

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 444**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2010 PCT/IE2010/000066**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11058535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2010 E 10779340 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2498789**

54 Título: **Cepa de Bifidobacterium probiótica**

30 Prioridad:

11.11.2009 US 616752
11.05.2010 US 344030 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2016

73 Titular/es:

ALIMENTARY HEALTH LIMITED (50.0%)
2800 Cork Airport Business Park Kinsale Road
Cork, IE y
THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)

72 Inventor/es:

O'MAHONY, LIAM;
KIELY, BARRY;
CRYAN, JOHN FRANCIS;
DINAN, TIMOTHY y
MURPHY, EILEEN FRANCES

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 595 444 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

Cepa de *Bifidobacterium* probiótica

5 **Introducción**

La invención se refiere a una cepa de *Bifidobacterium* y su uso como bacteria probiótica, en especial como agente bioterapéutico inmunomodulador.

10 Los mecanismos de defensa para la protección del tracto gastrointestinal humano frente a la colonización por parte de bacterias intestinales son altamente complejos y comprenden aspectos inmunológicos y no inmunológicos (1). Los mecanismos de defensa innatos incluyen un bajo pH del estómago, sales biliares, la peristalsis, capas de mucina y compuestos antimicrobianos tales como la lisozima (2). Los mecanismos inmunológicos incluyen agregados linfoides especializados, células M subyacentes, llamadas placas de Peyer, que están distribuidas por todo el intestino delgado y el
15 colon (3). Los antígenos lumenales presentes en estos sitios dan lugar a la estimulación de subseries de células T y B apropiadas con el establecimiento de redes de citoquinas y la secreción de anticuerpos en el tracto gastrointestinal (4). Además, la presentación de antígenos se puede producir a través de las células epiteliales hacia linfocitos intraepiteliales y a las células inmunitarias (5) subyacentes a la lámina propia. Por lo tanto, el huésped invierte de forma sustancial en la defensa inmunitaria del tracto gastrointestinal. Sin embargo, puesto que la mucosa gastrointestinal es la mayor superficie
20 en la que el huésped interactúa con el medio ambiente externo, deben existir mecanismos de control específicos para regular la sensibilidad inmunitaria a las 100 toneladas de alimentos tratados en el tracto gastrointestinal a lo largo de toda una vida promedio. Además, el intestino está colonizado por más de 500 especies de bacterias en una cantidad de 10^{11} - 10^{12} /g en el colon. Por lo tanto, estos mecanismos de control deben ser capaces de distinguir bacterias adherentes no patógenas de patógenos invasores, que causarían un daño significativo al huésped. De hecho, la flora intestinal contribuye a defender el huésped compitiendo con microorganismos potencialmente patógenos recién ingeridos.

Las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal humano pueden favorecer la inflamación. Las respuestas inmunes aberrantes a la microflora indígena han estado relacionadas con algunos estados patológicos como, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria del intestino. Los antígenos asociados con la flora normal generalmente producen tolerancia inmunológica y la incapacidad de lograr dicha tolerancia es un mecanismo principal de la inflamación de las mucosas (6). Las pruebas de esta ruptura en la tolerancia incluyen un aumento en los niveles de anticuerpos dirigidos contra la flora del intestino en pacientes con Enfermedad inflamatoria del intestino (EII).

35 La presente invención se refiere a una cepa de *Bifidobacterium* que tiene efectos inmunomoduladores demostrados, modulando los niveles de citoquinas o antagonizando y excluyendo microorganismos proinflamatorios del tracto gastrointestinal.

Afirmaciones de la invención

40 La invención proporciona una cepa aislada de *Bifidobacterium* NCIMB 41676.

La cepa de *Bifidobacterium* puede estar en forma de células viables. La cepa de *Bifidobacterium* puede estar en forma de células no viables. El *Bifidobacterium* se puede aislar de tejido de biopsia colónica de un individuo humano sano. La cepa de *Bifidobacterium* puede ser significativamente inmunomoduladora después del consumo oral en humanos.

