepa de *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624 o un mutante o variante de la misma.

30 Se hizo un depósito de la cepa UCC35624 de *Bifidobacterium longum infantis* en the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) el 13 de enero de 1999 y se concedió el número de acceso NCIMB 41003.

35 En una realización, el mutante es un mutante genéticamente modificado.

En una realización, la variante es una variante de origen natural de *Bifidobacterium longum infantis* UCC35624.

40 La cepa de *Bifidobacterium* puede estar en forma de células viables. Como alternativa, la cepa de *Bifidobacterium* está en forma de células no viables.

45 La cepa de *Bifidobacterium longum infantis* de la invención se aísla del tracto gastrointestinal humano reseccionado y lavado, y es significativamente inmunomoduladora después del consumo oral en seres humanos. La cepa de la invención ejerce cambios en un marcador inmunológico cuando se introduce en un sistema que comprende células que interaccionan con el sistema inmune y las células del sistema inmune. Las células que interaccionan con el sistema inmune pueden ser células epiteliales. El marcador inmunológico puede ser una citoquina, especialmente TNF α . Las células que interaccionan con el sistema inmune y las células del sistema inmune pueden ser de origen coincidente. Las células que interaccionan con el sistema inmune son de origen gastrointestinal, respiratorio o genitourinario. Las células del sistema inmune son preferiblemente de origen gastrointestinal, respiratorio o genitourinario.

50 La cepa de *Bifidobacterium* de la invención tiene un efecto anti-inflamatorio significativo después del consumo oral en seres humanos.

55 La cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con la invención es capaz de combatir los efectos de enfermedades inflamatorias del intestino, estando dicha capacidad mantenida en presencia de concentraciones fisiológicas de bilis humana y jugo gástrico humano. La capacidad de combatir los efectos de la enfermedad inflamatoria del intestino se mide midiendo la inversión de la enfermedad debilitante inducida en ratones receptores con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) a los que se les han administrado células T CD4+, CD45RB^{high} purificadas.

60 La capacidad de la cepa de *Bifidobacterium longum infantis* de la invención de combatir los efectos de la enfermedad inflamatoria del intestino también puede medirse midiendo la reducción de la inflamación del colon en ratones deficientes en IL-10 (cepa IL-10 $^+$ 129 Svx) después de la administración de la cepa de *Bifidobacterium longum infantis* de acuerdo con la invención.

65 La interleuquina 10 (IL-10) es una citoquina reguladora importante que suprime las funciones efectoras de macrófagos/monocitos, células T auxiliares 1 (Th1), y células natural killer. Además, la IL-10 aumenta la proliferación y diferenciación de células B. Los modelos murinos que carecen del gen de la IL-10 desarrollan espontáneamen-

ES 2 265 331 T3

te enfermedad inflamatoria del intestino y tumores gastrointestinales. La flora gastrointestinal se ha implicado en la patogénesis de estas patologías ya que animales sin el germe no desarrollan la enfermedad.

5 La cepa de *Bifidobacterium* de la invención tiene una actividad inhibidora contra un amplio intervalo de bacterias Gram positivas y Gram negativas. La cepa de *Bifidobacterium* de la invención muestra un amplio espectro de actividad contra bacterias, incluyendo especies de *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Coliform* y *Bacillus*.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una formulación que comprende una cepa de *Bifidobacterium* de la invención.

10 La formulación puede incluir otro material probiótico. Alternativa o adicionalmente, la formulación incluye un material prebiótico.

15 Preferiblemente, la formulación incluye un vehículo ingerible. El vehículo ingerible puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo.

El vehículo ingerible puede ser un producto alimenticio tal como leche ácida, yogurt, yogurt congelado, leche en polvo, concentrado de leche, quesos untados, aliños o bebidas.

20 La formulación puede comprender una proteína y/o péptido, en particular proteínas y/o péptidos particulares que son ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, un mineral y/o un elemento traza.

En una realización, el *Bifidobacterium* de la invención está presente a más de 10^6 cfu por gramo de sistema de suministro.

25 En otra realización, la formulación incluye un adyuvante.

La formulación puede incluir un componente bacteriano. La formulación puede incluir alternativa o adicionalmente una entidad del fármaco. La formulación también puede incluir un compuesto biológico.

30 La formulación puede estar en una forma para inmunización oral.

La invención proporciona adicionalmente una cepa de la invención o una formulación de la misma para su uso en productos alimenticios.

35 En otro aspecto, la invención proporciona una cepa de la invención o una formulación de la misma para su uso como medicamento.

40 La cepa de la invención o una formulación de la invención puede ser para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una actividad inflamatoria no deseable.

45 La cepa de la invención o formulación de la invención puede ser para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable tal como enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, bursitis o colitis después de infección.

La actividad inflamatoria no deseable puede ser debida a cáncer.

Además, la cepa de la invención o formulación de la invención puede ser para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de cáncer o cánceres gastrointestinales.

50 La cepa de la invención o formulación de la invención puede usarse para la profilaxis del cáncer. Además, la cepa de la invención o formulación de la invención puede ser para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad sistémica tal como artritis reumatoide.

55 La cepa de la invención o formulación de la invención puede ser para su uso en profilaxis y/o tratamiento de trastornos autoinmunes debidos a una actividad inflamatoria no deseable.

La cepa de la invención o formulación de la invención puede ser para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del cáncer debido a una actividad inflamatoria no deseable.

60 La cepa de la invención o formulación de la invención puede ser para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedad diarreica debida a una actividad inflamatoria no deseable, tal como diarrea asociada a *Clostridium difficile*, diarrea asociada a rotavirus o diarrea después de infección.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

- 5 la Fig. 1 es un gráfico de cfu/ml frente al tiempo para la cepa 35612 de *Bifidobacterium longum infantis* como se describe en el Ejemplo 2;
- 10 la Fig. 2 es un gráfico de cfu/ml frente al tiempo para la cepa 35624 de *Bifidobacterium longum infantis* como se describe en el Ejemplo 2;
- 15 la Fig. 3 es un gráfico del cambio de peso en porcentaje frente al tiempo (días) para cinco ratones SCID (1-5) a los que se les ha administrado la cepa UCC 35624 como se describe en el Ejemplo 5;
- 20 la Fig. 4 es un gráfico del cambio de peso en porcentaje medio frente al tiempo (días) para los ratones SCID (1-5) a los que se les ha administrado la cepa UCC 35624 como se describe en el Ejemplo 5;
- la Fig. 5 es un gráfico del cambio de peso en porcentaje frente al tiempo (días) para los ratones (6-10) a los que se les ha administrado una combinación de las cepas UCC 118 y UCC 35624 de *Lactobacillus salivarius* como se describe en el Ejemplo 5;
- 25 la Fig. 6 es un gráfico del cambio de peso en porcentaje medio frente al tiempo (días) para los ratones (6-10) a los que se les ha administrado una combinación de las cepas UCC 118 y UCC 35624 como se describe en el Ejemplo 5;
- la Fig. 7 es un gráfico del cambio de peso en porcentaje frente al tiempo (días) para los ratones (11-15) a los que se les ha administrado una combinación de las cepas UCC 118 y UCC 35624 como se describe en el Ejemplo 5;
- 30 la Fig. 8 es un gráfico del cambio de peso en porcentaje medio frente al tiempo (días) para los ratones (11-15) a los que se les ha administrado una combinación de las cepas UCC 118 y UCC 35624 como se describe en el Ejemplo 5;
- la Fig. 9 es un gráfico de barras de los niveles de TNF α en muestras de pacientes y de control en presencia de PBMC y *Bifidobacterium longum infantis* como se describe en el Ejemplo 7;
- 35 la Fig. 10 es un gráfico de barras de los niveles de TNF α e IL-8 en co-cultivos de células epiteliales, PBMC y *Bifidobacterium longum infantis* como se describe en el Ejemplo 7. Los controles representan co-cultivos de células epiteliales y PBMC solas;
- 40 la Fig. 11 son gráficos de barras de los niveles de citoquinas en sangre periférica después del consumo de *Bifidobacterium longum infantis* por voluntarios humanos sanos ($n = 18$) durante tres semanas como se describe en el Ejemplo 8;
- 45 la Fig. 12 son gráficos de barras de los niveles en suero de TNF α e IL-1RA después del consumo de *Bifidobacterium longum infantis* por voluntarios humanos sanos ($n = 18$) como se describe en el Ejemplo 8;
- la Fig. 13 es un gráfico de barras de los niveles de TNF α en el sobrenadante de cultivo sin células de *Bifidobacterium longum infantis* y un control de MRS como se describe en el Ejemplo 9;
- 50 la Fig. 14 es una representación esquemática del intestino delgado de un ratón SCID después del tratamiento con *Bifidobacterium longum infantis*; y

la Fig. 15 es una representación esquemática del intestino delgado de un ratón SCID sin tratar.

Descripción detallada

Se han aislado cepas de bacterias probióticas que son capaces de modificar beneficiamente y por consiguiente aliviar los síntomas observables en trastornos inflamatorios. Estas cepas y las formulaciones preparadas pueden usarse en una diversidad de productos alimenticios y medicamentos para combatir el efecto de los trastornos inflamatorios.

Se realizaron estudios *in vivo* e *in vitro* usando las cepas de bacterias probióticas. Se descubrió que los seres humanos alimentados con yogurt que contenía *Bifidobacterium longum infantis* UCC35624 muestran disminuciones marcadas en sus niveles sistémicos de IL-8. Esta cepa puede, por lo tanto, tener una aplicación potencial en el tratamiento de un intervalo de trastornos inflamatorios, particularmente si se usan en combinación con terapias anti-inflamatorias en curso, tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) o infliximab.

También se examinó el consumo de *Bifidobacterium longum infantis* por ratones SCID. Aunque este experimento atenuó significativamente la actividad inflamatoria, los ratones que consumieron *Bifidobacterium longum infantis* recibieron deposiciones sólidas mientras que los ratones de control padecieron diarrea. Este efecto anti-diarreico podría estar relacionado con la actividad anti-inflamatoria de esta invención, posiblemente mediado por la modulación de AMPc.

ES 2 265 331 T3

Se desconoce si son necesarias las bacterias intactas para ejercer un efecto anti-inflamatorio o si los componentes activos individuales de la invención pueden utilizarse solos. Se han identificado los componentes pro-inflamatorios de ciertas cepas bacterianas. Los efectos pro-inflamatorios de las bacterias gram-negativas están mediados por lipopolisacárido (LPS). LPS solo induce una red pro-inflamatoria, particularmente debida a la unión de LPS al receptor CD14 en monocitos. Se supone que los componentes de las bacterias probióticas tienen actividad anti-inflamatoria, debido a los efectos de la célula completa. Después del aislamiento de estos componentes, se prevé la manipulación de calidad farmacéutica.

El uso general de *Bifidobacterium longum infantis* UCC35624 es en forma de células viables. Sin embargo, también puede ampliarse a células no viables tales como cultivos muertos o composiciones que contienen factores beneficiosos expresados por *Bifidobacterium longum infantis* UCC35624. Esto podría incluir microorganismos muertos por calor o microorganismos muertos por exposición a pH alterado o sometiéndolos a presión. Con células no viables, la preparación del producto es más simple, las células pueden incorporarse fácilmente a los agentes farmacéuticos y las necesidades de almacenamiento son mucho menos limitadas que las células viables. *Lactobacillus casei* YIT 901B ofrece un ejemplo del uso eficaz de células muertas por calor como método para el tratamiento y/o prevención del crecimiento tumoral como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº US4347240.

La invención se entenderá más claramente a partir de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Aislamiento de bacterias probióticas

Se exploraron los apéndices y secciones del intestino grueso y delgado del G.I.T. humano, obtenido durante cirugía de reconstrucción, para las cepas bacterianas probióticas mostradas en la Tabla 1.

TABLA 1

Muestras de tejido del tracto gastrointestinal exploradas para la presencia de bacterias probióticas

	Muestra	Localización
35	A	Íleo
	B	Colon
	C	Región ileo-cecal
	D	Apéndice
	E	Apéndice
	F	Íleo
	G	Región ileo-cecal

Todas las muestras se almacenaron inmediatamente después de la cirugía a -80°C en recipientes estériles. Se descongelaron los tejidos congelados, se pesaron y se colocaron en solución de Ringer cisteinada con un cuarto de potencia (al 0,05%). Cada muestra se agitó suavemente para retirar los microorganismos que se adhieren ligeramente (llamado - lavado "W"). Despues de la transferencia a un segundo volumen de solución de Ringer, la muestra se agitó con vórtice durante 7 minutos para retirar las bacterias que se adhieren fuertemente (llamado - muestra "S"). Para aislar las bacterias incrustadas en el tejido, también se homogeneizaron las muestras A, B y C en un mezclador Braun (llamado - homogeneizado "H"). Las soluciones se diluyeron en serie (dilución 10⁻¹ desde una muestra de lavado se marcó W1, dilución 10⁻¹ se marcó W2 y el mismo sistema de marcaje se usó para las muestras "S" y "H") y se sembraron en extensión en placas (100 µl) sobre los siguientes medios de agar: RCM (medios de clostridia reforzados) y RCM ajustado a pH 5,5 usando ácido acético; TPY (tripcasina, peptona y extracto de levadura), Chevalier, P. et al. (1990) *J. Appl. Bacteriol.* 68, 619-624), MRS (deMann, Rogosa and Sharpe); ROG (medio acetato (SL) de Rogosa); LLA (agar de hígado-lactosa de Lapierre); BHI (agar de infusión cerebro corazón); LBS (agar selectivo de *Lactobacillus*) y TSAYE (agar de triptona soja suplementado con extracto de levaduras al 0,6%). Todos los medios de agar se suministraron por Oxoid Chemicals con la excepción del agar TPY. Las placas se incubaron en recipientes anaeróbicos (BBL, Oxoid) usando kits que generan CO₂ (Anaerocult A, Merck) durante 2-5 días a 37°C.

