

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 211**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A23L 1/29 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07704583 .9**
96 Fecha de presentación: **14.02.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1986669**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2008**

54 Título: **Uso del Bifidobacterium longum para prevenir y tratar inflamaciones**

30 Prioridad:
15.02.2006 EP 06101690

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
NESTEC S.A.
AVENUE NESTLÉ 55
1800 VEVEY, CH

72 Inventor/es:
MERCENIER, Annick;
BLUM-SPERISEN, Stéphanie y
ROCHAT, Florence

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 381 211 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

Uso del *Bifidobacterium longum* para prevenir y tratar inflamaciones.

5 La presente invención se refiere a un método para prevenir y tratar inflamaciones.

Recientemente algunas cepas bacterianas han llamado mucho la atención, porque se ha comprobado que su ingestión por el hombre pone de manifiesto valiosas propiedades. En particular se ha encontrado que hay cepas específicas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* capaces de establecerse en el tracto intestinal y colonizar temporalmente el intestino, reducir la adherencia de bacterias patógenas al epitelio intestinal, producir efectos inmunomoduladores y ayudar a mantener el bienestar. Estas bacterias se conocen comúnmente como probióticos.

Se han llevado a cabo extensos estudios para identificar nuevas cepas probióticas. Por ejemplo, las patentes EP 0 199 535, EP 0 768 375, WO 97/00078, EP 0 577 903 y WO 00/53200 revelan cepas específicas de lactobacilos y de bifidobacterias y sus efectos beneficiosos.

La inflamación es una reacción compleja del sistema inmune innato que implica la acumulación y activación de leucocitos y proteína plasmática en los sitios de infección, exposición a toxinas o daño celular. A pesar de que la inflamación tiene un efecto protector, que consiste en controlar las infecciones y promover la reparación de los tejidos, también puede dañarlos y causar enfermedades. Las dolencias gastrointestinales tales como la enfermedad intestinal inflamatoria (como por ejemplo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y bursitis), las alergias alimentarias y la dermatitis atópica resultante de alergias alimentarias van siempre acompañadas a distintos niveles de respuestas inflamatorias intestinales aberrantes. Como posible tratamiento de estas enfermedades crónicas se ha propuesto el alivio de dicha inflamación intestinal mediante un balance entre citocinas pro y antiinflamatorias o la inducción de citocinas reguladoras. Hay muchas citocinas de este tipo, de las cuales, por ejemplo, IFN- γ , IL1, IL8, IL12 y TNF- α se consideran proinflamatorias e IL10 y TGF- β antiinflamatorias.

Los macrófagos son células fagocíticas derivadas de monocitos, localizadas en los tejidos, que tienen un papel importante en la respuesta inmune innata. Son activados por componentes microbianos y luego ya pueden secretar por sí mismos citocinas pro y antiinflamatorias. En "Stimulation of the Secretion of Pro-Inflammatory Cytokines by Bifidobacterium Strains" [*Estimulación de la secreción de citocinas proinflamatorias por cepas de Bifidobacterium*] (Microbiol. Immunol., 46(11), 781 - 785, 2002) He y otros investigaron la capacidad que tenían diferentes cepas de bifidobacterias para afectar la producción de citocinas derivadas de macrófagos. Encontraron que las bifidobacterias de "tipo adulto" tales como *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium longum* inducían significativamente una mayor secreción de citocinas proinflamatorias que las bifidobacterias de "tipo infantil" tales como *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium infantis*. Además observaron que el *B. adolescentis*, en concreto, no estimulaba la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10. Llegaron a la conclusión de que las bifidobacterias de tipo adulto pueden tener más poder de amplificación de la respuesta inflamatoria, pero menos capacidad para disminuirla. Últimamente, los ensayos realizados para identificar cuáles eran las cepas probióticas antiinflamatorias más prometedoras han indicado que las generalizaciones hechas por He y otros parecen poco fiables, pues ahora se ha demostrado que las propiedades de una cepa específica – por ejemplo sus propiedades antiinflamatorias – no pueden predecirse con exactitud atendiendo a su clasificación taxonómica.

Resumen de la presente invención

45 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que una cepa probiótica específica de *B. longum*, el *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, tiene unas propiedades antiinflamatorias excepcionales.

En consecuencia la presente invención ofrece el uso del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en la elaboración de un medicamento o composición nutritiva terapéutica para prevenir o reducir la inflamación en un mamífero.

La presente invención es aplicable a un método para prevenir o reducir la inflamación en un paciente mamífero que lo necesite y consiste en administrarle una cantidad terapéutica de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

55 La presente invención se puede utilizar en aquellas circunstancias en las que se desee prevenir o disminuir la inflamación intestinal, independientemente del estado subyacente, el cual puede ser, por ejemplo, una reacción a un alérgeno alimentario, inflamación intestinal crónica o aguda causada por una enfermedad del tracto gastrointestinal como la enfermedad intestinal inflamatoria o colitis, inflamación postinfecciosa o inflamación subclínica en ancianos, así como en circunstancias en que es deseable prevenir la inflamación con sentido profiláctico, es decir, en ausencia de un estado subyacente que la provoque.

Una ventaja de la presente invención es que se puede usar para reducir o prevenir la inflamación en un mamífero por administración oral de una composición nutritiva terapéutica o de un medicamento que contenga el probiótico. Nótese que dicha administración oral es más aceptable y conveniente para el paciente que una composición que requiera la administración intravenosa o subcutánea, que depende de personal especialmente preparado y además no es ni segura ni conveniente.

Descripción detallada de la presente invención

En la presente exposición los siguientes términos reciben una definición que debe tenerse en cuenta al leer e interpretar la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones.

“Bebé”: niño de edad inferior a 12 meses.

“Fórmula infantil”: producto comestible previsto para la nutrición completa de los bebés durante los primeros cuatro a seis meses de vida y como complemento de otros productos comestibles hasta la edad de 12 meses.

“Probiótico”: preparaciones celulares microbianas o componentes de células microbianas cuyo efecto es beneficioso para la salud o el bienestar del huésped (Salminen S, Ouwehand A. Benno Y. y otros “Probiotics: how should they be defined” [*Probióticos: cómo deberían definirse*], Trend Food Sci. Technol. 1999:10 107-10).

El mamífero puede ser un humano o un animal de compañía, como un perro o un gato.

El *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (“BL999”) se puede administrar solo, por ejemplo incluido en cápsulas que contengan respectivamente, por ejemplo, 10^8 unidades formadoras de colonias (ufc), o incorporado en una composición nutritiva tal como una fórmula nutritiva completa (por ejemplo una fórmula infantil o un producto de nutrición clínica), un producto lácteo, una bebida en polvo, una sopa deshidratada, un suplemento dietético, un sustituto alimenticio, una barra nutritiva, un cereal, un producto de repostería o un alimento seco para mascotas. Cuando el BL999 se incorpora a una composición nutritiva, su contenido en ella puede estar comprendido en una cantidad equivalente a 10^4 - 10^{12} ufc/g (peso seco). Estas expresiones cuantitativas incluyen la posibilidad de que las bacterias estén vivas, inactivadas o muertas, o también que se encuentren en forma de ADN o como materiales de la pared celular o como metabolitos. Dicho de otra manera, las cantidades de bacterias se expresan en función de la capacidad formadora de colonias de dicha cantidad de bacterias, como si todas estuvieran vivas, sin tener en cuenta si realmente están vivas, inactivadas o muertas, fragmentadas o si son una mezcla de cualquiera de estos estados. El BL999 se halla presente preferiblemente en una cantidad equivalente comprendida entre 10^5 y 10^{10} , con mayor preferencia entre 10^7 y 10^{10} ufc/g de composición seca.