45 La invención también proporciona una formulación que comprende una cepa de *Bifidobacterium* como se describe en la presente memoria. La formulación puede además comprender un material probiótico. La formulación puede además comprender un material prebiótico. La formulación puede además comprender un vehículo ingerible. El vehículo ingerible puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, un comprimido o un polvo. El vehículo ingerible puede ser un producto alimenticio tal como una leche acidificada, yogur, yogur congelado, leche en polvo, leche concentrada, pasta de queso para untar, aderezos o bebidas. La formulación puede además comprender una proteína y/o un péptido, en particular proteínas y/o péptidos ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, mineral y/o elemento traza. La cepa de *Bifidobacterium* puede estar presente en una cantidad de más de 10^6 ufc por gramo de la formulación. La formulación puede además comprender un adyuvante. La
50 formulación puede además comprender un componente bacteriano. La formulación puede además comprender una entidad medicamentosa. La formulación puede además comprender un compuesto biológico. La formulación se puede utilizar para procedimientos de inmunización y vacunación.

60 La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación según se describe en la presente memoria para usar en productos alimenticios.

La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación como se describe en la presente memoria para usar como medicamento.

65 La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación como se describe en la presente memoria para usar en la profilaxis y/o tratamiento de actividad inflamatoria indeseada.

La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación como se describe en la presente memoria para usar en la profilaxis y/o tratamiento de la colitis ulcerosa o del síndrome del intestino irritable.

5 La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación como se describe en la presente memoria para utilizar en la profilaxis y/o tratamiento de la artritis reumatoide.

10 La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación como se describe en la presente memoria para usar en la preparación de agentes bioterapéuticos antiinflamatorios para la profilaxis y/o tratamiento de la actividad inflamatoria no deseable.

Las cepas de *Bifidobacterium* se pueden utilizar, como se describe en la presente memoria, en la preparación de un panel de agentes bioterapéuticos para modificar los niveles de IL-10.

15 La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación como se describe en la presente memoria para usar en la preparación de agentes bioterapéuticos antiinflamatorios para la reducción de los niveles de citoquinas proinflamatorias.

20 La invención también proporciona una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación como se describe en la presente memoria para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la depresión, alteraciones del estado de ánimo y/o desórdenes de ansiedad.

25 Describimos la cepa *Bifidobacterium* AH1714 (NCIMB 41676) o mutantes o variantes de la misma. El mutante puede ser un mutante genéticamente modificado. La variante puede ser una variante natural de *Bifidobacterium*. También se describe una variante resistente de rifampicina de la cepa AH1714. La cepa puede ser un probiótico. Puede estar en forma de cultivo biológicamente puro.

30 Se describe asimismo una cepa aislada de *Bifidobacterium* NCIMB 41676. Las cepas de *Bifidobacterium* pueden estar en forma de células viables. De forma alternativa, las cepas de *Bifidobacterium* están en forma de células no viables. El uso general de las bacterias probióticas es en forma de células viables. Sin embargo, se puede también extender a células no viables tales como cultivos muertos o composiciones que contienen factores beneficiosos expresados por las bacterias probióticas. Esto puede incluir microorganismos térmicamente inactivados o microorganismos inactivados por exposición a pH alterado o sometidos a presión o a radiación gamma. Con las células no viables la preparación es más sencilla, las células se pueden incorporar más fácilmente en sustancias farmacéuticas y las necesidades de almacenamiento son mucho menos limitadas que en el caso de las células viables. *Lactobacillus casei* YIT 9018 ofrece un ejemplo del uso eficaz de las células inactivadas por calor como método para el tratamiento y/o prevención del crecimiento tumoral según se describe en la patente US-4347240.

40 Las cepas de *Bifidobacterium* se pueden aislar a partir de tejido de biopsia colónica de individuos humanos sanos, siendo las cepas de *Bifidobacterium* significativamente inmunomoduladoras después del consumo oral en humanos.

45 También se describe una formulación que comprende la cepa de *Bifidobacterium* como se describe en la presente memoria. La formulación puede incluir otro material probiótico. La formulación puede incluir un material prebiótico. Preferiblemente, la formulación incluye un vehículo ingerible. El vehículo ingerible puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo. Preferiblemente, el vehículo ingerible es un producto alimenticio tal como, por ejemplo, leche acidulada, yogur, yogur congelado, polvo de leche, concentrado de leche, productos de queso para untar, aderezos o bebidas. La formulación puede además comprender una proteína y/o un péptido, en particular proteínas y/o péptidos ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, mineral y/o elemento traza. La cepa de *Bifidobacterium* puede estar presente en la formulación en una cantidad superior a 10^6 ufc por gramo de sistema de suministro. Preferiblemente, la formulación incluye uno o más de un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad medicamentosa o un compuesto biológico.