Se sembraron en estrías aislados de bacterias gram-positivas, negativas a la catalasa con forma de barra o bifurcadas/pleomórficas para su pureza sobre medios no selectivos complejos (TPY). Los aislados se cultivaron de forma rutinaria en medio TPY salvo que se indique otra cosa, a 37°C en condiciones anaeróbicas. Se guardaron soluciones madre de especies supuestamente de bifidobacterias en glicerol al 40% y se almacenaron a -20° y -80°C.

Análisis de los productos finales de fermentación

Se examinó el metabolismo del carbohidrato glucosa y los posteriores productos finales de ácido orgánico usando una columna de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) LKB Bromma, Aminex HPX-87H. La columna

ES 2 265 331 T3

se mantuvo a 60°C con un caudal de 0,6 ml/min (presión constante). El tampón de HPLC usando fue H₂SO₄ 0,01 N. Antes del análisis, la columna se equilibró usando citrato 10 mM, glucosa 10 mM, lactato 20 mM y acetato 10 mM como patrones. Los cultivos se propagaron en caldo MRS modificado durante 1-2 días a 37°C de forma anaeróbica. Despues de la centrifugación durante 10 minutos a 14.000 g, el sobrenadante se diluyó 1:5 con tampón de HPLC y se analizaron 200 µl en la HPLC. Todos los sobrenadantes se analizaron por duplicado.

Caracterización bioquímica y fisiológica

Se determinaron los rasgos bioquímicos y fisiológicos de los aislados bacterianos para ayudar a la identificación.

10 Se ensayó la actividad de reducción de nitrato, formación de indol y expresión de β-galactosidasa. Se determinó el crecimiento tanto a 15°C como a 45°C y la actividad proteasa en gelatina. También se evaluaron las características de crecimiento de las cepas en leche tornasolada.

Perfiles de sensibilidad a antibióticos

15 Se determinaron los perfiles de sensibilidad a antibióticos de los aislados usando el ensayo de "susceptibilidad a discos". Los cultivos se hicieron crecer en el medio de caldo apropiado durante 24-48 h, se sembraron en extensión en placas (100 µl) sobre medios de agar y se colocaron discos que contenían concentraciones conocidas de los antibióticos sobre el agar. Se examinaron las cepas para la sensibilidad a los antibióticos después de 1-2 días de incubación a 37°C

20 en condiciones anaeróbicas. Las cepas se consideraron sensibles si se observaban zonas de inhibición de 1 mm o mayor.

Aislamiento de *Bifidobacterias* sp.

25 Se exploraron siete secciones tisulares tomadas del G.I.T. humano para la presencia de cepas que pertenecen al género *Bifidobacterium*. Hubo alguna variación entre las muestras tisulares. Las muestras a (fleo) y E (apéndice) tuvieron los recuentos más bajos con aproximadamente 10² células aisladas por gramo de tejido. En comparación, se recuperaron más de 10³ cfu/g de tejido de las otras muestras. Se aislaron cantidades similares de bacterias durante las etapas de "lavado" y "muestras" con recuentos ligeramente superiores en las soluciones de "muestra" de F (fleo) y G (región ileo-cecal). De las exploradas para las bacterias que se adhirieron fuertemente (homogeneizadas), sólo C (región ileo-cecal) fue la sección tisular que dio recuentos significativos.

30 Durante la exploración de algunas secciones tisulares, por ejemplo C y B, no hubo una correlación directa entre los recuentos obtenidos durante una serie de dilución. Esto indicaría que algunos factores de crecimiento, obtenidos de sangre o tejido, estaban proporcionando el crecimiento de las bacterias exigentes en la suspensión inicial que se diluyó posteriormente.

Selección y caracterización de la cepa

40 Se eligieron aproximadamente mil quinientos aislados bacterianos negativos a la catalasa de diferentes muestras y se caracterizaron en términos de su reacción Gram, tamaño celular y morfología, crecimiento a 15°C y 45°C y productos finales de fermentación a partir de la glucosa. Más del sesenta por ciento de los aislados ensayados fueron Gram-positivos, cocos homofermentantes dispuestos en tétradas, cadenas o racimos. El dieciocho por ciento de los aislados eran bacilos Gram-negativos y cocobacilos heterofermentantes.

45 Los aislados restantes (veintidós por ciento) eran predominantemente cocobacilos homofermentantes. El treinta por ciento de las cepas se caracterizó con más detalle - 13 aislados de G; 4 de F; 8 de D; 9 de C; 3 de B y 1 de E. Los treinta y ocho aislados fueron negativos en el ensayo tanto para la reducción de nitrato como para la producción de indol a partir de triptófano.

Perfiles de sensibilidad a antibióticos

50 Se usaron antibióticos de importancia clínica para los seres humanos para determinar los perfiles de sensibilidad de bifidobacterias seleccionadas. Las bifidobacterias ensayadas fueron sensibles a ampicilina, amoxicilina, ceftaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina, cefradina, rifampicina, amikacina, gentamicina y cloramfenicol. También fueron resistentes a netilmicina, trimetoprim, ácido nalidíxico, cefuroxima, vancomicina y tetraciclina.

Ejemplo 2

60 Resistencia a Ácidos

La primera línea de defensa del hospedador que alcanza un microorganismo después del consumo humano es el ácido gástrico en el estómago. Un factor clave que influye sobre las bacterias es la supervivencia en el jugo gástrico. Se examinó la supervivencia y crecimiento de las cepas 35612 y 35624 de *Bifidobacterium longum infantis* en un medio de pH bajo. Las cepas se cultivaron de forma rutinaria en medio con extracto de levaduras con tripticase-peptona (TPY) a 37°C en condiciones anaeróbicas estrictas (recipientes BBL Gas usando el sistema Merck Anaerocult A gas pak) durante 12-24 horas. Se obtuvo jugo gástrico humano de sujetos sanos por aspiración a través de un tubo nasogástrico (Mercy Hospital, Cork, Irlanda). Se centrifugó inmediatamente a 13.000 g durante 30 minutos para

ES 2 265 331 T3

retirar todas las partículas sólidas, se esterilizó a través de filtros de $0,45\ \mu\text{m}$ y filtros de $0,2\ \mu\text{m}$ y se almacenó a 4°C . El pH y la actividad pepsina se midieron antes de su uso experimental. La actividad pepsina se midió usando el ensayo cuantitativo de hemoglobina (Guantam, S. and R.S. de la Motte. 1989. Proteolytic enzymes, a practical approach. Capítulo 3. R.J. Beynon and J.S. Bond(eds.), IRL Press, Oxford University Press; Dawson, R.M. 1969. pH and buffers. In Data for Biochemical Research p 13B. R.M. Dawson, D.C. Elliot and K.M. Jones(eds.), Clarendon Press, Oxford). La supervivencia de las cepas a pH bajo *in vitro* se investigó usando los siguientes ensayos:

(a) las células se recogieron de cultivos de una noche recientes, se lavaron dos veces en tampón fosfato (pH 6,5) y se resuspendieron en caldo MRS ajustado a pH 3,5, 3,0, 3,5, y 2,0 (con HCl 1 N) a una concentración final de aproximadamente 10^6 cfu/ml. Las células se incubaron a 37°C y se midió la supervivencia a intervalos de 5, 30, 60 y 120 minutos usando el método de recuento de placas.

Las cepas sobrevivieron sin pérdida de viabilidad a pH 3,5. A pH 2,5 hubo una reducción de 3 log en el periodo de incubación de 60 minutos como se representa en las Fig. 1 y 2.

15 Supervivencia de las cepas de *Bifidobacterium* en jugo gástrico humano

Se recogieron de cultivos de una noche recientes, se lavaron dos veces en tampón fosfato (pH 6,5) y se resuspendieron en jugo gástrico humano a una concentración final de 10^6 cfu/ml. La supervivencia se controló en un periodo de incubación de 30-60 minutos a 37°C . El experimento se realizó usando jugo gástrico a pH 1,2 (no ajustado) y pH 2,0 y 2,5 (ajustado usando NaOH 1 N).

La supervivencia de las cepas se aumentó en jugo gástrico a pH 2,0, en comparación con jugo gástrico a pH 1,2. Después de 30 minutos de incubación no se recogieron células viables a ningún pH como se muestra en la Tabla 2.

TABLA 2

*Supervivencia de Bifidobacterium sp. en jugo gástrico humano**

35	Cepa	pH	Tiempo (min)			
			0	5	30	60
**						
40	35612	1,2	7,56	0,00	0,00	0,00
		2,0	6,27	6,31	2,88	0,00
45	35624	1,2	5,96	4,18	0,00	0,00
		2,0	6,33	6,32	0,00	0,00
**						
50	35652	1,2	6,16	3,78	0,00	0,00
		2,0	8,45	8,40	3,45	0,00
**						
55	35648	1,2	6,00	0,00	0,00	0,00
		2,0	7,89	6,45	0,00	0,00
**						
60	35687	1,2	6,68	0,00	0,00	0,00
		2,0	8,75	8,77	3,34	0,00
BO						
65	10	2,0	8,41	8,56	8,42	8,43
		2,0	8,39	8,56	4,64	0,00
6,3						
65	<i>B. longum</i>	2,0	8,75	8,75	8,29	8,42
		6	8,15	8,02	0,00	0,00

* supervivencia expresada como \log_{10} cfu/ml

** comparativo

ES 2 265 331 T3

Ejemplo 3

Resistencia a la bilis

En la evaluación de la eficacia del uso de bacterias acidolácticas como miembros beneficiosos del tracto gastrointestinal, se considera que la resistencia a ácidos biliares es una característica biológica importante de las cepas necesaria para la supervivencia en este medio hostil y además no deben afectar a la salud del hospedador produciendo compuestos tóxicos tales como ácido desoxicólico (LCA) y litocólico (LCA) que se han implicado en varios fenómenos citotóxicos.

Se sembraron en estrías varias cepas de *Bifidobacterium longum infantis* en placas de agar TPY suplementado con bilis porcina (B-8631, Sigma Chemical Co. ltd., Poole) a concentraciones de 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 5,0 y 7,5% (p/v) (Legrand-Defretin, R. et al., Lipids 1991; 26 (8), 578-583). La bilis porcina es la más cercana en composición a la bilis humana con respecto a las proporciones sal biliar/colesterol y fosfolípidos/colesterol. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones anaeróbicas y se registró el crecimiento después de 24-48 h. Se descubrió que la cepa 35624 era fuertemente resistente a la bilis y crecía hasta confluencia en bilis porcina de hasta el 5% como se muestra en la Tabla 3.

20

TABLA 3

*Crecimiento de aislados de *Bifidobacterium sp.* en presencia de bilis porcina*

Cepa	% (p/v) Bilis porcina						
	0,0	0,3	0,5	1,0	1,5	5,0	7,5
*34612	+	-	-	-	-	-	-
*35624	+	+	+	+	+	+	-
*35652	+	-	-	-	-	-	-
*35658	+	+	+	+	-	-	-
*35687	+	-	-	-	-	-	-

35 -, sin crecimiento; +, crecimiento confluente

* comparativo

40

Se obtuvo bilis humana de varias vesículas humanas y se esterilizó a 80°C durante 10 minutos. La composición del ácido biliar de la bilis humana se determinó usando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase inversa en combinación con un detector amperométrico por pulsos de acuerdo con el método de Dekker, R.R. et al., *Chromatographia*, 1991, 31 (11/12), 255-256. Se añadió la bilis humana a una concentración del 0,3% (v/v). Los cultivos sembrados en estrías recientes se examinaron para el crecimiento después de 24 y 48 h.

45

La cepa 35624 fue capaz de crecer en presencia de bilis humana fisiológicamente relevante (0,3% (v/v)).

50

Se examinó el crecimiento de las cepas en presencia de ácidos biliares conjugados y desconjugados individuales. En condiciones fisiológicas, los ácidos biliares a menudo se encuentran como sales sódicas. Las cepas se exploraron para el crecimiento en agar TPY que contenía las sales sódicas conjugadas y desconjugadas de cada uno de los siguientes ácidos biliares.

55

(a) *forma conjugada*: ácido glicólico (GCA); ácido glicodesoxicólico (GDCA); y ácido glicoquenodesoxicólico (GCD-CA);

60

(a) *forma desconjugada*: ácido litocólico (LCA); ácido quenodesoxicólico (CDCA); ácido desoxicólico (DCA) y ácido cárboxílico (CA). Para cada ácido biliar se usaron concentraciones de 1,3 y 4 mM. Se registró el crecimiento después de 24-48 h de incubación anaeróbica.