El BL999 se puede obtener de Morinaga Milk Industry Co. Ltd., de Japón, con la marca comercial BB536. Se puede cultivar según cualquier método adecuado y se puede preparar por encapsulación o por adición a una composición nutritiva mediante secado por liofilización o pulverización, por ejemplo. Como alternativa se puede adquirir preparado de forma conveniente para ser añadido a productos alimenticios.

Una fórmula nutritiva completa para usar según la presente invención puede comprender una fuente proteica, con preferencia una proteína dietética de origen animal (por ejemplo de leche, carne o huevo), de origen vegetal (por ejemplo de soja, trigo, arroz o guisante), mezclas de aminoácidos libres o combinaciones de ellas. Se prefieren especialmente las proteínas lácteas como la caseína y la proteína del suero de la leche y las proteínas de soja. La composición también puede contener una fuente de hidratos de carbono y una fuente de grasas.

Si la fórmula incluye una fuente de grasas, ésta aporta preferiblemente 5% hasta 55% de la energía de la fórmula, por ejemplo 20% hasta 50% de la energía. Los lípidos que constituyen la fuente de grasas pueden ser cualquier grasa o mezcla de grasas adecuada. Son especialmente apropiadas las grasas vegetales tales como los aceites de soja, de palma, de coco, de cártamo, de girasol, de maíz, de colza, y las lecitinas. Si se desea, también se pueden añadir grasas animales como la de la leche.

Si la fórmula incluye una fuente de hidratos de carbono, ésta aporta preferiblemente 40% hasta 80% de la energía de la fórmula. Se puede usar cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de ellos. Si se desea, también puede agregarse fibra dietética. La fibra dietética puede ser de cualquier procedencia adecuada, incluyendo, por ejemplo, soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma arábiga, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, sialil-lactosa y oligosacáridos derivados de leches de origen animal. En la fórmula nutritiva se pueden incluir vitaminas y minerales apropiados en una cantidad que cumpla las directrices correspondientes.

Si se desea pueden incorporarse a la fórmula nutritiva uno o más emulsionantes de calidad alimentaria, por ejemplo ésteres de ácido diacetil-tartárico con mono- y diglicéridos, lecitina y mono- y diglicéridos. Análogamente se pueden incluir sales y estabilizantes adecuados.

La fórmula nutritiva completa se puede preparar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, la fuente proteica, la fuente de hidratos de carbono y la fuente de grasas se pueden mezclar en proporciones apropiadas. En caso de usarlos, los emulsionantes pueden incluirse en la mezcla. Las vitaminas y minerales se pueden agregar en este momento, pero suelen añadirse más tarde para evitar la degradación térmica. Cualquier vitamina, emulsionante y análogos de tipos lipófilo pueden disolverse en la fuente de grasas antes de efectuar la mezcla. Después se puede añadir agua, preferiblemente agua tratada por ósmosis inversa, para formar una mezcla líquida.

Después la mezcla líquida se puede tratar térmicamente para reducir cargas bacterianas. Por ejemplo, la mezcla líquida se puede calentar rápidamente hasta una temperatura comprendida aproximadamente entre 80°C y 110°C durante aproximadamente 5 segundos hasta 5 minutos, lo cual puede llevarse a cabo mediante inyección de vapor o intercambio de calor, por ejemplo con un intercambiador de calor de placas.

5 Luego la mezcla líquida se puede enfriar a una temperatura comprendida aproximadamente en el intervalo de 60°C hasta 85°C, por ejemplo mediante refrigeración instantánea. Después la mezcla líquida se puede homogeneizar, por ejemplo en dos etapas, entre unos 10 MPa y 30 MPa en la primera y entre unos 2 MPa y 10 MPa en la segunda. Luego la mezcla homogeneizada se puede seguir enfriando para agregarle algunos componentes térmicamente sensibles, tal como vitaminas y minerales. Entonces se normaliza convenientemente el pH y el contenido en sólidos de la mezcla homogeneizada.

10 Después la mezcla homogeneizada se puede transferir a un aparato secador apropiado, tal como un secador por pulverización o un liofilizador, para convertirla en polvo. El polvo debe tener un contenido de humedad inferior al 5% en peso, aproximadamente. El BL999 puede añadirse al polvo en la cantidad deseada, mezclando en seco.

15 Una comida seca para mascotas según la presente invención puede llevar una o más fuentes de carbohidratos, una fuente proteica y una fuente de lípidos.

20 Se puede utilizar cualquier fuente adecuada de carbohidratos. Ésta se aporta preferiblemente en forma de grano, de harina o de almidón. Por ejemplo, la fuente de hidratos de carbono puede ser arroz, cebada, sorgo, mijo, avena, harina de maíz o harina de trigo. También se pueden usar azúcares simples tales como sacarosa, glucosa y jarabes de maíz. La cantidad de hidratos de carbono aportada por la fuente de carbohidratos puede elegirse a voluntad. Por ejemplo, la comida para mascotas puede contener hasta un 60% en peso de hidratos de carbono.

25 Pueden seleccionarse fuentes proteicas adecuadas de cualquier procedencia apropiada de tipo animal o vegetal, por ejemplo carne muscular o esquelética, harina de carne y huesos, harina de pollo, harina de pescado, proteínas lácteas, gluten de maíz, gluten de trigo, harina de soja, concentrados de proteína de soja, aislados de proteína de soja, proteínas de huevo, suero de leche, caseína, gluten y similares. Para animales viejos es preferible que la fuente proteica lleve una proteína animal de gran calidad. La cantidad de proteína aportada por la fuente proteica puede elegirse a voluntad. Por ejemplo, la comida para mascotas puede contener aproximadamente 12% hasta 70% en peso de proteína sobre una base seca.

35 La comida para mascotas puede contener una fuente de grasas. Se puede utilizar cualquier fuente adecuada de grasas. La fuente de grasas es preferiblemente de origen animal, como el sebo. También se pueden usar aceites vegetales como los de maíz, girasol, cártamo, colza, soja, oliva, y otros ricos en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Además de ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y alfa-linoleico) la fuente de grasas también puede incluir ácidos grasos de cadena larga tales como los ácidos gamma-linoleico, estearidónico, araquidónico, eicosapentanoico y docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácido eicosapentanoico y docosahexanoico. Los aceites de borraja, grosella negra y onagra son fuentes idóneas de ácido gamma-linoleico. Los aceites de colza, soja, lino y nueces son fuentes apropiadas de ácido alfa-linoleico. Los aceites de cártamo, girasol, maíz y soja son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Los aceites de oliva, colza, girasol con alto contenido de ácido oleico, cártamo, cacahuete y cáscara de arroz son fuentes adecuadas de ácidos grasos monoinsaturados. La cantidad de grasa aportada por dichas fuentes puede elegirse a voluntad. Por ejemplo, la comida para mascotas puede contener aproximadamente 5% hasta 40% en peso de grasa sobre una base seca. Es preferible que la comida para mascotas tenga un contenido de grasa relativamente bajo.