55 Se describe una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación para usar como productos alimenticios, como medicamento, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la actividad inflamatoria no deseable, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la actividad inflamatoria respiratoria no deseable tal como el asma, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable como, por ejemplo, la enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa, el síndrome del intestino irritable, la pouchitis, o colitis postinfecciosa, para usar en la profilaxis y/o tratamiento de cáncer o cánceres gastrointestinales, para usar en la profilaxis y/o tratamiento de la enfermedad sistémica como, por ejemplo, la artritis reumatoide, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de desórdenes autoinmunes debidos a actividad inflamatoria no deseable, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento del cáncer debido a actividad inflamatoria no deseable, para usar en la profilaxis del cáncer, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad diarreica debida a actividad inflamatoria no deseable, como, por ejemplo, diarrea asociada a *Clostridium difficile*, diarrea asociada a Rotavirus o diarrea postinfecciosa, para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la enfermedad diarreica debida a un agente infeccioso, tal como *E.coli*.

65

5 También se describe una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación de la invención para usar en la preparación de un agente bioterapéutico antiinflamatorio para la profilaxis y/o el tratamiento de la actividad inflamatoria no deseada o para usar en la preparación de agentes bioterapéuticos antiinflamatorios para la profilaxis y/o el tratamiento de la actividad inflamatoria no deseable. La cepa puede actuar antagonizando y excluyendo microorganismos proinflamatorios del tracto gastrointestinal.

También describimos una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación para usar en la preparación de agentes bioterapéuticos antiinflamatorios para reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias.

10 La cepa de *Bifidobacterium* se puede usar en la preparación de agentes bioterapéuticos antiinflamatorios para modificar los niveles de IL-10.

La cepa de *Bifidobacterium* se puede usar como probiótico antiinfeccioso debido a su capacidad de antagonizar el crecimiento de especies patógenas.

15 Hemos descubierto que cepas específicas de *Bifidobacterium* suscitan efectos inmunomoduladores *in vitro*.

La invención es por lo tanto de gran valor terapéutico potencial en la profilaxis o tratamiento de respuestas inmunes desreguladas tales como reacciones inflamatorias no deseables, por ejemplo, asma.

20 *Bifidobacterium* son microorganismos comensales. Se han aislado de flora microbiana dentro del tracto gastrointestinal humano. El sistema inmunológico dentro del tracto gastrointestinal no puede tener una reacción pronunciada a miembros de dicha flora, puesto que la actividad inflamatoria resultante también destruiría células huésped y función tisular. Por lo tanto, existe algún o algunos mecanismos en los que el sistema inmunológico puede identificar miembros no patógenos comensales de la flora gastrointestinal como diferentes de los organismos patógenos. Esto asegura que el daño producido a los tejidos huéspedes quede restringido y que se continúe manteniendo una barrera de defensa.

25 Se depositó una cepa de *Bifidobacterium longum* AH1714 en las Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales y Marinas (National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited [NCIMB]), Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido, el 5 de noviembre de 2009 y se registró con el número de registro NCIMB 41676.

Bifidobacterium longum puede ser una mutante genéticamente modificada o puede ser una variante natural de la misma.

35 Preferiblemente *Bifidobacterium longum* puede estar en forma de células viables.

Alternativamente, *Bifidobacterium longum* puede ser en forma de células no viables.

40 Se apreciará que la cepa específica de *Bifidobacterium* de la presente invención se puede administrar a animales (incluidos humanos) en forma oralmente ingerible en una preparación convencional como, por ejemplo, cápsulas, microcápsulas, comprimidos, gránulos, polvo, pastillas, píldoras, supositorios, suspensiones y jarabes. Las formulaciones adecuadas se pueden preparar mediante métodos comúnmente empleados utilizando aditivos orgánicos e inorgánicos convencionales. La cantidad de ingrediente activo en la composición médica puede estar a un nivel que ejerza el efecto terapéutico deseado.