65

Las cinco cepas estudiadas crecieron en medio de agar suplementado con GCA y GCDCA 5 mM y en medio de agar suplementado con GDCA 1 mM como se muestra en la Tabla 4. La cepa 35624 fue resistente a concentraciones de LCA 5 mM (datos no mostrados) y las cepas 35612* y 35624 fueron capaces de crecer a concentraciones de CA 5 mM como se muestra en la Tabla 5. No se observó crecimiento en presencia de CDCA 1 mM (datos no mostrados). (*Comparativo).

ES 2 265 331 T3

TABLA 4

*Crecimiento de aislados de *Bifidobacterium* sp. en presencia de ácidos biliares conjugados con glicina*

Cepa	Ácidos biliares (mM)											
	GCDCA				GDCA				GCA			
	0	1	3	5	0	1	3	5	0	1	3	5
*35612	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35624	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*35652	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*35658	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
*35687	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

-, sin crecimiento; +, crecimiento confluente

GCDCA, ácido glicoquenodesoxicólico; GDCA, ácido glicodesoxicólico; CGA, ácido glicocólico.

* comparativo

TABLA 5

*Crecimiento de aislados de *Bifidobacterium* sp. en presencia de ácido cárdeno (CA) no conjugado*

Cepa	Ácido cárdeno (mM)			
	0	1	3	5
*35612	+	+	+	+
35624	+	+	+	+
*35652	+	+	-	-
*35658	+	+	-	-
*35687	+	+	-	-

-, sin crecimiento; +, crecimiento confluente

* comparativo

Ejemplo 4

Actividad antimicrobiana

Las especies de *Bifidobacterium* ejercen efectos inhibidores sobre otras bacterias excluyendo la colonización de larga duración por patógenos invasores. Su actividad antagonista se debe a la producción de ácido acético y láctico a través de la fermentación (Scardovi, V. (1986) *Bifidobacterium* in Bergey's Manual of systemic bacteriology, Vol. 2. Eds. Sheath, P.H., Main, N.S., Sharpe, M. and Holdt, J.G., Williams and Wilkins Publishers, Baltimore M.D., p1418). Existen muy pocos informes sobre la producción de compuestos antimicrobiandos diferentes a ácidos (Anand, S.K. et al . Cult Dairy Prods. 1985; J. 2, 21-23). Las bacteriocinas y otros compuestos pueden influir en la supervivencia de una bacteria en un nicho ecológico y les permiten dominar de manera eficaz los ecosistemas fermentantes. Dicha característica es un buen rasgo para una cepa probiótica.

Los espectros inhibidores de diversas cepas bifidobacterianas se determinaron por el método de Tagg et al. (Tagg, J.R. et al. Bacteriol. Rev. 1976; 40, 722-756). El sobrenadante libre de células se evaluó para la actividad inhibidora frente a un amplio intervalo de microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Se prepararon recubrimientos de cada indicador sobre placas de agar y se dejaron secar. Se colocaron pizcas (5 ml) de sobrenadante libre de células sobre las placas sembradas, se dejaron secar y las placas se incubaron durante una noche.

Se observó que las cepas eran inhibidoras de un amplio intervalo de *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Coliform* y *Bacillus* sp. cuando se ensayaban en medio TPY. Se registraron zonas de inhibición de hasta 4,4 mm contra *Pseudomonas* y *Staphylococcus* y de hasta 7,0 mm que rodeaban *Bacillus* sp. como se muestra en las Tablas 6 y 7. Sin embargo, cuando los ensayos mencionados se realizaron en medio TPY tamponado, no se observaron zonas de inhibición contra ninguna cepa indicadora. Por lo tanto, la inhibición pareció deberse solamente a la presencia de ácido producido por las bifidobacterias.

ES 2 265 331 T3

TABLA 6

*Inhibición de cepas de *Staphylococcus* por *Bifidobacterium sp.* en medio no tamponado**

		**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
		<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	63	35612	35624	35652	35658	35675	35678	35687
5												
10												
15	<i>S. aureus</i> MHS	1,5	2	1,5	3,5	1,5	1	2	2	1	2,5	1,5
	<i>S. aureus</i> HC	1,5	1,5	2	2,5	2	1,5	2,5	2	1,5	1,5	2
20	<i>S. aureus</i> 771	1,5	3	1,5	3	2	2	2,5	2	3	2	3,5
	<i>S. aureus</i> 949	2	3,5	2,5	2	3	3,5	3	2,5	3,5	3,5	2,5
25	<i>S. aureus</i> 1018	1	3,5	1,5	1,5	2	3,5	1	3	3,5	2,5	2
	<i>S. aureus</i> 1502	1,5	3,5	1	2	2,5	2,5	1,5	3	4	2,5	1,5
30	<i>S. aureus</i> 1505	3	4	3	2,5	2,5	3	2,5	4,5	5,5	5	5,5
	<i>S. aureus</i> 1511	1	3,5	2	1,5	2	2,5	3	3,5	4	2,5	3
35	<i>S. aureus</i> 1522	1,5	3	2,5	1	2,5	1,5	2,5	2,5	3,5	3,5	3
	<i>S. aureus</i> 1499	1,5	3,5	1,5	1,5	2	2	3	2	3,5	3,5	1,5
40	<i>S. aureus</i> 1963	2	3	2	2,5	3,5	3,5	3,5	3,5	2,5	3	2,5
	<i>S. aureus</i> PRMM	1	3,5	1	1,5	1	3,5	2	2	3	2	2,5
45	<i>S. albus</i>	1	2	1,5	1	2	2,5	2	1,5	2	1,5	1
	<i>S. carnosus</i>	1	1,5	2	2,5	2,5	2,5	2	2,5	2	1,5	1

* , los valores dados son radios de las zonas de inhibición en mm (distancia desde el borde de la colonia productora hasta el borde de la zona de inhibición)

**, comparativo

50

55

60

65

ES 2 265 331 T3

TABLA 7

*Inhibición de cepas de Pseudomonas y Bacillus por Bifidobacterium sp. en medio no tamponado**

	<i>B. longum</i> 1	<i>B. longum</i> 9	<i>B. longum</i> 10	63	35612	35624	35652	35658	35675	35678	35687	
5	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
10												
15	<i>P. fluorescens</i> HC.	1	2,5	1,5	1	1,5	2	3	2	1,5	2	2,5
20	<i>P. fluorescens</i> MHP	1,5	4,5	3,5	2	2,5	3,5	2,5	2,5	3,5	2	4
25	<i>P. fluorescens</i> DW	1,5	4	4	3,5	2,5	3,5	2,5	4,5	5,5	3,5	5
30	<i>B. cereus</i>	3	3	5	3	4	4	3,5	5	6	4,5	5,5
35	<i>B. subtilis</i>	2	2,5	5	2	3	6	3	6	7	3	6
40	<i>B. circulans</i>	1	2	4	1,5	2,5	1,5	2	3,5	4,5	2	4,5
	<i>B. thuringensis</i>	2,5	3,5	5	3	3,5	4,5	4	5,5	6,5	4,5	5,5

*, los valores dados son radios de las zonas de inhibición en mm (distancia desde el borde de la colonia productora hasta el borde de la zona de inhibición)

**, comparativo

Ejemplo 5

45 *Ensayo de Alimentación Murina para investigar la capacidad de Lactobacillus salivarius subsp. Salivarius UCC 118 y Bifidobacterium longum infantis 35624 para aliviar los síntomas de enfermedad Inflamatoria del Intestino (IBD)*

Antecedentes

50 Recientemente se han generado varios modelos de ratón por medio genético o inmunológico para estudiar los mecanismos de IBD. Uno de estos modelos implica la transferencia de linfocitos T CD4+ derivados del bazo o ganglios linfáticos de ratones normales en varios ratones receptores con inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Se ha demostrado que los ratones que reciben células T CD4+ CD45RB^{high} purificadas desarrollan una enfermedad debilitante caracterizada por inflamación intestinal crónica que es más grave en el colon. En este estudio, se inyectó a un grupo de control de ratones SCID, CD4+ CD45RB^{high} y los ratones desarrollaron una enfermedad debilitante progresiva, incluyendo piloerección del pelaje con aspecto de joroba, diarrea, pérdida de peso y daño en el colon macro y microscópico. Se estableció un rastro de alimentación administrando la cepa UCC 118 y 35624 (también mencionada en este documento UCC 35624) para determinar si los síntomas de IBD podían modificarse en este modelo.

Cepas bacterianas

60 *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salivarius* UCC 118 y *Bifidobacterium longum* infantis UCC 35624 se aislaron de la región ileo-cecal de un ser humano adulto como se describe en el Ejemplo 1. En este ejemplo, se generaron derivados resistentes espontáneos a rifampicina y estreptomicina de las cepas sembrando células, previamente cultivadas durante una noche y posteriormente lavadas en solución de Ringer con un cuarto de potencia en agar MRS y TPY que contenía 50 µg/ml de rifampicina (Sigma) respectivamente y MRS que contenía 400 µg/ml de estreptomicina (Sigma). Las placas se incubaron durante 2 días a 37°C de forma anaeróbica. Se determinó que los derivados resistentes a anti-

ES 2 265 331 T3

bióticos resultantes eran por lo demás fenotípicamente similares a la cepa parental. Este rasgo de selección posibilitó que las cepas se enumeraran fácilmente después del tránsito en el intestino.

Animales y mantenimiento

5 Se adquirieron ratones donantes (C57BL/6 x BALB/c) F1 de Simosen Laboratories (Gilroy, CA) y se mantuvieron en el vivario de la University of California - Los Ángeles en racks ventilados de jaulas (Thoren caging systems, Hazelton, PA) en condiciones libres de patógenos específicos (SPF). Se cruzaron ratones SCID CB-17 en racks ventilados de jaulas originalmente obtenidas de las instalaciones centrales de SCID de la University of California - Los Ángeles.
10 Los ratones eran ratones con la flora reducida (RF) en lugar de libres de gérmenes y actuaban como ratones receptores (Aranda R. et al. *J. of Immunol.* 1997; 158(7), 3464-3473).

15 Se colocaron ratones CB-17 (SCID) hembra de ocho semanas de edad en parejas en jaulas con un filtro superior en racks ventilados. Los ratones se dividieron en cuatro grupos Grupo A: consumía leche desnatada al 10%, control;
20 Grupo B: consumía *Lactobacillus salivarius* UCC 118, Grupo C: consumía *Lactobacillus salivarius* UCC 118 y *Bifidobacterium longum* UCC 35624 9 (proporción 1:1); Grupo D: consumía *Bifidobacterium longum* UCC 35624. UCC 118 y UCC 35624 se cultivaron durante una noche en caldo MRS y caldo MRS suplementado con cisteína al 0,05% (Sigma) respectivamente, se lavaron en PBS, se resuspendieron en leche desnatada (10% (v/v)) y se administraron en el agua de bebida por lo demás estéril (PBS). Los ratones de cada grupo respectivo recibieron $2,55 \times 10^8$ cfu/ml de UCC 118 y $2,35 \times 10^8$ cfu/ml de UCC 35624 diariamente mientras duró el período de alimentación. Los ratones de control recibieron leche estéril diluida en solución salina tamponada con fósfato estéril (PBS) y se mantuvieron en condiciones idénticas que el grupo de ensayo.

Diseño experimental

25 Se administró a todos los ratones CB-17 su alimento respectivo de acuerdo con su agrupación durante 2 días antes de la inyección de células CD4+ CD45RB^{high}. Los linfocitos donantes clasificados ($3-4 \times 10^5$) se representaron en 200 μl de PBS estéril y se inyectaron i.p. en el ratón SCID CB-17 receptor. Todos los ratones se pesaron inicialmente, después de ello se hizo dos veces a la semana. Se observaron para los signos clínicos de enfermedad: piloerección del pelaje con aspecto de joroba y diarrea.
30

Evaluación de los efectos de los agentes probióticos administrados sobre varias bacterias autóctonas que se pueden cultivar a partir de heces de ratón

35 Se investigó la influencia ejercida por UCC 118 y UCC 35624 administrados cuando se administraron solos o en combinación el uno con el otro, sobre la microflora del intestino de ratones SCID CB-17. Se recogieron muestras fecales de cada ratón semanalmente, se pesaron y se resuspendieron en 10 ml de PBS. Después, las muestras se diluyeron en serie en PBS y se sembraron por vertido en placas o se sembraron en extensión en placas en diluciones apropiadas en medios apropiados por duplicado. Se enumeraron los siguientes grupos de bacterias: lactobacilos; bifidobacterias; enterococos, bacteroides y coliformes. Los medios selectivos usados fueron: agar de Mann Rogosa & Sharpe (MRS), agar MRS suplementado con cloruro de litio al 0,2% (BDH), propionato sódico al 0,3% (Fluke chemie), clorhidrato de cisteína al 0,5% (Sigma), sangre de oveja al 5%; agar de Slanetz y Bartley; agar de Wilkins y Chelgren suplementado con suplemento SR 108 anaeróbico y sangre de caballo al 5%; y agar Bilis Rojo Violeta. (Todos Oxoíd salvo que se indique lo contrario). Se incubaron placas VRBA y de Slanetz y Bartley aeróbicamente durante 24 y 45 h respectivamente. Todas las demás placas se incubaron anaeróbicamente durante 48 h a 37°C.
40
45

Enumeración de la flora autóctona cultivable de segmentos específicos del G.I.T. de ratones SCID CB-17

50 Después del período de alimentación se sacrificó y diseccionó a todos los animales. Se retiraron segmentos de la región ileo-cecal, el intestino delgado, y el intestino grueso. También se tomó un ganglio linfático periférico (PLN), un ganglio linfático mesentérico (MLN) y un trozo del bazo. Todos los tejidos se pesaron antes de resuspenderse en 10 ml de PBS. Después las muestras se homogeneizaron y se diluyeron en serie en PBS y se sembraron en extensión en placas o se sembraron por vertido en placas en diluciones apropiadas en medios apropiados por duplicado. Los grupos de bacterias se enumeraron igual que los enumerados en el análisis de heces y las muestras se incubaron como se ha descrito previamente.
55

Preparación de linfocitos intraepiteliales y de la lamina propia

60 Se realizó el aislamiento de los linfocitos de la mucosa de acuerdo con el método de Aranda, T. et al ((1997) supra).

Análisis por citometría de flujo de poblaciones de linfocitos

65 Los análisis se realizaron como se describe por Aranda, R. et al . ((1997) supra).

ES 2 265 331 T3

Preparación de tejido para el análisis histopatológico

Se tomaron muestras tisulares del intestino delgado, intestino grueso, y región ileo-cecal y se fijaron en formalina al 10%. El procedimiento fue como se describe en Aranda, R. et al . ((1997) *supra*).

