

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 620**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009** **E 09805954 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013** **EP 2496241**

54 Título: **Método para reducir la inflamación gastro-intestinal usando la bacteria Bifidobacterium animalis o un producto lácteo fermentado que comprende dicha bacteria**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.01.2014

73 Titular/es:

COMPAGNIE GERVAIS DANONE (50.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR y
THE PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (50.0%)

72 Inventor/es:

VEIGA, PATRICK;
CHAMBAUD, ISABELLE;
KHLEBNIKOV, ARTEM;
GLIMCHER, LAURIE H. y
GARRETT, WENDY S.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 436 620 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

Método para reducir la inflamación gastro-intestinal usando la bacteria *Bifidobacterium animalis* o un producto lácteo fermentado que comprende dicha bacteria

Introducción

5 La presente invención se refiere a un método para la prevención, tratamiento y reducción de la inflamación gastrointestinal en un sujeto mediante la administración de una cepa de *Bifidobacterium* específica, concretamente un producto lácteo fermentado que comprende la cepa de *Bifidobacterium* específica mencionada, para la prevención, tratamiento y reducción de la inflamación gastrointestinal, en particular para la prevención y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis ulcerosa (CU) y/o enfermedad de Crohn (EC) .

10 Antecedentes

El lumen gastrointestinal se encuentra masivamente colonizado por bacterias y para la mayoría de los metazoos esta relación es mutuamente beneficiosa. La barrera de células epiteliales es esencial para la simbiosis de los huéspedes procariontes y eucariotas, ya que crea una frontera necesaria para la coexistencia mediante la prevención de la inflamación de la mucosa en respuesta a estímulos lumbales bacterianos y otros. No obstante, este balance está alterado en algunos individuos, lo que da lugar a una inflamación gastrointestinal persistente (EII), que se manifiesta como dos enfermedades principales, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), y podría además contribuir al Síndrome del colon irritable (SCI).

Garret et al. (Colitis ulcerosa comunicable inducida por deficiencia de T-bet en el sistema inmune innato. *Cell* 131, 34-45 (2007)) ha desarrollado un robusto modelo de ratón de colitis ulcerosa cuyas características fisiopatológicas y respuesta al tratamiento con anti-TNF se asemeja a la enfermedad humana. Se encontró que la deficiencia de un gen regulador particular en el sistema inmune innato (resultante a partir de una doble eliminación de los genes T-bet y RAG2; llamado TRUC por "T-betRAG2 colitis ulcerosa") dio lugar a una colitis ulcerosa agresiva, espontánea y comunicable y a una aumentada susceptibilidad a la colitis en huéspedes inmunológicamente intactos. Se mapeó la patogénesis de la enfermedad como una producción excesiva de la citoquina proinflamatoria TNF- α en las células dendríticas del colon. El sistema inmune de la mucosa manifestó una respuesta hiperactiva mediante la sobreproducción de TNF- α en las células dendríticas del colon, una citoquina que es citotóxica para las células epiteliales gastrointestinales. La subsiguiente ruptura de la barrera epitelial del colon conduce a un cambio de la población bacteriana comensal hacia una flora colitogénica. Esta flora colitogénica podría entonces transmitirse tanto vertical como horizontalmente a huéspedes genéticamente intactos.

30 US 2009/0238796 da a conocer el tratamiento de la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y los desórdenes intestinales inflamatorios no infecciosos mediante preparaciones comerciales que contienen bifidobacterias y ácido 5-aminosalicílico. US 2009/0110633 da a conocer el tratamiento de la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn con preparaciones comerciales que contienen *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus* y fibra adicional.

35 Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, usando el modelo robusto de ratón que se describe arriba, se encontró que la inflamación gastrointestinal en un paciente se podría disminuir mediante la administración de un producto lácteo fermentado que comprende la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN 173 010, más concretamente la preparación probiótica fermentada disponible comercialmente (ex Danone S.A.) llamada Activia ®, que comprende dicha *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN 173 010.

La invención se refiere a la reducción de la inflamación gastrointestinal en un sujeto que lo necesite mediante la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* cepa DN-173 010. La cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010 se ha depositado bajo el número 1-2494 en la CNCM el 20 de Junio del 2000. Esta cepa se conoce con el código DN-173 010 y está protegida, por su uso como un modulador de glicosilación de la superficie de la célula gastrointestinal, por la patente europea EP 1 297 176.