40 La selección de las fuentes de hidratos de carbono, proteínas y lípidos no es crítica y se basa en las necesidades nutricionales del animal, en consideraciones del sabor y en el tipo de producto elaborado. Asimismo, si se desea, pueden incorporarse a la comida para mascotas otros varios ingredientes, como por ejemplo azúcar, sal, especias, condimentos, vitaminas, minerales, agentes saborizantes, gomas y microorganismos probióticos.

45 Para mascotas viejas es preferible que la comida contenga proporcionalmente menos grasa que la comida para mascotas más jóvenes. Además, las fuentes de almidón pueden incluir uno o más almidones de avena, arroz, cebada, trigo y maíz.

50 La comida para mascotas puede ser producida mediante cocción por extrusión, aunque también se puede elaborar por horneado y otros procesos adecuados. Cuando se cuece por extrusión, la comida para mascotas se suministra usualmente en forma de granulado. El BL999 se aplica sobre el pienso seco o se introduce en él. En la solicitud de patente europea nº 0862863 se describe un proceso adecuado.

55 A continuación la presente invención se describe detalladamente haciendo referencia a los ejemplos siguientes. En las figuras:

60 La **figura 1** compara el porcentaje de actividad NFκB tras la estimulación de células intestinales in vitro con LPS en presencia de cuatro bifidobacterias distintas (ensayo celular con gen indicador de NFκB).

La **figura 2** compara la calificación fecal observada en un modelo de colitis murina imitativo de patologías EII (colitis inducida por DSS) con y sin intervención con BL999.

La **figura 3** compara las calificaciones de inflamación macroscópica observadas en un modelo de colitis murina imitativo de patologías EII (colitis inducida por DSS) con y sin intervención con BL999.

5 Las **figura 4A hasta E** comparan las calificaciones individuales de Wallace (A), las calificaciones medias de Wallace (B), la protección porcentual (C), la actividad mieloperoxidasa (D) y la pérdida de peso a los dos días (E) en un modelo de colitis inducida por TNBS en que dos grupos recibieron una intervención con BL999 a distintos niveles de dosificación y el grupo de control no recibió ninguna bacteria, y

10 La **figura 5** compara en el mismo modelo de colitis la capacidad protectora del BL999 con las de *B. longum* NCC2705, *L. rhammosus* ATCC 53103, *L. johnsonii* CNCM 1-1225, *L. plantarum* NCIMB8826, *L. lactis* NZ9000 y MG1363 y con el efecto protector del medicamento prednisolona.

Ejemplo 1

15 Abajo se indica un ejemplo de composición de una fórmula infantil según la presente invención, la cual se ofrece solamente a modo de ilustración.

Nutriente	por 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	670
Proteína (g)	1,83	12,3
Grasa (g)	5,3	35,7
Ácido linoleico (g)	0,79	5,3
Ácido α -linoleico (mg)	101	675
Lactosa (g)	11,2	74,7
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn (μ g)	8	50
Se (μ g)	2	13
Vitamina A (μ g de RE)	105	700
Vitamina D (μ g)	1,5	10
Vitamina E (mg de TE)	0,8	5,4
Vitamina K1 (μ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1,0
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,50
Ácido fólico (μ g)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (μ g)	0,3	2
Biotina (μ g)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (μ g)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
<i>B. longum</i> BB 536	10 ⁸ ufc/g de polvo, bacterias vivas	

Ejemplo 2

20 Este ejemplo compara la actividad inhibidora del BL999 con los efectos inhibidores de otras cepas bacterianas probióticas en un ensayo celular con gen indicador del factor nuclear kappa B (NF κ B).

25 Se ha publicado una abundante literatura sobre el importante papel que el factor de transcripción NF κ B juega en la inducción y perpetuación de sucesos inflamatorios. El NF κ B se activa en respuesta a bacterias patógenas entero-invasivas y a otros estímulos, produciendo moléculas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α), la interleucina-8 (IL-8), la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) y la ciclooxigenasa inducible (COX-2).

En este estudio se usó una línea celular de epitelio intestinal humano (HT29 NF κ B) que expresa de manera estable

un constructo de gen indicador (secreción de fosfatasa alcalina) bajo el control del promotor de NF- κ B (Blum S y otros; Riedel C. y otros, World J Gastroenterol. 2006 en imprenta). Se midió la capacidad de cuatro cepas de bifidobacterias para inhibir la actividad de NF κ B inducida por lipopolisacáridos (LPS) en estas células. Las células se incubaron con *B. bifidum* (NCC 189, CNCM I-2333), *B. infantis* (NCC 200, CNCM I-2334), *B. pseudocatenulatum* (NCC 291) y *B. longum* (NCC 3001, ATCC BAA-999) recién preparados, a una relación célula:bacterias de 1:100. Tras 1 h de preincubación de las células con las bacterias se añadieron 10 ng/ml de LPS para una incubación adicional de 4 h y se recogieron los sobrenadantes de los cultivos agotados para medir la actividad del indicador mediada por NF κ B. El ensayo se realizó por duplicado y se repitió al menos 3 veces, normalizando cada repetición respecto a la estimulación por LPS sin bacterias, con un control sin bacterias. Los datos se muestran en la figura 1 como porcentaje medio de la estimulada por LPS \pm EEM.

Se puede apreciar que las células tratadas con LPS tuvieron una inducción de la actividad de NF κ B 10 veces superior después de 4 h de incubación. Las cuatro cepas de bifidobacterias redujeron la actividad de NF κ B, pero el BL999 tuvo el mayor efecto inhibitor en este ensayo. En conclusión, la cepa BL999 es una opción excelente para aquellas aplicaciones en que la actividad antiinflamatoria es de gran valor.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la capacidad del BL999 y sus metabolitos para prevenir la inflamación en un modelo murino de EII.

En este experimento se usó un modelo de colitis murina inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) (Blumberg RS y otros, Current Opin. Immunol. 1999; 11 (6):648-56), el cual se considera como relevante para las patologías EII. La administración de DSS induce en el intestino grueso un daño histopatológico similar al observado en los pacientes de colitis ulcerosa. El tratamiento con DSS se administró para inducir inflamación intestinal aguda.

Grupos experimentales y dietas:

- “Control-MRS”: ratones alimentados con la dieta de control (tabla 1) a voluntad, con libre acceso a agua del grifo durante todo el experimento, que reciben diariamente una dosis intragástrica de MRS desde el día 1 hasta el 14.
- “DSS-MRS”: ratones alimentados con la dieta de control a voluntad durante todo el experimento, con libre acceso a agua del grifo con 1% de DSS desde el día 7 hasta el 14, que reciben diariamente una dosis intragástrica de MRS desde el día 1 hasta el 14.
- “DSS-BL”: ratones alimentados con la dieta de control durante todo el experimento, desde el día 1 hasta el 14, con libre acceso a agua del grifo con 1% de DSS desde el día 7 hasta el 14, que reciben diariamente una dosis intragástrica de BL999 (NCC3001) (10^9 ufc/ratón/día) desde el día 1 hasta el 14.