5 Se observó del experimento realizado que, de forma coherente con los resultados previos, los ratones SCID reconstituidos con linfocitos T CD4+ CD45RB^{high} y que consumían sólo leche desnatada (control) desarrollaron una enfermedad debilitante progresiva, identificada por su pérdida significativa de peso. La enfermedad llegó a ser evidente de aproximadamente 2 semanas y media a tres semanas y el ratón enfermo manifestó característicamente una 10 piloerección de su pelaje con aspecto de joroba, y deposiciones blandas. Uno de los ratones en el grupo de control (ratón 4) murió después de 25 días y los ratones 1, 2, 3 y 5 mostraron un cambio de peso en porcentaje del 20%, 25%, 21% y 35% respectivamente como se representa en las Figs. 3 y 4.

15 Los ratones SCID CB-17 que consumían UCC 118 solo dieron un resultado similar que los controles con la pérdida de peso característica. El ratón 3 murió después de 14 días, y los ratones 4, 5 y 6 mostraron un cambio de peso en porcentaje del 15%, 25% y 28% respectivamente (datos no mostrados). Se descubrió que los ratones que consumían una combinación de UCC 118 y UCC 35624 tenían una mejora pronunciada sobre los ratones de control. Estos ratones 20 no perdieron tanto peso como los ratones de control después del período de alimentación. Incluso después de 35 días, tres de los ratones de este grupo mostraron un pequeño cambio de peso en porcentaje. (Figs. 5 y 6). Dos de los ratones en este grupo mostraron una pérdida de peso sólo después de aproximadamente 30 días mientras que los ratones de control mostraron una pérdida de peso a los 14 días (Figs. 3 y 4).

25 Los ratones que consumieron UCC 35624 solo, parecieron de buena salud y otra vez, la pérdida de peso en comparación con los controles, fue considerablemente menor (Figs. 7 y 8). Por lo tanto, se concluyó que el consumo de UCC 35624 solo o en combinación con UCC 118 alivia los síntomas de enfermedad inflamatoria del intestino.

30 La Tabla 8 es un resumen de los datos experimentales para el estudio sobre el tratamiento de colitis por CD45RB inducida en ratones CB17 y SCID con un cóctel de UCC 118 y UCC 35624.

35 Se descubrió en los estudios que los ratones se reconstituyan con éxito con linfocitos y linfocitos que se han obtenido del modelo donante (datos no mostrados)

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 265 331 T3

TABLA 8

Tratamiento de colitis por CD45RB inducida en ratones SCID CB-17 con un cóctel de Lactobacillus salivarius UCC 118 y Bifidobacterias

Órgano	Ratón 1 No tratado (células RB hi + leche desnatada)	Ratón 2 No tratado (células RB hi + leche desnatada)	Ratón 3 Tratado con cóctel	Ratón 4 Tratado con cóctel	Ratón 5 Tratado con cóctel	Ratón 6 Tratado con cóctel
pérdida de peso %	31,25	27,74	14,50	14,05	21,88	11,18
Aspecto Final	parece enfermo	muy enfermo	muy sano	ligeramente enfermo	sano	sano
Aspecto de las deposiciones	muy aguada	muy aguado	aguado	sólida	semi sólida	semi sólida
Aspecto del Colon	engrosado	muy engrosado	ligeramente engrosado	ligero engrosamiento proximal	ligeramente engrosado	ligero engrosamiento proximal
Nº SIEL	100.000	200.000	0	0	512.000	28.000
Nº LIEL	25.000	72.000	100.000	50.000	384.000	96.000
Nº SLPL	200.000	100.000	264.000	200.000	640.000	104.000
Nº LLPL	96.000	256.000	160.000	160.000	256.000	160.000
Nº MLN	0	N/A	81.900	N/A	28.800	N/A
Nº PLN	0	192.000	0	120.000	64.000	0
Nº de linfocitos en el bazo	960.000	512.000	640.000	640.000	512.000	6.400.000
Corrección del flujo CD3+/H2Kb+ %						
Nº SIEL	62.000	114.000	0	0	450.560	17.920
Nº LIEL	21.250	48.960	74.800	38.000	345.600	65.280
Nº SLPL	74.000	42.000	158.400	136.000	384.000	66.460
Nº LLPL	67.200	161.280	115.200	108.000	184.320	108.800
Nº MLN	0	N/A	130.00	N/A	64.000	N/A
Nº PLN	0	126.720	0	87.600	54.400	0
Bazo	518.400	102.400	211.200	307.200	230.400	4.480.000
Recuentos de bacterias UCC 118 (por biopsia) post mortem						
SI	0	0	1.200	0	0	0
LI	0	0	>30.000	>30.000	100	11.600
Ciego	0	0	>30.000	>30.000	>30.000	>30.000
Bazo	0	0	0	1.350	0	0
Valoración Patológica del Colon						
A (0-3)	-	1,0	1,0	2,0	-	-
B (0-2)	-	1,5	1,0	1,0	-	-
C (0-3)	-	2,5	1,0	2,0	-	-
D (0-3)	-	2,0	3,0	3,0	-	-
E (1-3)	-	1,0	1,0	2,0	-	-
Notas						
Valor Total	-	8,0	7,0	10,0	-	-

A: Grado de infiltrado inflamatorio; B: Eliminación de mucina; C: Hiperplasia de los epitelios; D: Nº de TEL en las criptas; E: Nº de focos inflamatorios por campo de alta potencia

ES 2 265 331 T3

Ejemplo 7

Estudios *in vitro* para examinar la percepción inmune de *Bifidobacterium longum infantis*

5 Se incubaron cultivos lavados durante una noche de Bifidobacterias con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de voluntarios sanos ($n=9$) y pacientes que padecen enfermedad inflamatoria del intestino ($n=5$). Se midió la producción de la citoquina proinflamatoria factor de necrosis tumoral α (TNF α) por ELISA en sobrenadantes de setenta y dos horas de cultivo. La co-incubación de *Bifidobacterium longum infantis* con PBMC humanas no provocó la estimulación de la producción de TNF α (Figura 9). Por tanto, la exposición del sistema inmune sistémico
10 a esta bacteria no induce una respuesta inflamatoria.

Para evaluar la percepción inmune de *Bifidobacterium longum infantis* en las superficies mucosas, se realizó el co-cultivo de células epiteliales y PBMC en cámaras transpocillo. En resumen, se cultivó una monocapa de células epiteliales en la cámara superior y se incubaron PBMC en el compartimiento inferior. Estos estaban separados el uno
15 del otro por una membrana porosa que permitía el paso de mediadores solubles entre los dos compartimientos pero no permitía el contacto célula-célula. Usando este modelo, se midió la producción de TNF α e interleuquina-8 (IL-8) en presencia y ausencia de *Bifidobacterium longum infantis* en el compartimiento de PBMC. El co-cultivo de células epiteliales, PBMC y *Bifidobacterium longum infantis* provocó una supresión significativa de la producción de TNF α e IL-8 (Figura 10). Por tanto, una red tricelular que implica células epiteliales, PBMC y *Bifidobacterium longum infantis*
20 provoca la supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias.

Ejemplo 8

Actividad anti-inflamatoria *in vivo* de *Bifidobacterium longum infantis*

25 Se consumieron *Bifidobacterium longum infantis* (1×10^9 células por día) por 18 seres humanos sanos en un producto lácteo fermentado (yogurt) durante tres semanas. Se recogió suero para el análisis de citoquinas antes y después del consumo de esta cepa probiótica. Se obtuvieron muestras fecales para los análisis microbiológicos.

30 Se observó una modificación considerable de los niveles de citoquinas en sangre periférica en este estudio de alimentación. Los niveles en suero del receptor soluble de la interleuquina-6 (sIL-6R, $p=0,007$), Interferón- γ (IFN γ , $p=0,041$) y IL-8 ($p=0,004$) se redujeron significativamente después del consumo de esta cepa probiótica (Figura 11). No se observó ninguna alteración en los niveles en suero de TNF α y antagonistas del receptor de interleuquina-1 (IL-1RA) (Figura 12). Se detectó *Bifidobacterium longum infantis* a aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de colonias por gramos de materia fecal después de transcurso de este estudio de alimentación.
35

40 Los criterios de selección *in vitro* dirigidos que reflejan las interacciones complejas del medio GI permiten la identificación de cepas probióticas capaces de funcionar de forma eficaz cuando se reintroducen en ese medio. Usando los criterios de selección mostrados anteriormente, la bacteria probiótica *Bifidobacterium longum infantis* ha mostrado propiedades inmunomoduladoras *in vitro*. Después del consumo por ratones SCID y voluntarios humanos, se observó una modificación significativa de los parámetros inmunes sistémicos. Por tanto, el uso de *Bifidobacterium longum infantis* como agente bioterapéutico en el tratamiento de enfermedades mediadas por el sistema inmune está justificado.
45

Ejemplo 9

Medida de TNF α en sobrenadante libre de células de *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624

50 Se centrifugaron cultivos de una noche de *Bifidobacterium longum infantis* y el sobrenadante del cultivo libre de células se examinó para la presencia de inhibidores de citoquinas. Los sobrenadantes libres de células se incubaron con TNF α humano durante 20 minutos a 37°C. Después de ello, se cuantificaron los niveles de TNF α por ELISA. Despues de la exposición al sobrenadante de Bifidobacterias, los niveles de TNF α se redujeron significativamente (Figura 13). Por tanto, *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624 secreta un factor que antagoniza la actividad de TNF α . La producción de este factor por *Bifidobacterium longum infantis* en la superficie del tracto gastrointestinal, *in vivo*, restringiría significativamente la respuesta inflamatoria del hospedador.
55

55 Esto indica que el antagonismo de TNF α también sucede a un nivel molecular debido al factor soluble liberado por UCC 35624.

Inflamación

60 La inflamación es el término usado para describir la acumulación local de fluido, proteínas plasmáticas y glóbulos blancos en el sitio que ha sufrido el daño físico, infección o en el que hay una respuesta inmune en curso. El control de la respuesta inflamatoria se ejerce a varios niveles (para una revisión, véase, Henderson B., and Wilson M. 1998. In "Bacteria-Cytokine interactions in health and disease. Portland Press, 79-130). Los factores de control incluyen citoquinas, hormonas (por ejemplo, hidrocortisona), prostaglandinas, intermedios reactivos y leucotrienos. Las citoquinas son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular que están implicadas en la generación y control de respuestas inmunológicas e inflamatorias, regulando también el desarrollo, reparación tisular y hematopoyesis. Proporcionan un medio de comunicación entre los leucocitos en sí mismos y también con otros tipos celulares.
65

ES 2 265 331 T3

La mayoría de las citoquinas son pleiotrópicas y expresan múltiples actividades biológicamente solapantes. Cascadas y redes de citoquinas controlan la respuesta inflamatoria en lugar de la acción de una citoquina particular en un tipo celular particular (Aral KI, et al., Annu Rev Biochem 1990; 59:783-836). La disminución de la respuesta inflamatoria provoca concentraciones más bajas de las señales activadoras apropiadas en otros mediadores inflamatorios que conducen al cese de la respuesta inflamatoria. TNF α es una citoquina proinflamatoria central ya que inicia una cascada de citoquinas y efectos biológicos que provoca el estado inflamatorio. Por lo tanto, actualmente se están usando agentes que inhiben TNF α para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, infliximab.

Se cree que las citoquinas proinflamatorias juegan un papel principal en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias, incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino (IBD). Las terapias actuales para tratar IBD están dirigidas a reducir los niveles de estas citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-8 y TNF α . Se ha sugerido que las terapias también pueden jugar un papel significativo en el tratamiento de enfermedades inflamatorias sistémicas tales como artritis reumatoide. Los seres humanos alimentados con yogurt que contiene *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624 han mostrado disminuciones pronunciadas en sus niveles sistémicos de IL-8. Esta cepa, por lo tanto, puede tener una aplicación potencial en el tratamiento de un intervalo de enfermedades inflamatorias, particularmente si se usa en combinación con terapias anti-inflamatorias actuales, tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE) o infliximab.