Bifidobacterium animalis es una bacteria anaerobia Gram-positiva en forma de vara, que se puede encontrar en el intestino grueso de la mayoría de los mamíferos, incluido el hombre. *Bifidobacterium animalis* y se describieron anteriormente como dos especies distintas. En la actualidad, ambas se consideran *Bifidobacterium animalis* con las subespecies *animalis* y *lactis*, respectivamente. Ambos nombres antiguos, *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium lactis*, se usan todavía en las etiquetas de productos, ya que estas especies se usan frecuentemente como un probiótico. En el contexto de esta invención, los nombres de *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* pueden utilizarse indistintamente.

55 La invención también se refiere a la reducción de la inflamación gastrointestinal en un sujeto que lo necesite mediante la administración a dicho sujeto de una cantidad efectiva de un producto lácteo fermentado que comprende dicha cepa específica *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010.

Según una realización específica, dicho producto lácteo fermentado comprende además dos iniciadores clásicos de yogur, la bacteria del ácido láctico *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus*. Aunque el término Activia® es una marca propietaria de Danone S.A., el término se utilizará en esta solicitud para indicar el producto lácteo fermentado que comprende la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010 junto con la cepa de *S. thermophilus* y la cepa *L. bulgaricus*.

Según una de las realizaciones, la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494, o el producto fermentado según la invención es para ser administrado durante al menos 14 días, más preferiblemente durante al menos 28 días.

Según una de las realizaciones, la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494, o el producto fermentado según la invención es para ser administrado en una cantidad de al menos 10^3 ufc por ingesta, preferiblemente entre 10^3 y 10^{12} ufc por ingesta, más preferiblemente entre 10^6 y 10^{11} por ingesta, muy preferiblemente alrededor de 10^{10} ufc por ingesta.

Según una de las realizaciones, la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494, o el producto fermentado según la invención es para ser administrado en una cantidad de al menos 10^3 ufc por ingesta, preferiblemente entre 10^3 y 10^{11} ufc por ingesta, más preferiblemente entre 10^6 y 10^{12} por ingesta, muy preferiblemente alrededor de 10^{10} ufc por ingesta, dos veces al día durante al menos 14 días, preferiblemente durante al menos 21 días, más preferiblemente durante al menos 28 días.

Según una de las realizaciones, la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494 es para ser administrada como una composición farmacéutica, combinada además con un soporte farmacéutico aceptable, que puede comprender excipientes.

Según una de las realizaciones, la composición farmacéutica también comprende al menos otro agente activo contra la EII.

El término "composición farmacéutica" se pretende que signifique "fármaco" o "OTC (producto de venta sin receta)". Según otra realización, el producto lácteo fermentado que comprende la citada bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494 es para ser administrada como un yogur.

La invención se refiere a un método para la prevención, tratamiento y reducción de la inflamación gastrointestinal en un sujeto mediante la administración de la citada cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494, concretamente un producto lácteo fermentado que comprende la citada cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494 para la prevención, tratamiento y reducción de la inflamación gastrointestinal, en particular para la prevención y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), colitis ulcerosa (CU) y/o enfermedad de Crohn (EC).

Según una de las realizaciones, la reducción de la inflamación gastrointestinal se define como una disminución de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el colon. Por lo tanto, la invención se refiere a un método para la reducción de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el colon, que comprende la etapa de administrar al citado sujeto una cantidad efectiva de cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494, o de una cantidad efectiva de producto lácteo fermentado que comprende la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN 173 010, depositada bajo el número CNCM 1-2494, en particular el producto Activia®.

El término "administración" se pretende que signifique "administración oral", es decir que el sujeto ingerirá por vía oral una bacteria según la presente invención, o una composición que comprende la bacteria según la presente invención, o se pretende que signifique "administración directa", es decir, que se administrará directamente in situ una bacteria según la presente invención o una composición que comprende la bacteria según la presente invención, concretamente por colonoscopia, o por vía rectal con supositorios.

La administración oral de la composición que contiene la bacteria según la presente invención puede ser en forma de cápsulas de gelatina, cápsulas, pastillas, en polvo, granulados o soluciones orales o suspensiones.

En una realización preferida de la invención, dicha composición es una composición alimenticia la cual se puede usar en la producción de nuevos alimentos o ingredientes alimenticios como se define en el reglamento CE N°. 258/97, y particularmente en la fabricación de alimentos funcionales. Un alimento puede ser considerado funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones diana en el organismo, más allá de sus efectos nutricionales usuales, mejorando el estado de salud y de bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad.