Tabla 1: dieta de control

Componentes	Porcentaje en la dieta (% en peso)
Almidón resistente (Cerestar SF 12018)	40,0
Caseína soluble	20,0
Sacarosa	27,3
DL-metionina	0,3
Aceite de maíz	5,0
Celulosa	2,0
Premezcla mineral AIN 93	4,4
Premezcla vitamínica AIN 93	1,0

El experimento animal se llevó a cabo de la manera siguiente. Se reunieron aleatoriamente ratones macho BALBc/J (8 semanas, Janvier, Francia) en 4 grupos de ensayo (n=10 ratones por grupo). Durante un periodo de aclimatación de 7 días los ratones tuvieron libre acceso a agua del grifo y recibieron la dieta de control. Luego los ratones del grupo DSS-BL recibieron diariamente, durante 14 días, una dosis intragástrica de BL999 (10^9 ufc/ratón/día) con el sobrenadante del cultivo, mientras que los ratones de los otros dos grupos recibieron diariamente una dosis de MRS intragástrica. Además, del día 7 al 14, los ratones de los grupos DSS-MRS y DSS-BL recibieron 1% de DSS en su agua de beber, mientras que el grupo de control recibió agua del grifo normal.

Durante el experimento se examinaron cada dos días muestras fecales de cada ratón y se registró su consistencia y presencia o ausencia de sangre (Hemocult II, SKD, Roissy, Francia). Se calculó una calificación fecal tal como se indica en la tabla 2 y los resultados se muestran en la figura 2.

Tabla 2. Escala para calificar síntomas clínicos de ratones

Calificaciones de intensidad	Observaciones
Calificación de las deposiciones	
0	Normales, duras
1	Blandas, bien formadas, pegajosas
2	No formadas
3	Líquidas, diarreas

Al final del periodo de 14 días se sacrificaron los ratones por dislocación cervical. Los segmentos cólico-cecales del animal se extrajeron rápidamente, se lavaron suavemente con tampón salino fisiológico y sus signos macroscópicos de inflamación se calificaron según la escala previamente publicada por (Appleyard C.B y Wallace J.L. "Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs" [*Reactivación de la colitis inducida por haptenos y su prevención con fármacos antiinflamatorios*], Am J. Physiol 269, G119 - 125) (tabla 3). Los resultados se muestran en la figura 3.

Tabla 3. Criterios de calificación macroscópica del daño ceco-colónico (Appleyard y Wallace)

	Calificación	Aspecto
Espesamiento	0	Mucosa nominal
	1	Espesamiento moderado
	2	Espesamiento intenso
Ulceraciones	0	Ninguna
	1	Enrojecimientos
	2	Ulceraciones ligeras
	3	Ulceraciones fuertes
Contenido cólico-cecal	0	Sin sangre
	1	Ligeramente sangriento
	2	Sangriento

En las figuras 2 y 3 puede verse que el BL999 normaliza efectivamente las características de las deposiciones y reduce significativamente la inflamación en el ciego y en el colon proximal y distal en comparación con la observada en el grupo DSS-MRS. Por tanto puede verse que el BL999 fue efectivo para prevenir la inflamación inducida por DSS cuando los ratones del grupo DSS-BL recibieron bacterias tanto antes como durante la administración de DSS.

Ejemplo 4

En este ejemplo se investigó el poder antiinflamatorio de las bacterias BL999 y se comparó con el de otras cepas de bacterias ácido-lácticas, así como con prednisolona, un fármaco antiinflamatorio comúnmente usado, empleando un modelo de colitis murina aguda inducida por TNBS.

Se investigaron las siguientes cepas bacterianas:

Nº NCC	Cepa	Nº oficial de depósito
NCC 3001	<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC BAA-999
NCC 2705	<i>Bifidobacterium longum</i>	CNCM I-2618
NCC 3003	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103
NCC 533	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	CNCM I-1225
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCIMB8826
	<i>Lactococcus lactis</i>	NZ9000
	<i>Lactococcus lactis</i>	MG 1363

Se cultivaron aeróbicamente cepas de *Lactobacillus* a 37°C en medio MRS (Difco). Las bifidobacterias se cultivaron anaeróbicamente a 37°C en MRS suplementado con 0,05% de L-cisteína hidrocloreuro (Sigma). El *Lactococcus lactis* MG 1363 y el *Lactococcus lactis* NZ9000 se cultivaron a 30°C en medio M 17 suplementado con 0,5% de glucosa. El número de bacterias (ufc) se estimó en fase de crecimiento estacionario, midiendo la absorbancia a 600 nm (A_{600}), con la respectiva curva de calibración para cada cepa. Para los ensayos rutinarios *in vivo* las bacterias se cultivaron durante 18 h, se lavaron dos veces en PBS estéril a pH 7,2 y se resuspendieron a 10^8 y $2 \cdot 10^9$ ufc/ml en tampón de NaHCO_3 0,2 M que contenía 2% de glucosa.

Se compraron a Charles River ratones hembra BALB/C adultos de 7 a 8 semanas de edad. Los ratones se reunieron aleatoriamente en grupos experimentales de 10 ratones. Los ratones se alojaron por grupos (de 8 a 10 por jaula) y

tuvieron libre acceso a agua y a comida estándar de roedores. Pasaron al menos 1 semana de aclimatación, antes de cualquier intervención. En los grupos tratados con bacterias, los ratones recibieron por sonda intragástrica suspensiones bacterianas (correspondientes a 10^8 ufc/ratón/día) en tampón de NaHCO_3 0,2 M a pH 8,5 con 2% de glucosa, a partir del cuarto día anterior a la inducción de colitis hasta el día de la inducción. Los ratones del grupo tratado con prednisolona recibieron 10 mg/kg de peso corporal/día. Los ratones del grupo de control no recibieron ni bacterias ni prednisolona. Además se investigó el efecto del nivel de dosificación tratando un grupo con BL999 a $2 \cdot 10^9$ ufc/ratón/día.

Antes de la inducción de colitis todos los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 3 mg de cetamina (Imalgene 1000, Merial, Lion, Francia), 46,7 μg de diazepam (Valium, Roche Diagnostics, Francia) y 15 μg de atropina (Laboratorio Aguettant, Lion, Francia) disueltos en cloruro sódico al 0,9%. Luego se indujo la colitis por administración intrarrectal de 50 μl de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS, Fluka, Francia) disueltos en NaCl al 0,9%/etanol (50/50 v/v) a una dosis de 100-120 mg/kg de peso corporal. La tasa de mortalidad y las calificaciones de inflamación se evaluaron después de 48 horas de la administración de TNBS. Los ratones se pesaron antes de la administración de TNBS y al sacrificarlos por dislocación cervical.