45 La formulación puede también incluir un componente bacteriano, una entidad medicamentosa o un compuesto biológico. Además, se puede preparar una vacuna que comprenda las cepas de la presente invención usando cualquier método conocido y puede incluir un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

50 A lo largo de la descripción, los términos mutante, variante y mutante genéticamente modificada incluyen una cepa de Bifidobacterias cuyas propiedades genéticas y fenotípicas están alteradas en comparación con la cepa de origen. La variante natural de *Bifidobacterium longum* incluye las alteraciones espontáneas de propiedades deseadas aisladas de forma selectiva. La alteración deseada de las propiedades de la cepa madre se logra mediante técnicas de manipulación genética convencionales (*in vitro*), tales como disrupción génica, transferencia conjugativa, etc. La modificación genética incluye la introducción de secuencias de ADN exógenas y/o endógenas en el genoma de una cepa de Bifidobacterias, por ejemplo, mediante la inserción en el genoma de la cepa bacteriana mediante vectores, incluido ADN plasmídico, o bacteriófagos.

60 Las mutaciones naturales o inducidas incluyen al menos alteraciones de una única base como, por ejemplo, delección, inserción, transversión u otras modificaciones del ADN que puedan dar lugar a la alteración de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN.

65 Los términos mutante, variante y mutante genéticamente modificada también incluyen una cepa de Bifidobacterias que ha experimentado alteraciones genéticas que se acumulan en un genoma a una velocidad consistente para todos los microorganismos y/o alteraciones genéticas que se producen debido a la mutación espontánea y/o adquisición de genes y/o pérdida de genes que no se logra mediante manipulación deliberada (*in*

vitro) del genoma pero que se logra mediante la selección natural de variantes y/o mutantes que proporcionan una ventaja selectiva para favorecer la supervivencia de la bacteria cuando se expone a presiones ambientales como, por ejemplo, antibióticos. Un mutante se puede crear mediante inserción deliberada (*in vitro*) de genes específicos en el genoma que no alteran de forma fundamental la funcionalidad bioquímica del organismo pero cuyos productos se pueden utilizar para la identificación o selección de la bacteria, por ejemplo, la resistencia del antibiótico.

Un experto en la técnica comprenderá que se pueden identificar cepas mutantes o variantes de Bifidobacterias mediante análisis de homología de secuencia de ADN con la cepa madre. Las cepas de Bifidobacterias que tienen una identidad de secuencia próxima a la cepa madre se consideran cepas mutantes o variantes. Una cepa de Bifidobacterias con una identidad de secuencia (homología) de 96% o superior, por ejemplo, 97% o superior, o 98% o superior, o 99% o superior, con la secuencia de DNA madre se puede considerar una mutante o variante. La homología de secuencia se puede determinar utilizando el programa "BLAST" de algoritmo de homología en línea, disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Las mutantes de la cepa madre también incluyen cepas de Bifidobacterias derivadas que tienen al menos 85% de homología de secuencia, por ejemplo, al menos 90% de homología de secuencia, o al menos 95% de homología de secuencia con la secuencia polinucleotídica de espaciador intergénico 16s - 23s de la cepa madre. Dichas mutantes pueden además comprender mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN en el genoma bacteriano.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción de la misma dada a modo de ejemplo solamente con respecto a los dibujos anexos, en los que:-

La Fig. 1 es una gráfica que ilustra el tránsito de *B. longum* AH1714 a lo largo del tracto gastrointestinal;

La Fig. 2 es una fotografía de *B. longum* AH1714 que ha crecido en una placa de agar Congo rojo;

La Fig. 3 es un diagrama de barras que ilustra la relación IL-10:IL-12p70 para PBMC simulada con cepa *Bifidobacterium longum* 1714 (*Bifidobacterium* 1714);

La Fig. 4 es un diagrama de barras que muestra el perfil de introducción de IL-10 en esplenocitos aislados de ratones alimentados tanto con 1714 como con PBS con y sin estimulación con LPS 1 mg/kg *in vivo*. Las células *in vitro* son no estimuladas (A), estimuladas con LPS (B) o estimuladas con antiCD3/CD28 (C). Los datos se muestran como Promedio y EEM;