En una realización preferida de la invención, dicha bacteria es para ser administrada en forma de producto lácteo. En particular, el producto lácteo es un producto lácteo fermentado y más concretamente el producto lácteo fermentado es un yogur.

Dicha composición puede constituir, en concreto, un envasado probiótico, por ejemplo, en forma de cápsula

o de cápsula de gelatina.

El término “probióticos” se pretende que signifique suplementos dietéticos que contienen potencialmente bacterias o levaduras beneficiosas. De acuerdo con la definición adoptada en la actualidad por la FAO/WHO, los probióticos son: “Microorganismos vivos los cuales, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud en el huésped”. Las bacterias del ácido láctico son el tipo más común de microbios utilizado. Las bacterias del ácido láctico se han usado en la industria alimentaria durante muchos años, porque son capaces de convertir los azúcares (incluyendo la lactosa) y otros carbohidratos en ácido láctico. Esto no sólo proporciona el sabor ácido característico de los alimentos lácteos fermentados como el yogur, sino que también, mediante la reducción del pH, puede crear menores oportunidades de crecer para los organismos de descomposición, creando por lo tanto enormes beneficios para la salud en la prevención de infecciones gastrointestinales. Las cepas del género de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las bacterias probióticas más ampliamente utilizadas.

Los cultivos de bacterias probióticas tienen por objeto ayudar a la flora intestinal de origen natural del cuerpo a reestablecerse. A veces son recomendadas por los médicos, y, más frecuentemente por nutricionistas, después de un proceso con antibióticos, o como una parte del tratamiento de la candidiasis intestinal relacionada. Se reivindica que los probióticos fortalecen el sistema inmunológico para combatir las alergias y otras enfermedades inmunológicas.

De acuerdo con una realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un niño humano, un humano adulto o un anciano humano, más preferiblemente un humano adulto.

Preferiblemente, el método según la invención es para tratar sujetos diagnosticados según el criterio ROME III. Más preferiblemente, el método según la invención es para reducir la inflamación gastrointestinal de pacientes diagnosticados que sufren SCI predominantemente con diarrea (SCI-D), de acuerdo con el criterio ROME III.

El ROME es un proceso desarrollado para clasificar los desórdenes gastrointestinales funcionales basado en síntomas clínicos. El término “criterio ROME III* “ se pretende que signifique criterio para el síndrome del colon irritable como sigue: Dolor o malestar abdominal recurrente** al menos 3 días al mes en los últimos 3 meses asociado con 2 o más de los siguientes:

1. Mejoría con la deposición
2. Aparición asociada a un cambio en la frecuencia de las deposiciones
3. Aparición asociada a un cambio en la forma (aparición) de las deposiciones.

* Cumple los criterios para los tres últimos meses con aparición de síntomas al menos 6 meses antes del diagnóstico.

** “Malestar” quiere decir una sensación incómoda no descrita como dolor.

Otros síntomas que no son esenciales pero apoyan el diagnóstico de SCI:

- Frecuencia anormal de las deposiciones (mayor que tres movimientos intestinales/día o menos que 3 movimientos intestinales/semana)
- Forma anormal de la deposición (deposición grumosa/dura o blanda/acuosa)
- Paso anormal de las heces (con esfuerzo, urgencia, o sensación de evacuación incompleta);
- Paso de moco;
- Hinchazón o sensación de distensión abdominal.

Algunas o todos los síntomas de SCI pueden ocurrir al mismo tiempo-algunos síntomas pueden ser más acusados que otros.

Todos los criterios que se requieren para ser diagnosticada como SCI-D están descritos por el criterio ROME III (Longstreth et al., 2006).

La invención ahora se aclarará adicionalmente mediante varios ejemplos sin ser limitada por ello.

Se entiende que las reivindicaciones del método pueden formularse alternativamente como una reivindicación de un segundo uso médico (Composición para usar), en particular en aquellas jurisdicciones donde las reivindicaciones del método no se permiten para la concesión de una patente; por lo tanto, dichas reivindicaciones implícitamente se dan a conocer aquí.

Descripción de las figuras

- Figura 1** Efecto de 4 semanas de consumo de los productos Activia y placebo sobre el grado de colitis en ratones TRUC y comparación con un grupo control (RAG2-/-)
- Figura 2** Efecto de 4 semanas de consumo de Activia, producto placebo y agua sobre el grado de colitis en ratones TRUC
- Figura 3** Efecto de 4 semanas de administración de cultivos vivos de *B. Lactis* a diferentes edades (4, 8 y 12 semanas) y comparado con la administración de medio de cultivo solo (MRS)
- Figura 4** Efecto de 4 semanas de consumo de los productos Activia y placebo en la citoquina proinflamatoria TNF- α en el colon.