Enfermedad Diarreica

La función de la barrera del epitelio intestinal puede verse disminuido durante la secreción mediada por el sistema nervioso (acetilcolina) e inmune (histamina). Ciertas toxinas bacterianas también pueden inducir la secreción dependiente de Ca²⁺ y PKC y por lo tanto pueden alterar la barrera epitelial (Ganguly NK and Kaur Y. Indian J Med Res 1996; 104:28-37, Groot JA. Vet Q 1998; 20 (S3): 45-9). Varios estudios han examinado la prevención y tratamiento de la diarrea usando bacterias probióticas. Los estudios prospectivos han demostrado la eficacia de la administración de bacterias acidolácticas tanto para su uso profiláctico como terapéutico contra diarrea en bebés prematuros, recién nacidos, niños (Isolauri E, et al., Dig Dis Sci 1994 Dec; 39 (12): 2595-600) y en el tratamiento de diarrea relacionada con antibióticos (Siitonen S, et al., Ann Med 1990 Feb; 22(1): 57-9) y diarrea del viajero (Oksanen PJ, et al., Ann Med 1990 Feb; 22 (1): 53-6).

Se ha examinado el consumo de *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624 por ratones SCID. Se descubrió que la actividad anti-inflamatoria se atenuaba significativamente y los ratones que consumían *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624 retén depositiones sólidas mientras que los ratones de control padecían diarrea. Las Fig. 14 y 15 ilustran el intestino delgado de ratones SCID tratados y no tratados. El intestino delgado mostrado incluye el ciego 2, intestino 3 y ano 5. En la Fig. 14, los ratones se trajeron con *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624 y es evidente que las depositiones sólidas 4 se han retido en el intestino. En comparación, la Fig. 15 muestra el intestino 3 de un ratón no tratado, característicamente inflamado. No ha sucedido absorción de agua de modo que no se retienen depositiones sólidas provocando diarrea.

El efecto anti-diarreico observado puede relacionarse con la actividad anti-inflamatoria, posiblemente mediada por la modulación de AMPc. La secreción de Cl dependiente de AMP cíclico es la vía secretora principal en el intestino humano (Brzuszcak IM, et al., J. Gastroenterol. Hepatol. 1996; 11(9): 804-10). Puede deducirse que el efecto anti-diarreico de *Bifidobacterium longum infantis* UCC 35624 no está restringido a diarrea provocada por inflamación gastrointestinal, sino que puede aplicarse al tratamiento general de enfermedad diarreica.

Enfermedad Autoinmune

El sistema inmune tiene un gran repertorio de especificidades expresadas por células B y T. Algunas de estas especificidades se dirigían a componentes propios. El reconocimiento de lo propio normalmente está controlado por la delección clonal e inactivación de linfocitos autorreactivos. Sin embargo, hay un fondo constante de autoinmunidad con anticuerpos contra muchas proteínas que se encuentran en el suero. Un derrumbamiento del sistema de reconocimiento de lo propio-no propio provoca autoinmunidad. Cuando sucede una enfermedad autoinmune, la respuesta inmune resultante daña el tejido que alberga el antígeno ofensivo. La deposición del complejo inmune, hipersensibilidad de tipo II y reacciones mediadas por células son los mecanismos más importantes por los que sucede el daño inmunopatológico. Los ejemplos de enfermedades autoinmunes incluyen, aunque sin limitación, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, diabetes mellitus dependiente de insulina, miastenia grave y anemia perniciosa. El *Bifidobacterium longum infantis* y *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* son bacterias inmunomoduladoras. Por tanto, su consumo como componentes únicos o en combinación de estas bacterias por pacientes que padecen enfermedades autoinmunes puede restringir el daño a los órganos y ayudar a la restauración de la homeostasis corporal normal.

Inflamación y Cáncer

La producción de citoquinas multifuncionales a través de un amplio espectro de tipos de tumores sugiere que se están desarrollando respuestas inflamatorias significativas en pacientes con cáncer. Actualmente no queda claro qué efecto protector tiene esta respuesta contra el crecimiento y desarrollo de células tumorales *in vivo*. Sin embargo, estas respuestas inflamatorias podrían afectar de manera adversa al hospedador que tiene un tumor. Las interacciones de citoquinas complejas están implicadas en la regulación de la producción de citoquinas y la proliferación celular en tejidos tumorales y normales (McGee DW, et al., Immunology 1995 Sep; 86(1): 6-11, Wu S, et al., Gynecol Oncol

ES 2 265 331 T3

1994 Apr; 53(1): 59-63). Desde hace tiempo se ha reconocido que la pérdida de peso (caquexia) es la única causa más habitual de muerte en pacientes con cáncer (Inagaki J, et al., Cancer 1974 Feb; 33(2): 568-73) y la malnutrición inicial indica un mal pronóstico (Van Eys J. Nutr Rev 1982 Dec; 40(12): 353-9). Para que un tumor crezca y se propague debe inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos y degradar la matriz extracelular. La respuesta inflamatoria puede

- 5 tener papeles significativos que juegan en los mecanismos anteriores, contribuyendo de este modo al declive del hospedador y la progresión del tumor. Debido a la naturaleza anti-inflamatoria de estas cepas bacterianas, se puede reducir la proporción de transformación de células cancerosas. Además, las bacterias intestinales pueden producir, a partir de compuestos de la dieta, sustancias con actividad genotóxica, carcinogénica y promotora de tumores y las bacterias del intestino pueden activar pro-carcinógenos en agentes reactivos al ADN (Rowland I.R. (1995). Toxicology of the
10 colon: role of the intestinal microflora. In: Gibson G.R. (ed). Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology, pp 155-174. Boca Raton CRC Press). En general, las especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* tienen bajas actividades de enzimas metabolizantes xenobióticas en comparación con otras poblaciones en el intestino tales como bacteroides, eubacterias y clostridia (Salto Y., et al., Microb. Ecol. Health Dis., 1995; 5, 105-110). Por lo tanto, aumentando la cantidad de bacterias acidolácticas en el intestino podría modificarse de manera beneficiosa los niveles
15 de estas enzimas.

Agentes prebióticos

La introducción de organismos prebióticos se consigue por la ingestión de los microorganismos en un vehículo adecuado. Sería ventajoso proporcionar un medio que promoviera el crecimiento de estas cepas probióticas en el intestino grueso. La adición de uno o más oligosacáridos, polisacáridos, u otros prebióticos potencia el crecimiento de bacterias acidolácticas en el tracto gastrointestinal (Gibson, GR. Br. J. Nutr. 1998; 80 (4): S209-12). Los agentes prebióticos se refieren a cualquier componente alimenticio no viable que se fermenta específicamente en el colon por bacterias autóctonas que se cree que son de valor positivo, por ejemplo, bifidobacterias, lactobacilos. Los tipos de agentes prebióticos pueden incluir los que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa. La administración combinada de una cepa probiótica con uno o más compuestos prebióticos puede potenciar el crecimiento del agente probiótico administrado *in vivo* provocando un beneficio para la salud más pronunciado, y se llama simbiótico.

Otros ingredientes activos

Se apreciará que el *Bifidobacterium* puede administrarse profilácticamente o como un método de tratamiento por sí solo o con otros materiales probióticos y/o prebióticos como se ha descrito anteriormente. Además, las bacterias pueden usarse como parte de un régimen profiláctico o de tratamiento usando otros materiales activos tales como los usados para tratar la inflamación y otros trastornos, especialmente los del tracto gastrointestinal. Dichas combinaciones pueden administrarse en una formulación única o como formulaciones diferentes administradas al mismo o diferentes momentos y usando la misma o diferentes vías de administración.

La invención no se limita a las realizaciones descritas hasta ahora que pueden variarse en el detalle.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Bifidobacterium longum infantis* UCC35624 (NCIMB 41003).
- 5 2. Una cepa de *Bifidobacterium longum infantis* UCC35624 (NCIMB 41003) o un mutante variante de la misma.
3. Una cepa de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante es un mutante genéticamente modificado.
- 10 4. Una cepa de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la variante es una variante de origen natural.
5. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en forma de células viables.
6. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en forma de células no viables.
- 15 7. Una formulación que comprende una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende otro material probiótico.
- 20 9. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, que comprende un material prebiótico.
10. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, que comprende un vehículo ingerible.
- 25 11. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el vehículo ingerible es un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo.
12. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el vehículo ingerible es un producto alimenticio tal como leche ácida, yogurt, yogurt congelado, leche en polvo, concentrado de leche, quesos untados, aliños, o bebidas.
- 30 13. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, que comprende adicionalmente una proteína y/o péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricas en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, un mineral y/o un elemento traza.
- 35 14. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en la que la cepa está presente a más de 10⁶ cfu por gramo de sistema de suministro.
15. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, que comprende un adyuvante.
- 40 16. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, que comprende un componente bacteriano.
17. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, que comprende una entidad de fármaco.
- 45 18. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17, que comprende un compuesto biológico.
19. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18 para inmunización oral.
- 50 20. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en productos alimenticios.
21. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso como medicamento.
- 55 22. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una actividad inflamatoria no deseable.
- 60 23. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable tal como enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, bursitis o colitis después de infección.
- 65 24. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una

ES 2 265 331 T3

cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de cáncer o cánceres gastrointestinales.

25. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una
5 cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad sistémica tal
como artritis reumatoide.

26. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una
10 cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos autoinmunes debidos
a una actividad inflamatoria no deseable.

27. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de cáncer debido a una actividad
15 inflamatoria no deseable.

15 28. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis del cáncer.

20 29. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad diarreica
debida a una actividad inflamatoria no deseable, tal como diarrea asociada con *Clostridium difficile*, diarrea asociado
con rotavirus o diarrea después de infección.

25 30. Una cepa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una formulación de acuerdo con una
cualquiera de las reivindicaciones 7 a 19 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento del síndrome del intestino irritable.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 265 331 T3

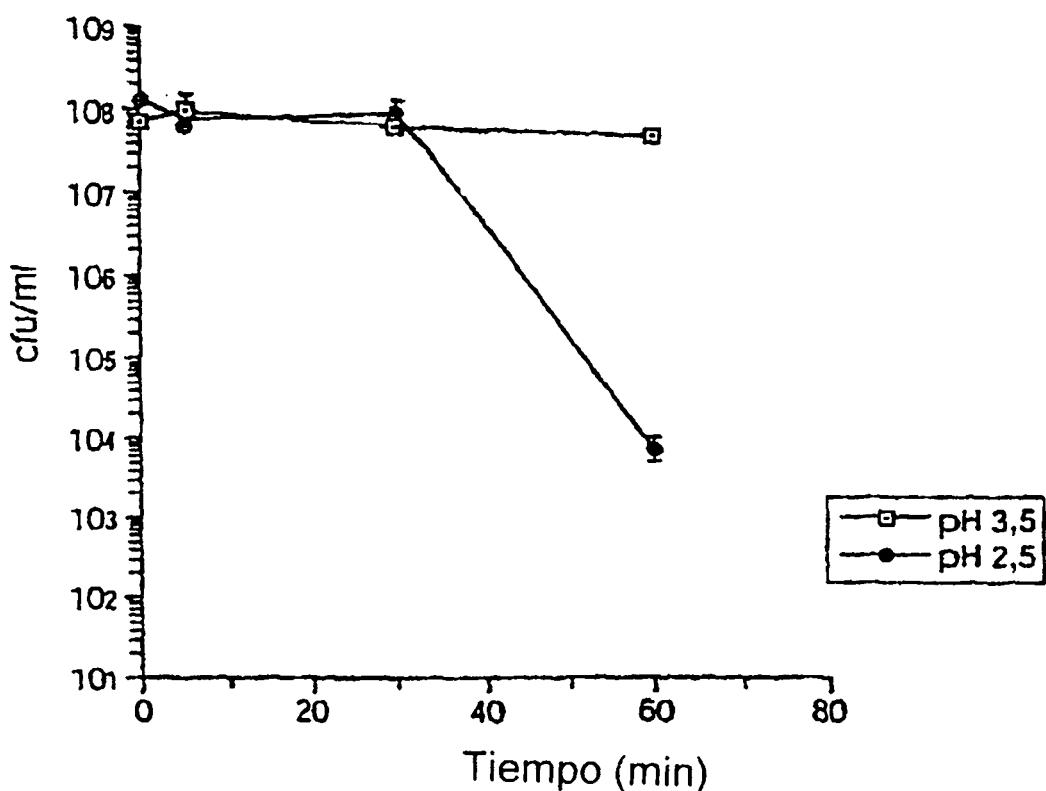


Fig. 1
(Comparativa)