Se extrajo el colon, se disecó exento de grasa y de mesenterio, se abrió cuidadosamente y se limpió con PBS. El daño y la inflamación del colon se evaluaron según los criterios de Wallace (Wallace J.L. y otros, Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease" [*La inhibición de la síntesis de leucotrienos acelera considerablemente la curación en un modelo murino de enfermedad inflamatoria intestinal*] Gastroenterology 96:29 - 36, 1989). Estos criterios de calificación macroscópica han sido bien implantados en estudios con ratones y reflejan la intensidad de la inflamación, el espesamiento de la mucosa del colon y el alcance de la ulceración. El daño y la inflamación del colon fueron calificados a ciegas por dos investigadores.

Además se determinó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), un marcador de gránulos primarios de neutrófilos polimorfonucleares, siguiendo un método modificado de Bradley y otros ("Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker" [*Medición de inflamación cutánea: estimación del contenido de neutrófilos con un marcador enzimático*], J Invest Dermatol. 60(3):618-22). La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y la actividad de la MPO se expresó como U MPO/cm de intestino.

La actividad de la MPO se determinó en el tejido del colon proximal, inmediatamente después del sacrificio. Se tomó una muestra de colon (de 1 cm de largo) a 3 cm de la unión ceco-colónica, se suspendió en tampón de fosfato potásico (50 mmoles/l, pH 6,0) y se homogeneizó en hielo con un polytron. Se realizaron tres ciclos de congelación y deshielo y las suspensiones se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min. a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y los sedimentos se resuspendieron en el tampón detergente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB 0,5%, p/v, en tampón de fosfato potásico, 50 mmoles/l, pH 6,0), induciendo la liberación de MPO de los gránulos primarios de neutrófilos polimorfonucleares. Las suspensiones obtenidas se sonicaron sobre hielo y se centrifugaron de nuevo durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se diluyeron en tampón de fosfato potásico (pH 6,0) que contenía 0,167 mg/ml de O-dianisidina dihidrocloruro y 0,0005% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Como patrón se usó MPO de neutrófilos humanos (0,1 U/100 ml, Sigma). Se registraron los cambios de absorbancia a 450 nm, después de 5 y 10 minutos, con un espectrofotómetro de microplacas (ELX808, Bio-Tek Instrument, CA). Se definió una unidad de actividad de MPO como la cantidad de MPO que degrada 1 mmol de peróxido de hidrógeno/min/ml a 25°C.

Los resultados se analizaron por análisis de varianza unidireccional no paramétrica, la prueba de Mann-Whitney U. Las diferencias se consideraron significativamente estadísticas cuando el valor p fue $< 0,05$.

Los resultados se muestran en las figuras 4A hasta E y en la figura 5. Las figuras 4A y B comparan las calificaciones individuales de Wallace y las calificaciones medias de Wallace de ratones tratados con BL999 a los dos niveles de dosificación, 10^8 ufc/ratón/día y $2 \cdot 10^9$ ufc/ratón/día, con el grupo de control que no recibió bacterias. Puede verse que los ratones de los dos grupos que recibieron BL999 obtuvieron calificaciones de Wallace sustancialmente menores que los ratones del grupo de control.

La figura 4C muestra el porcentaje de protección ofrecida por el BL999, la cual corresponde a la reducción de la inflamación macroscópica media en los ratones tratados con bacterias (n=10), respecto a la calificación media de los ratones de control tratados con TNBS (ratones tratados con tampón de NaOHCO_3 , n=10).

La figura 4D compara la actividad media de MPO en los ratones tratados con los dos niveles de dosificación de BL999 con el grupo de control. Puede verse que la actividad de MPO en los ratones de ambos grupos que recibieron BL999 fue sustancialmente menor que en el grupo de control.

La figura 4E compara la pérdida de peso a los 2 días de los ratones tratados con los dos niveles de dosificación de BL999 con el grupo de control. Puede verse que los ratones de ambos grupos que recibieron BL999 tuvieron una pérdida de peso sustancialmente menor que los ratones del grupo de control.

La figura 5 compara el porcentaje de protección ofrecida por las distintas cepas de bacterias ácido-lácticas probadas y por la administración de prednisolona. Se puede ver que el BL999 ofrece un grado de protección notablemente

superior al de las otras cepas bacterianas ensayadas y un nivel de protección comparable al del medicamento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en la elaboración de un medicamento o de una composición nutritiva terapéutica para prevenir o reducir la inflamación en un mamífero.
2. El uso de la reivindicación 1, en que la composición nutritiva terapéutica es una fórmula infantil.
3. El uso de la reivindicación 1, en que la composición nutritiva terapéutica es una comida para mascotas.
- 10 4. El uso de alguna de las reivindicaciones precedentes, en que la inflamación es intestinal.
5. El uso de alguna de las reivindicaciones precedentes, en que la composición nutritiva terapéutica contiene 10^4 hasta 10^{12} ufc/g de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 sobre peso seco de una base.
- 15 6. El uso de alguna de las reivindicaciones precedentes, en que la composición nutritiva terapéutica contiene 10^5 hasta 10^{10} ufc/g de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 sobre peso seco de una base.
- 20 7. El uso de alguna de las reivindicaciones precedentes, en que la composición nutritiva terapéutica contiene 10^7 hasta 10^{10} ufc/g de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 sobre peso seco de una base.
8. Uso del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en la elaboración de un medicamento o de una composición nutritiva terapéutica para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal.
- 25 9. Uso del *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 en la elaboración de un medicamento o de una composición nutritiva terapéutica para tratar la inflamación intestinal relacionada con alergias alimentarias.

Fig 1.