Ejemplos

Ejemplo 1: El consumo de Activia® mejora la colitis de TRUC (Figura 1)

Productos

El producto de ensayo era un producto lácteo fermentado (Activia®, Danone Research, Palaiseau), que comprendía la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173 010 ($1,25 \times 10^{10}$ unidades formadoras de colonias (ufc) por tarro) junto con las dos cepas iniciadoras clásicas de yogur, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* ($1,2 \times 10$ ufc/tarro). El producto de ensayo no tenía sabor.

El control es un producto lácteo no-fermentado a base de leche sin probióticos y con bajo contenido de lactosa <4 g/tarro como en el producto de ensayo (leche acidificada).

Intervención del producto

Los ratones TRUC (n=20) se alimentaron a las cuatro semanas de edad con el producto de ensayo (n=10) o con el producto control (leche acidificada no-fermentada) (n=10) diariamente durante un periodo de 4 semanas.

Análisis microbiano

Se recogieron las heces de los ratones TRUC antes y después del suplemento (4 y 8 semanas de edad, respectivamente) así como de 10 ratones control (RAG2-/-). Se extrajo DNA y RNA fecal y se llevó a cabo qPCR para cuantificar los diferentes grupos taxonómicos bacterianos.

Grado histológico de colitis

Se evaluó la inflamación colónica mediante análisis histológico al final del suplemento (8 semanas de edad) por un patólogo ciego al genotipo y a la intervención del tratamiento.

Resultados

Se pudo comprobar que Activia® mejora la colitis de TRUC.

Ejemplo 2: Los productos no bacterianos de Activia® mejoran la colitis de TRUC (Figura 2)

Experimental: véase más arriba-Medida de resultado: Grado histológico de colitis.

Ejemplo 2: *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* 173 010B mejora la colitis de TRUC (Figura 3)

Experimental

Experimental: Se hizo crecer durante toda la noche la *Bifidobacterium animalis lactis* 173 010 en medio MRS y a una población bacteriana de $4-5 \times 10^8$ ufc se recogieron de este cultivo y se administraron después a ratones BALB/c TRUC con edades de 4 (n=10), 8 (n=15), o 12 (n=15) semanas durante 4 semanas. Como control, se administró el mismo volumen de medio MRS solo de la misma manera que el cultivo vivo.

Grado histológico de colitis

Se ensayó la inflamación colónica mediante análisis histológico al final del suplemento por un patólogo ciego al genotipo y a la intervención del tratamiento.

Resultados

La cepa probiótica de Activia® *B. animalis lactis* DN-173010 tiene un efecto sobre la severidad de la colitis TRUC aunque no en la misma medida que Activia®. El efecto de la cepa 173 010B es visible a lo largo del curso de la enfermedad TRUC, ya sea en puntos tempranos o tardíos. Estos resultados sugieren que el efecto de Activia® en la

colitis TRUC no puede ser reducido al efecto de la cepa 173 010B sola. Otros/as componentes /características de este producto lácteo también tienen un efecto sobre la colitis TRUC.

Ejemplo 4: El consumo de Activia® reduce la inflamación en los ratones TRUC; Activia® reduce la producción excesiva de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el colon (Figura 4).

5 *Experimental:* véase más arriba-Medida de resultado: Nivel de TNF- α colónico (pg/ml)

Conclusiones

10 La microbiota intestinal es esencial para la generación de la colitis ulcerosa (CU) la cual ocurre espontáneamente en ratones deficientes en T-bet RAG2 (TRUC) (Garret et al.). En este modelo de inflamación intestinal, la modulación microbiana en respuesta al tratamiento antibiótico conduce a una mejora del grado de la CU. Esto plantea la posibilidad de que otros medios de manipulación de la microbiota intestinal, en concreto intervenciones alimentarias, también pueden tener un impacto sobre la inflamación en este modelo. El objetivo de este estudio es el de determinar la estructura microbiana de la microbiota intestinal de los ratones TRUC y probar el efecto de alimentos que contienen bacterias vivas sobre la inflamación gastrointestinal crónica.

15 Se ensayaron los efectos de la intervención nutricional mediante i) histología del colon, e ii) análisis cuantitativo de la microbiota intestinal.