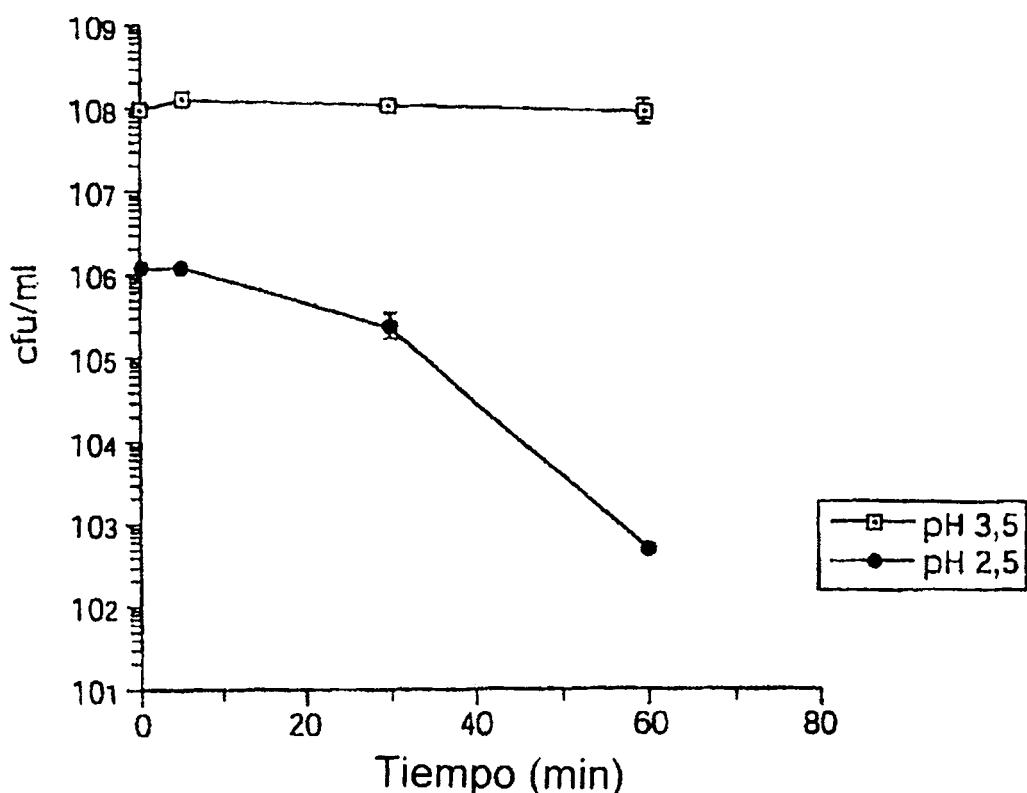


Fig. 2

ES 2 265 331 T3

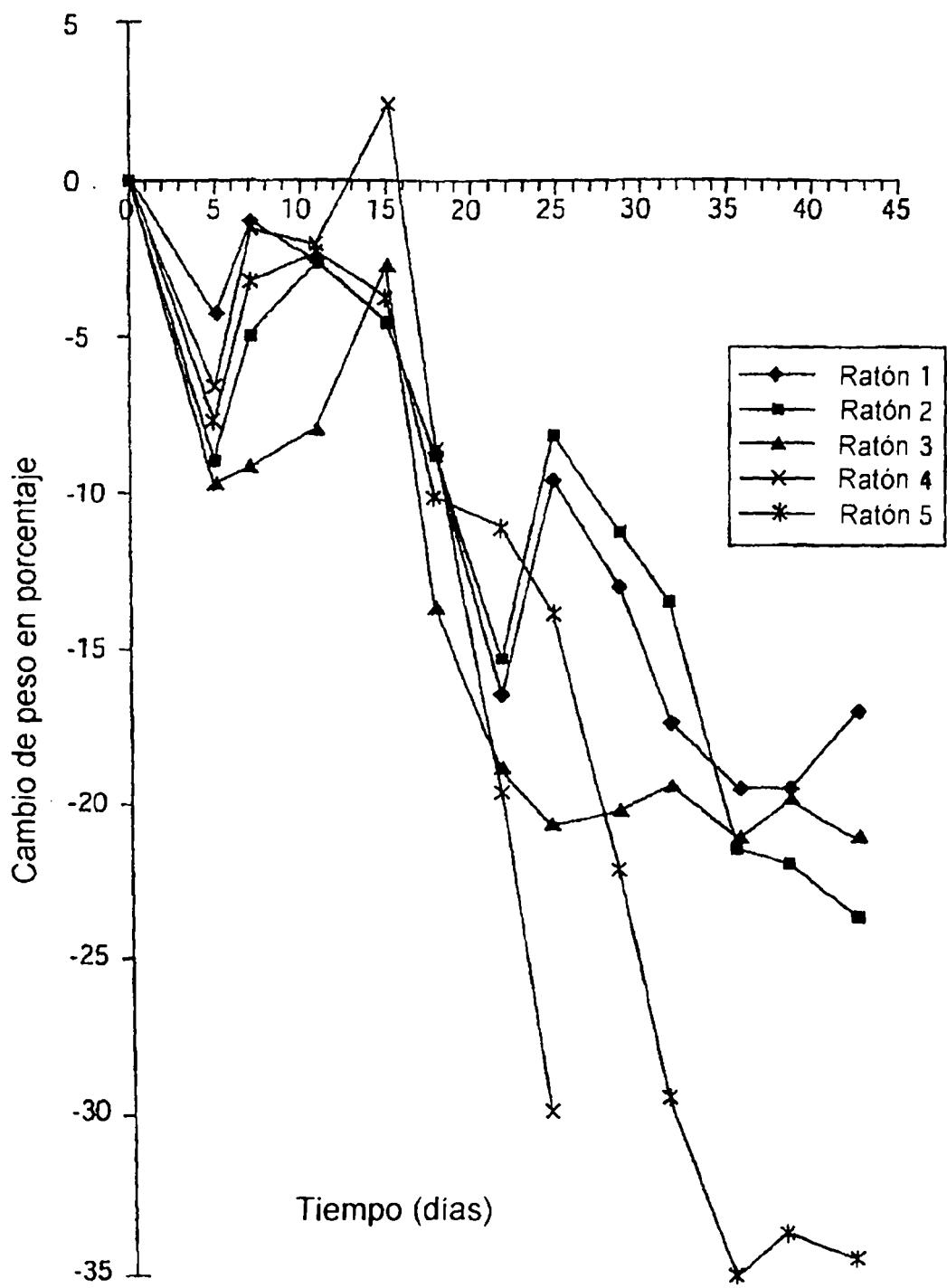


Fig. 3

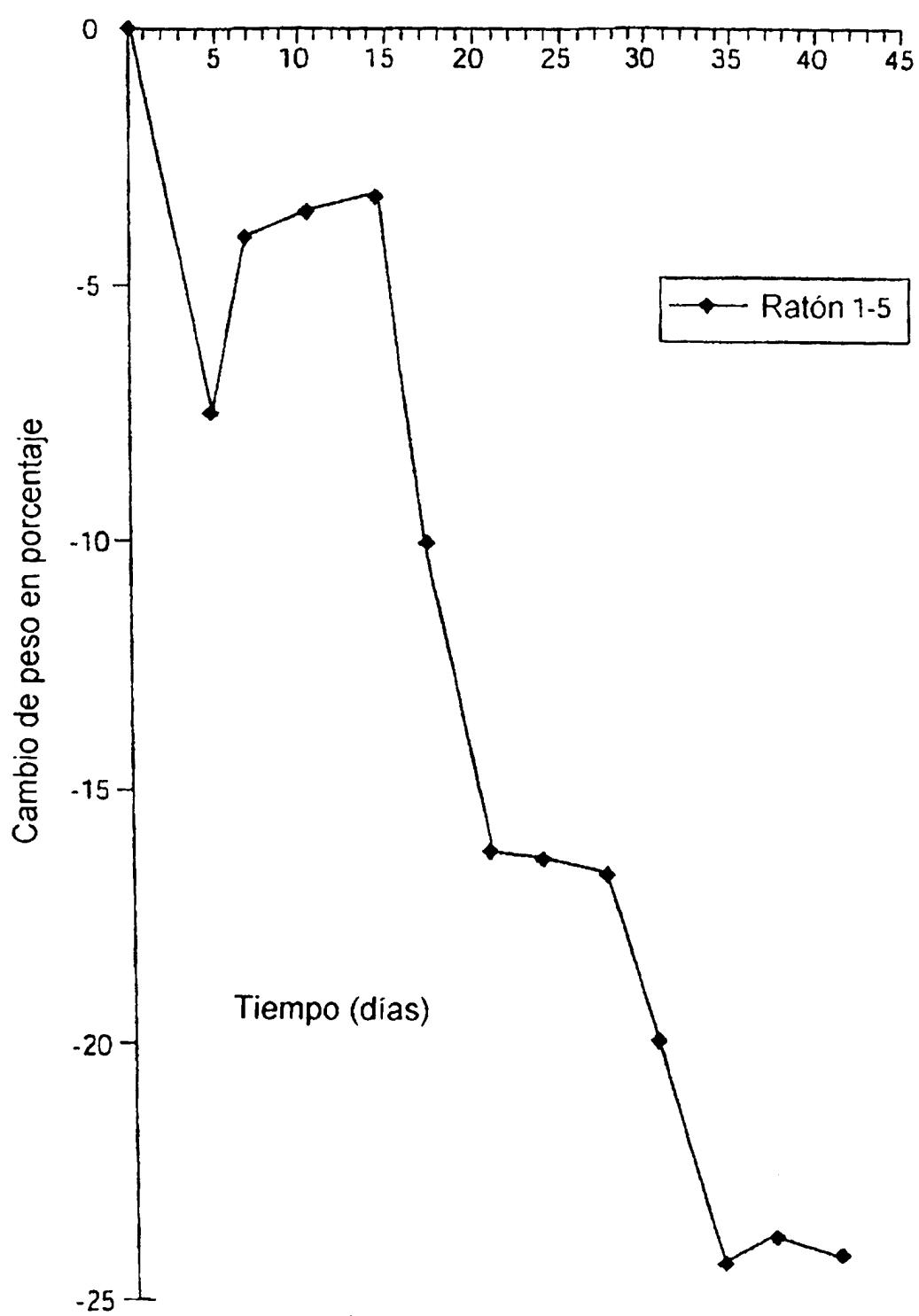


Fig. 4

ES 2 265 331 T3

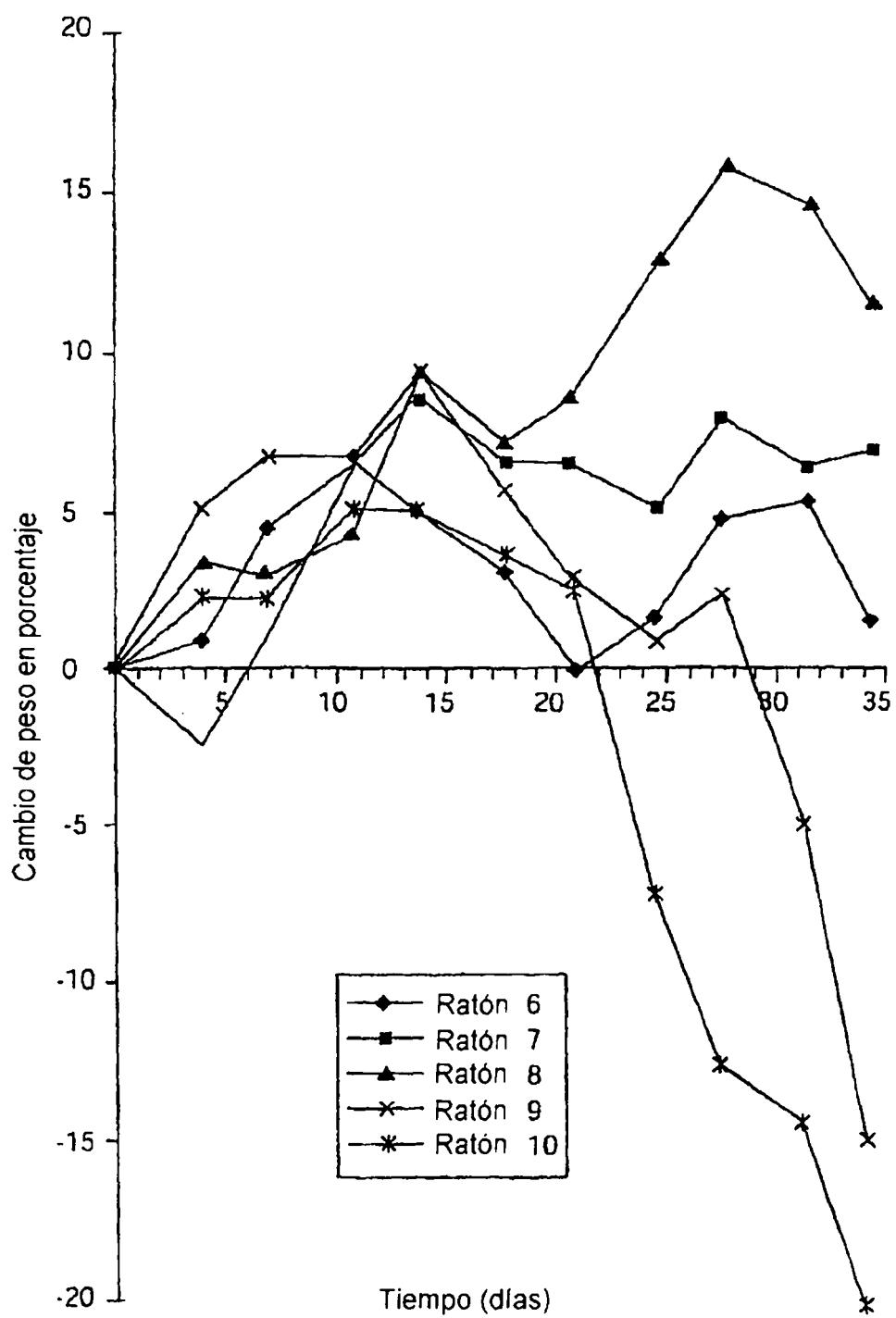


Fig. 5

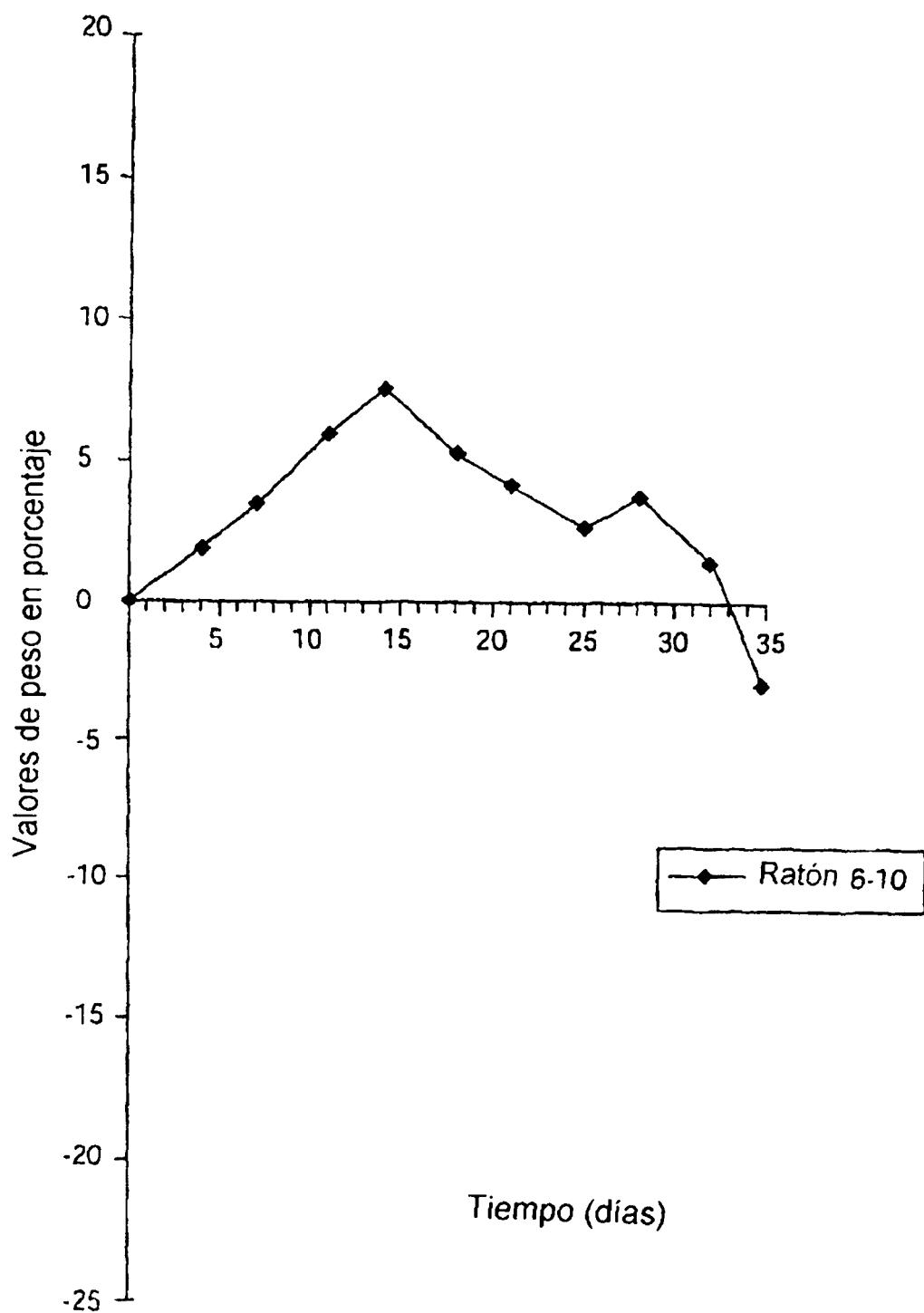


Fig. 6

ES 2 265 331 T3