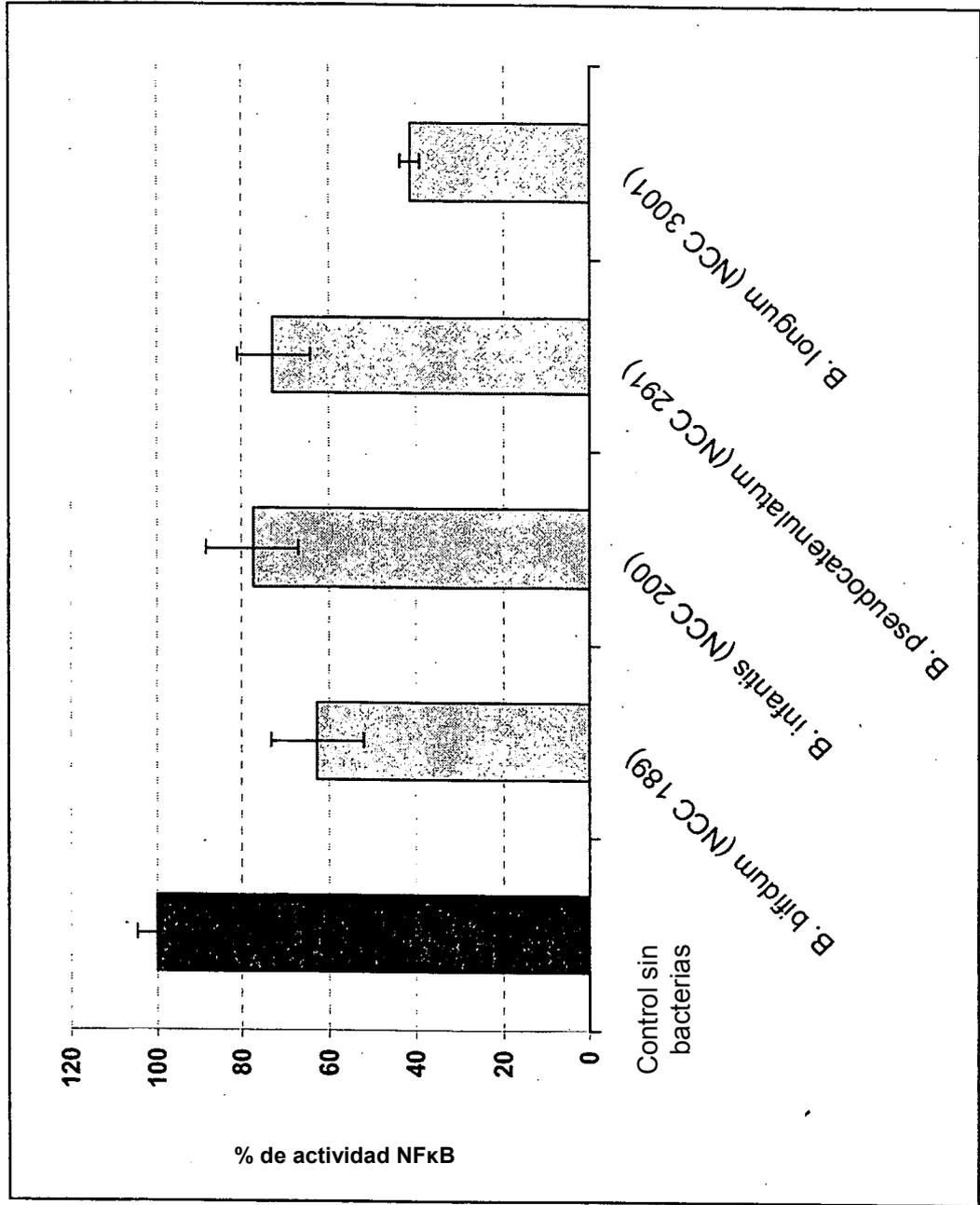


Fig 2.

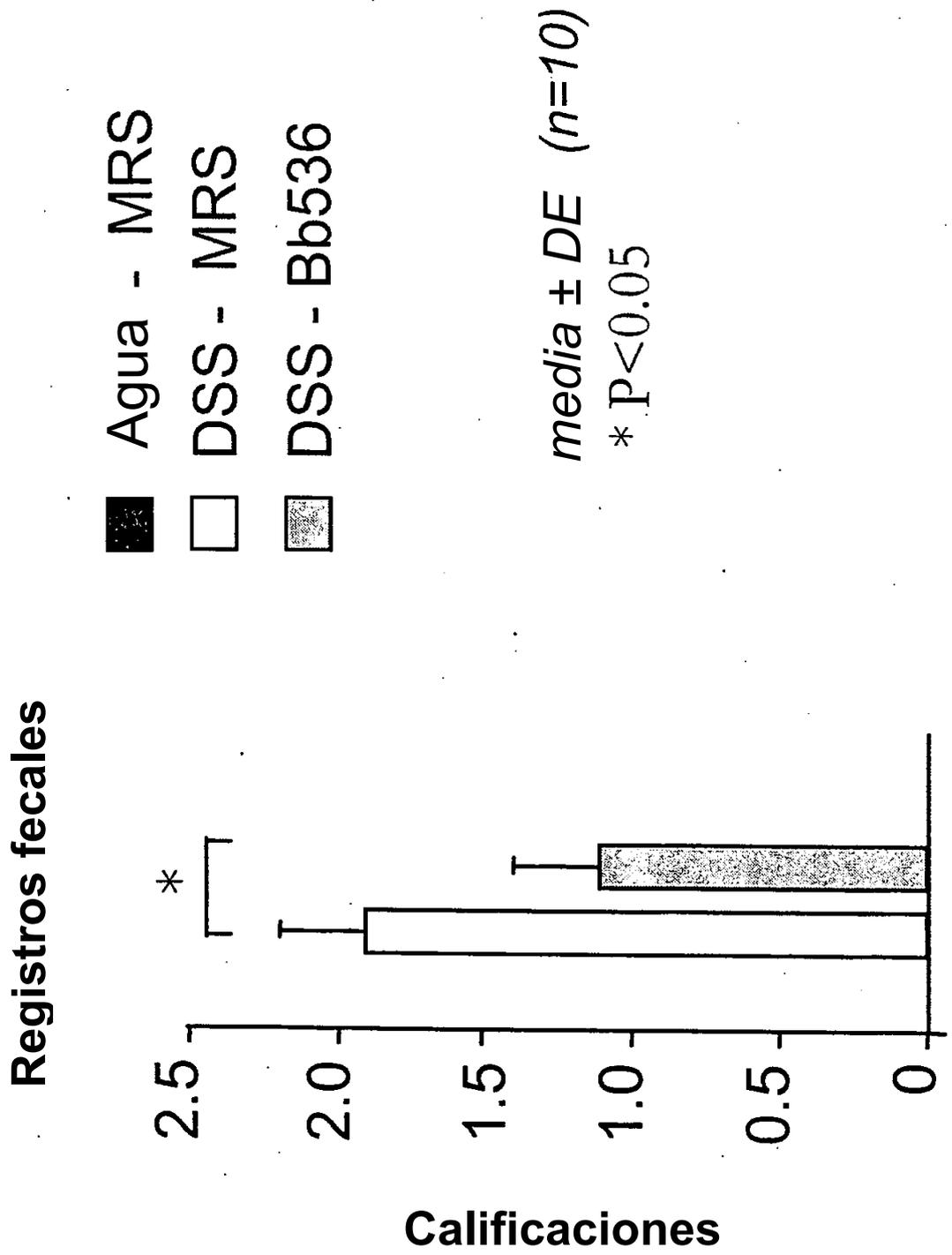
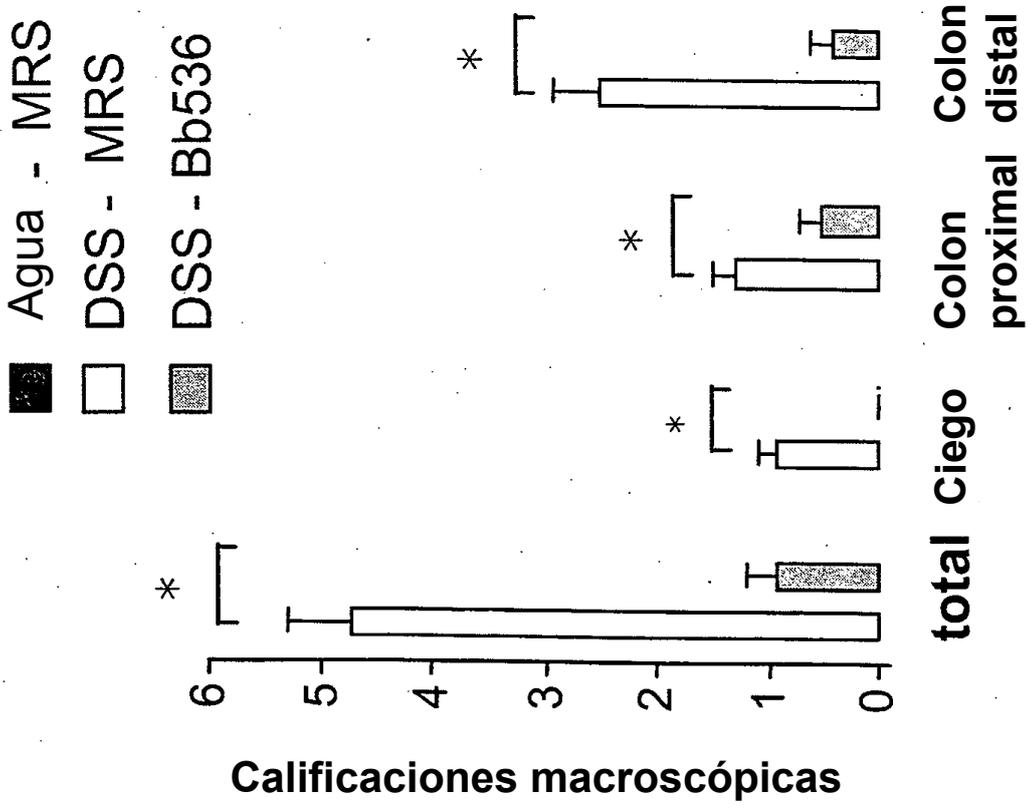