20 El mapeo de la microbiota intestinal mediante análisis de qPCR a tiempo real de muestras de materia fecal de ratones TRUC y RAG2-/- (control) reveló diferencias significativas en las poblaciones bacterianas, incluyendo una reducción drástica de la bifidobacteria en TRUC. Para probar si la leche fermentada que contiene bifidobacteria podría mejorar la colitis en este modelo, los ratones TRUC consumieron o bien leche fermentada que contenía *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173010B o bien un producto control (leche acidificada no-fermentada) durante un periodo de 4 semanas. Curiosamente, el consumo de este producto mostró un descenso significativo de la inflamación intestinal como se demostró mediante histología y de hecho coincidió con las alteraciones de la microbiota intestinal. Estos resultados muestran que el consumo de leche fermentada conteniendo *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173010 es capaz de disminuir la CU, posiblemente por efecto inmune directo o por crear
25 unas condiciones desfavorables para supuestas bacterias patógenas que podrían estar implicadas en la progresión de la enfermedad en este modelo animal.

REIVINDICACIONES

1. La cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173010, depositada bajo el número CNCM I-2494 para su uso en la reducción de la inflamación gastrointestinal.
- 5 2. El producto lácteo fermentado que comprende la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173010, depositada bajo el número CNCM I-2494 para su uso en la reducción de la inflamación gastrointestinal.
3. El producto lácteo fermentado para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho producto comprende además la bacteria del ácido láctico *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.
- 10 4. La cepa o el producto lácteo fermentado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173010, depositada bajo el número CNCM I-2494 es para ser administrada durante al menos 14 días.
5. La cepa o el producto lácteo fermentado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que alrededor de 10^3 y 10^{12} ufc de dicha cepa es para ser administrada a un sujeto por ingesta.
6. La cepa o el producto lácteo fermentado para su uso según la reivindicación 5, en el que alrededor de 10^3 y 10^{12} ufc de dicha cepa es para ser administrada a un sujeto dos veces al día durante al menos 28 días.
- 15 7. La cepa o el producto lácteo fermentado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha cepa es para ser administrada en forma de composición farmacéutica.
8. La cepa o el producto lácteo fermentado para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que el producto lácteo fermentado es un yogur.
- 20 9. La cepa *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DN-173010, depositada bajo el número CNCM I-2494, para su uso en la prevención y el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la colitis ulcerosa (CU) y/o la enfermedad de Crohn (EC).