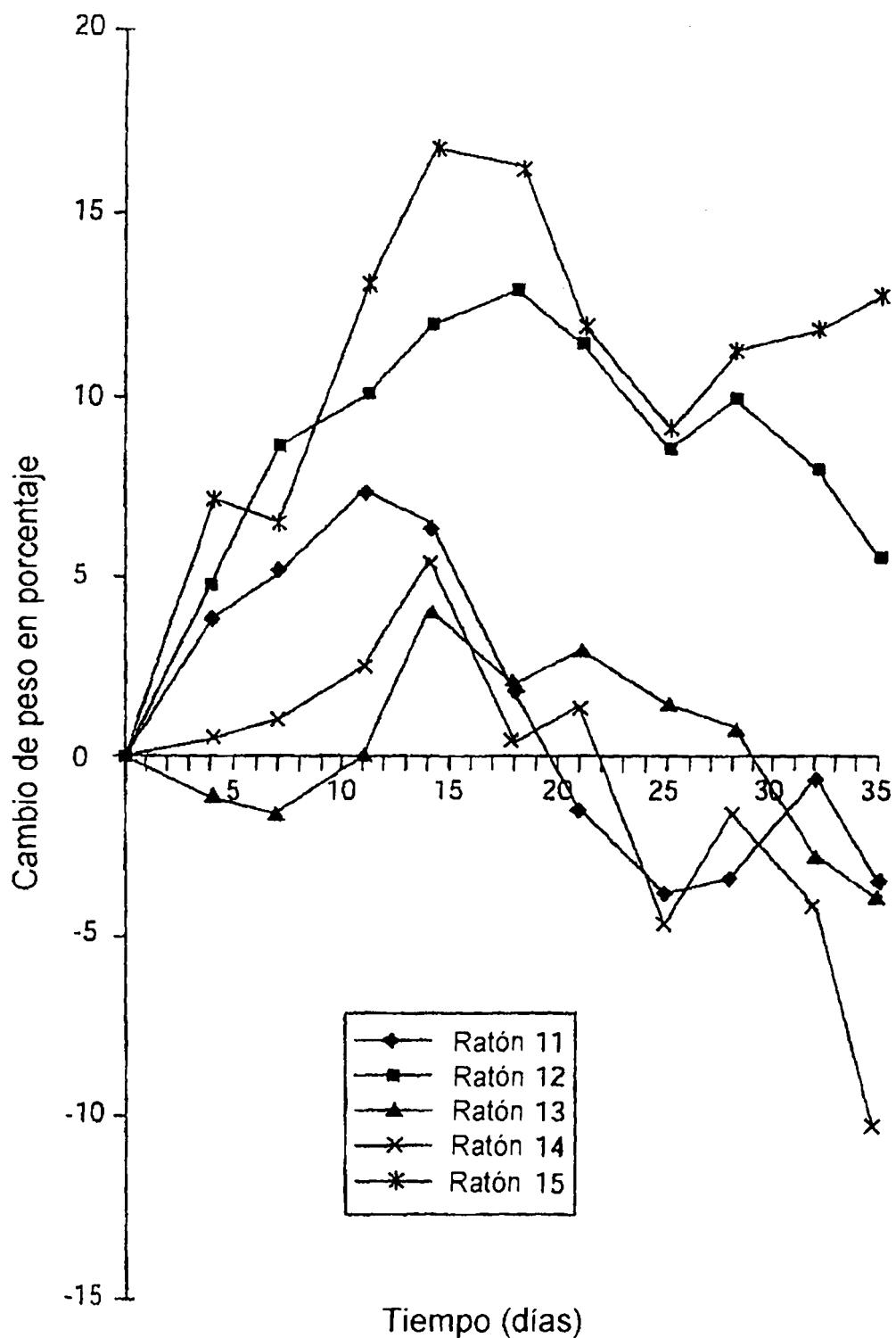


Fig. 7

ES 2 265 331 T3

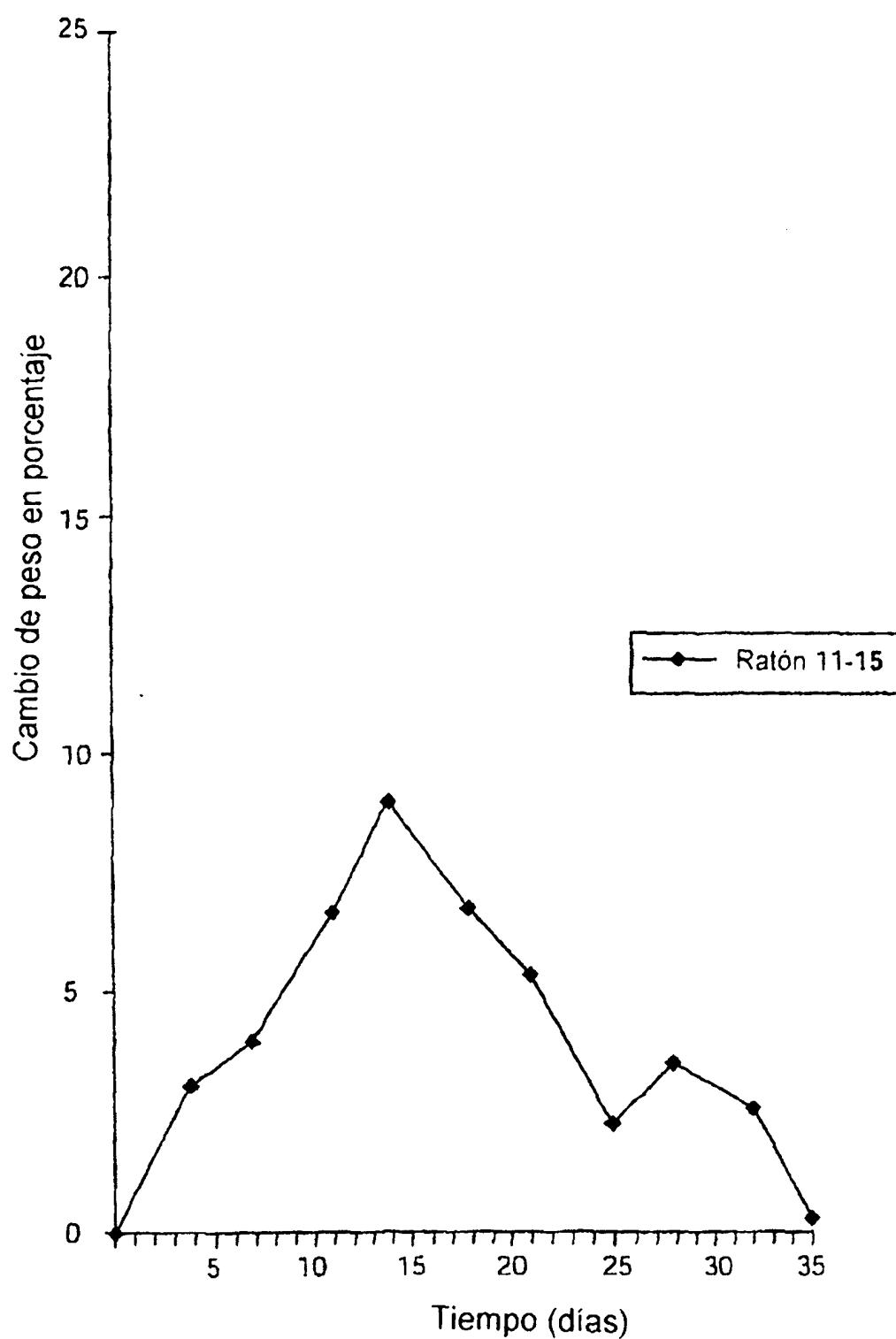


Fig. 8

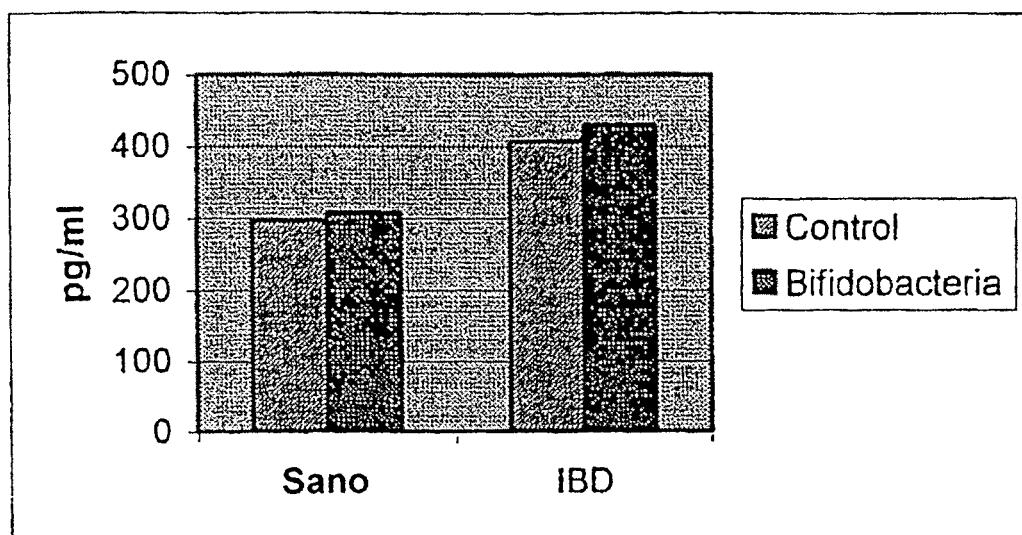


Fig. 9

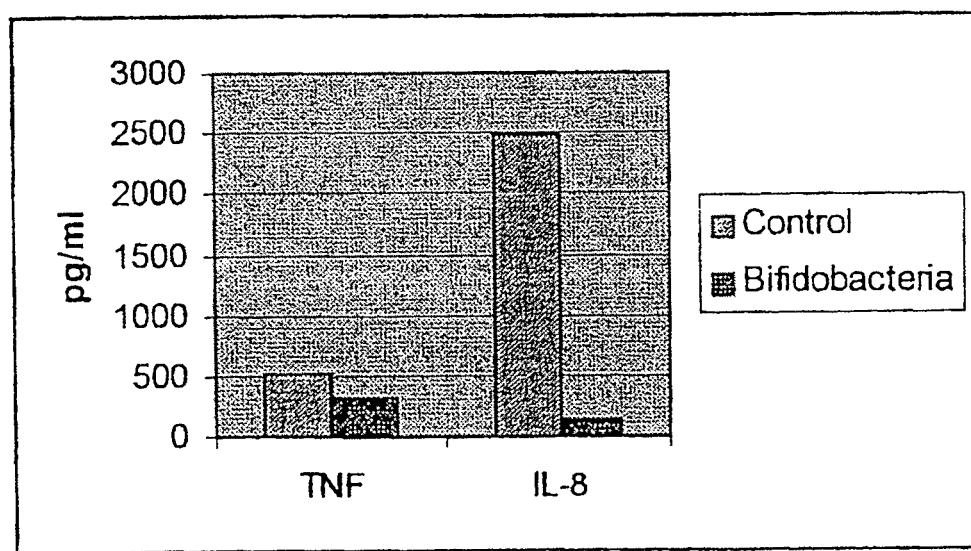


Fig. 10

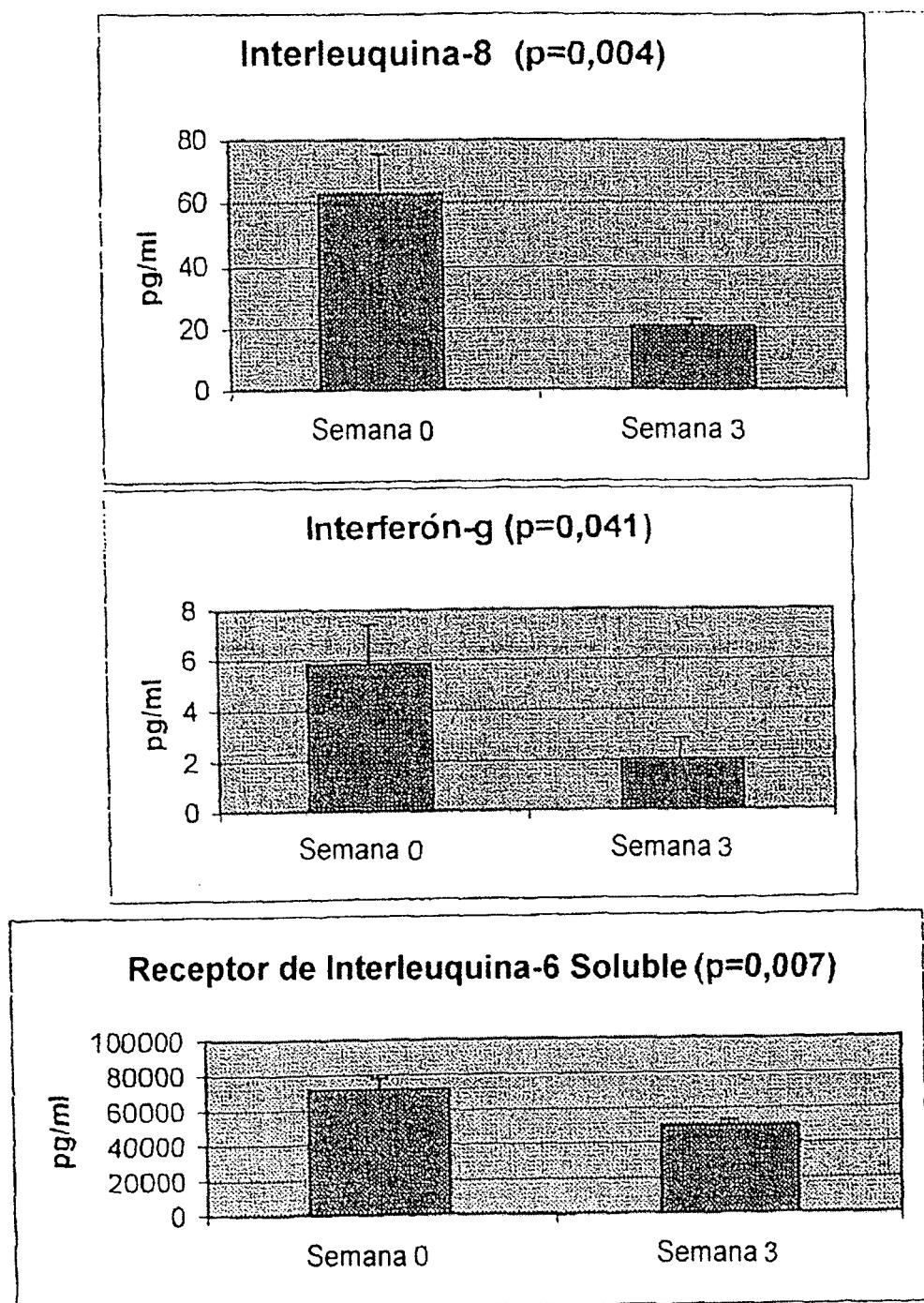
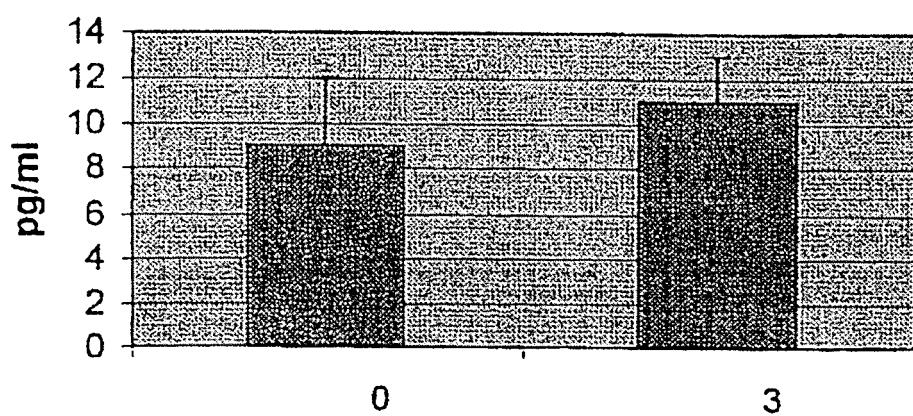


Fig. 11