Fig 3.



media ± DE (n=10), * P<0.05

Fig 4A. Calificación de Wallace individual

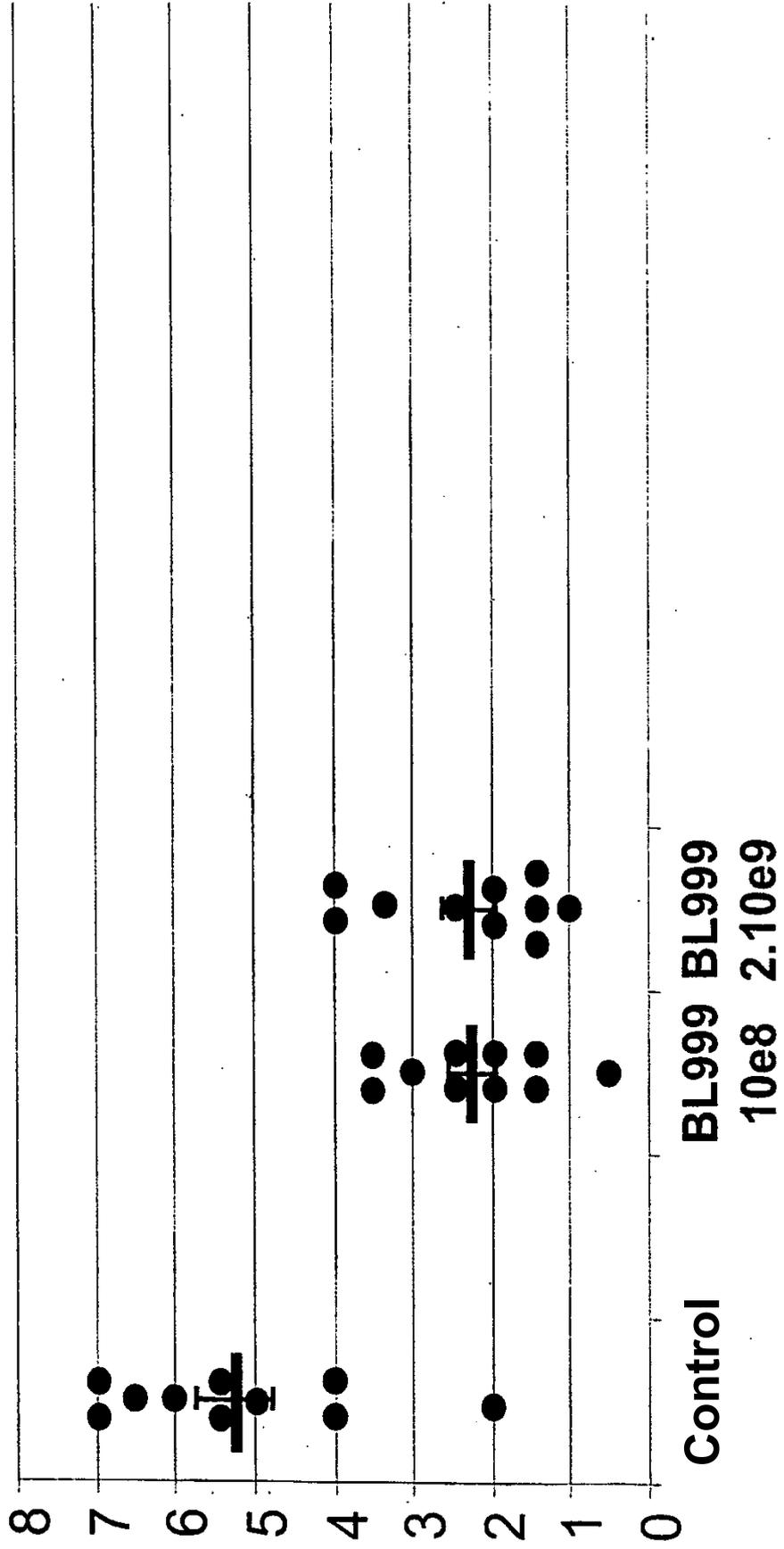
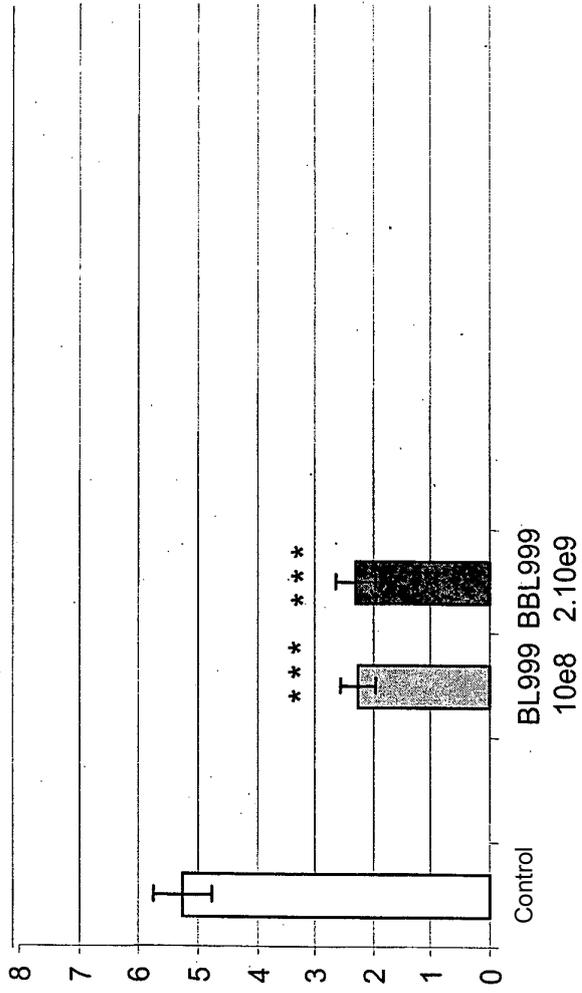