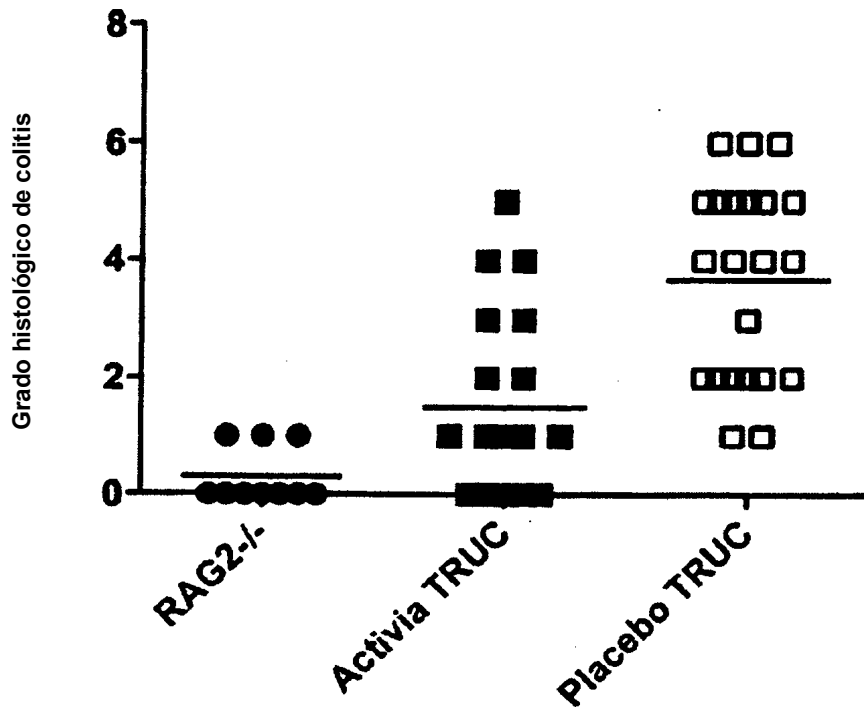


Figura 1

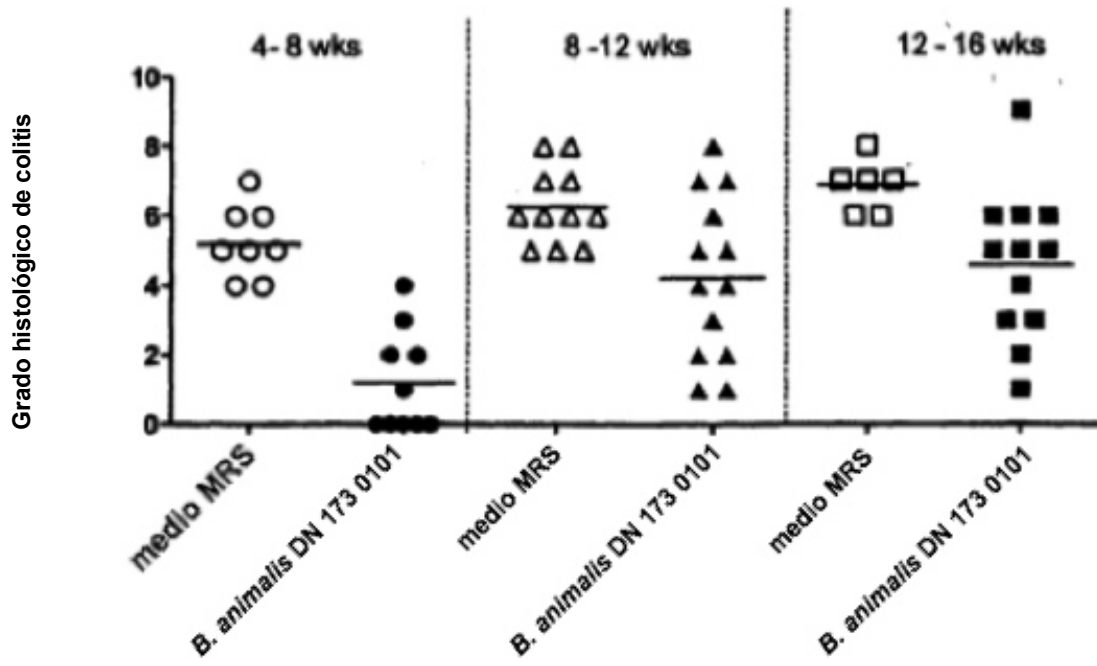


Figura 3

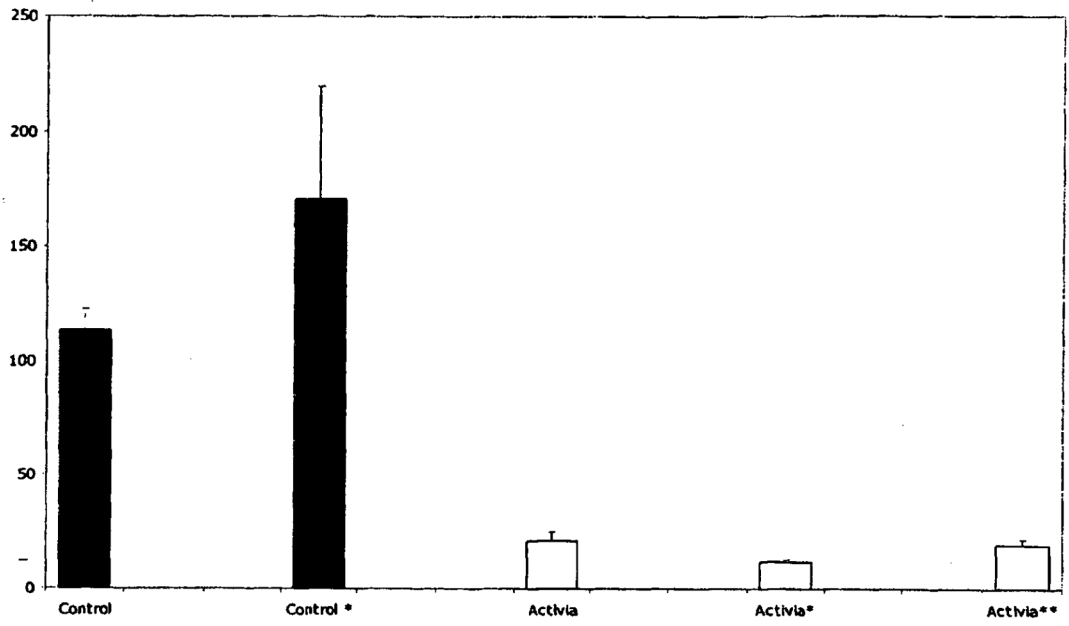


Figura 4