Factor de Necrosis Tumoral (p=0,544)



**Antagonista del Receptor de Interleuquina-1
(p=0,306)**

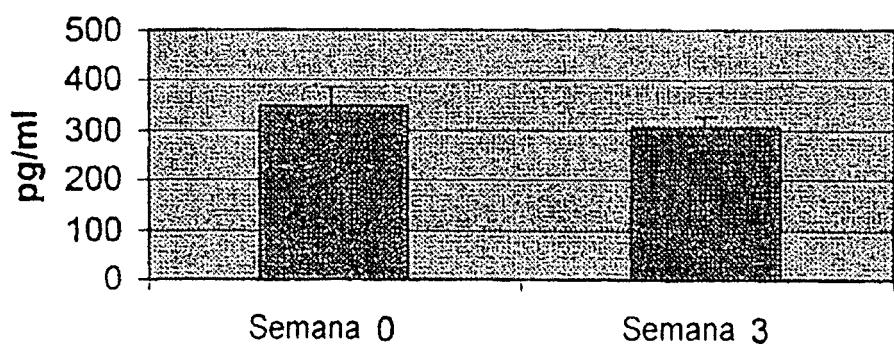


Fig. 12

ES 2 265 331 T3

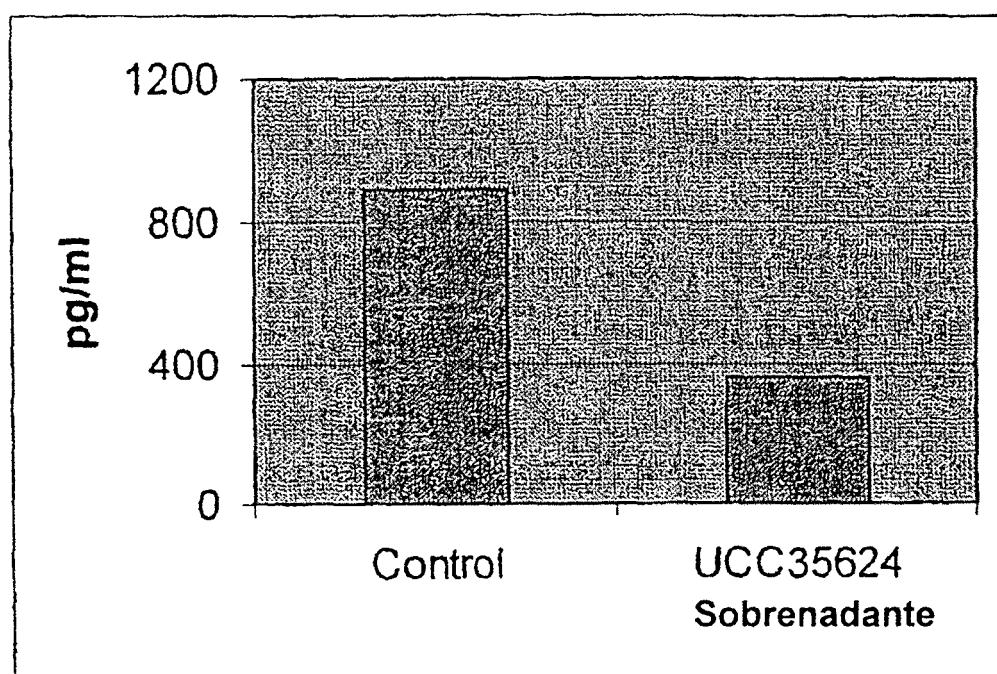


Fig. 13

ES 2 265 331 T3

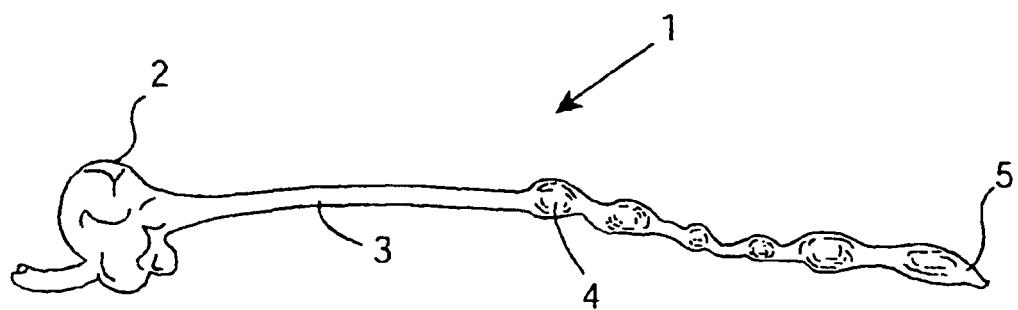


Fig. 14

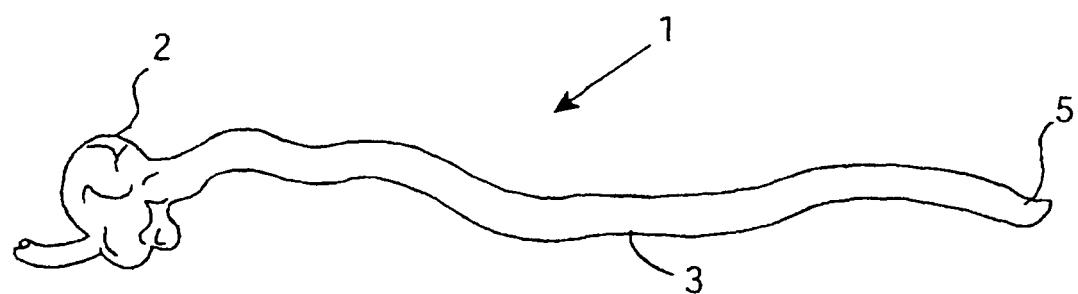


Fig. 15