Fig 4B. Calificación media de Wallace



Prueba de Mann & Whitney

- ns ino significativo
- (*) $0.05 < p < 0.1$
- * $p < 0.05$
- ** $p < 0.01$
- *** $p < 0.001$

Fig 4C. % de protección

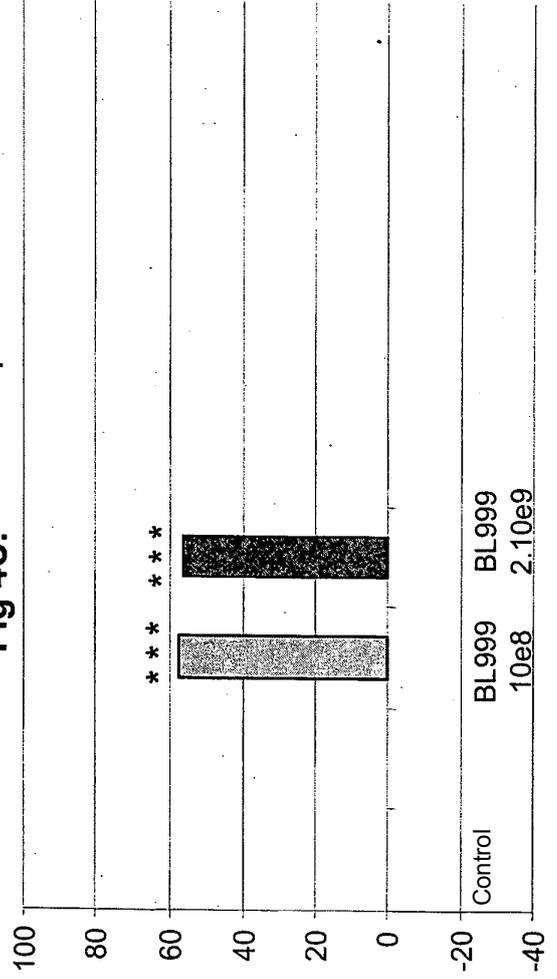
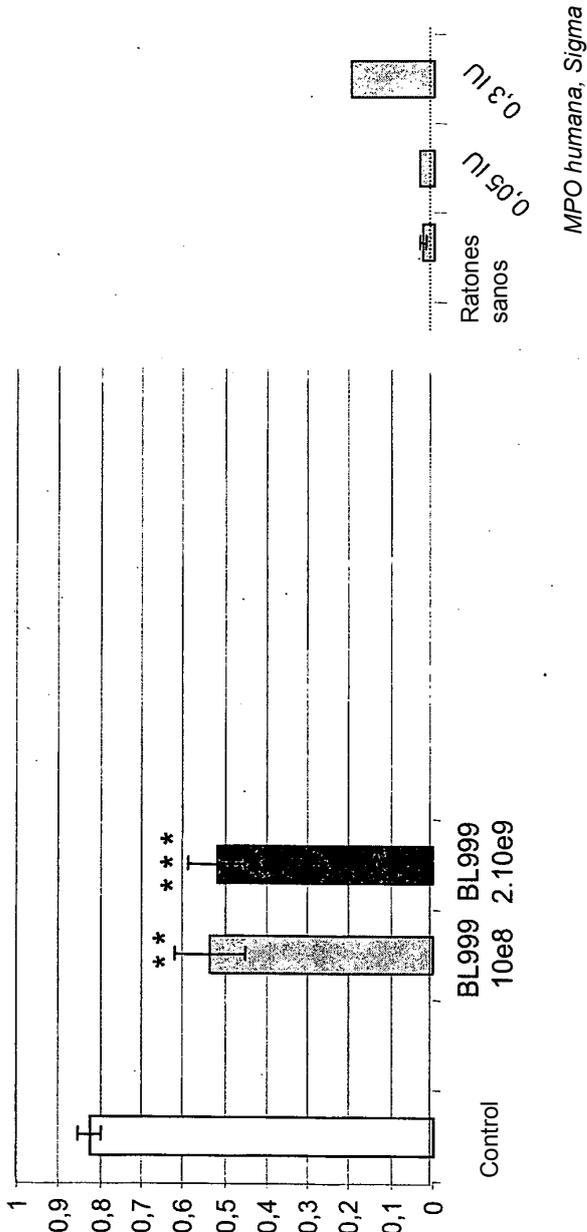


Fig 4D. MPO media (unidades arbitrarias)



Prueba de Mann & Whitney

- ns no significativo
- (*) $0.05 < p < 0.1$
- * $p < 0.05$
- ** $p < 0.01$
- *** $p < 0.001$

Fig 4E. Pérdida de peso a los 2 días

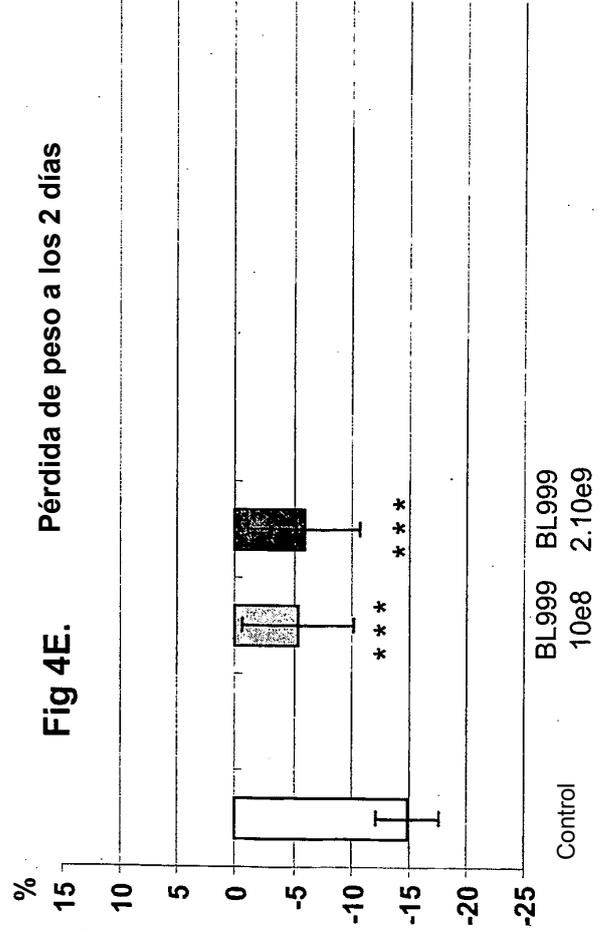


Fig 5. % de protección contra la colitis inducida por TNBS
(expresado como la media de 2-3 ensayos)