La Fig. 5 es un diagrama de barras que muestra el perfil de introducción de TNF- α en esplenocitos aislados de ratones alimentados con 1714 y con PBS con y sin estimulación con LPS 1 mg/kg *in vivo*. Las células *in vitro* no son estimuladas (A) o son estimuladas con antiCD3/CD28 (B). Los datos se muestran como Promedio y EEM;

La Fig. 6 es un diagrama de barras que muestra el perfil de introducción de IFN- γ en esplenocitos aislados de ratones alimentados con 1714 y con PBS con y sin estimulación con LPS 1 mg/kg *in vivo*. Las células *in vitro* no son estimuladas (A) o son estimuladas con antiCD3/CD28 (B). Los datos se muestran como promedio y EEM.

La Fig. 7 es un diagrama de barras que muestra el perfil de introducción de IL-12p70 en esplenocitos aislados de ratones alimentados con 1714 y con PBS con y sin estimulación con LPS 1 mg/kg *in vivo*. Las células *in vitro* no son estimuladas (A) o son estimuladas con antiCD3/CD28 (B). Los datos se muestran como Promedio y EEM;

La Fig. 8 es un diagrama de barras que muestra el perfil de introducción de TNF- α (A) e IL-10 (B) en suero obtenido de ratones alimentados con 1714 y con PBS después de estimulación *in vivo* de 2H con LPS 1 mg/kg. Los datos se muestran como Promedio y EEM;

La Fig. 9 es un diagrama de barras que muestra la actividad de NFkB (fotones/segundo) de bazo aislados 3 horas después de la estimulación con una dosis única de 0,5 mg/kg de LPS, de Placebo y de animales alimentados con 1714 (** designa $p < 0,01$);

La Fig. 10 es un diagrama de barras (A) que muestra la actividad de NFkB (fotones/segundo) correspondientes a imágenes de cuerpo entero 1,5 h después de estimular con una dosis única de 0,5 mg/kg de LPS, de Placebo y de animales alimentados con 1714 ((B) y (C) son imágenes representativas de cuerpo entero en blanco y negro y en color;

La Fig. 11 es un diagrama de barras que representa el tiempo de inmovilidad mostrado por los ratones durante una prueba de 6 min;

La Fig. 12 es un gráfico de líneas que representa el porcentaje de paralización en respuesta a estímulo generador de miedo (contexto) para el día 1 (adquisición), día 2 (memoria/excitación) y día 3 (extinción);

La Fig. 13 es una curva que representa el porcentaje de paralización en respuesta al estímulo generador de miedo (indicio) para el día 1 (adquisición), día 2 (memoria/extinción) y día 3 (extinción);

5 La Fig. 14 es un diagrama de barras que representa el número de canicas enterradas por los ratones durante una sesión de 30 min;

La Fig. 15 es un diagrama de barras que representa la variación de la temperatura del cuerpo (ΔT) presentada por los ratones después del tratamiento; y

10 La Fig. 16 es un diagrama de barras que muestra los cambios en los niveles de citoquinas en esplenocitos estimulados del modelo de ratón inducido por dieta.

Descripción detallada de la invención

15 Se depositó una cepa de *Bifidobacterium longum* AH1714 en las Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales y Marinas (National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited [NCIMB]), Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido, el 5 de noviembre de 2009 y se registró con el número de registro NCIMB 41676.

20 Se realizó un depósito de la cepa *Bifidobacterium longum* UCC35624 en las Colecciones Nacionales de Bacterias Industriales y Marinas (National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited [NCIMB]), Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido, el 13 de enero 1999 y se registró con el número de registro NCIMB 41003.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos describen y demuestran adicionalmente realizaciones dentro del alcance de la invención. Los ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no deben considerarse limitaciones de la presente invención puesto que son posibles muchas modificaciones de los mismos sin abandonar el ámbito de la invención.

Ejemplo 1 - Aislamiento de *Bifidobacterium longum* AH1714

35 La cepa *Bifidobacterium longum* AH1714 se aisló de tejido de biopsia colónica de individuos humanos sanos.

Se analizaron secciones de la longitud del Tracto gastrointestinal (TGI) humano, obtenido durante resección colorectal para analizar las cepas de bacterias probióticas. El tejido mucoso del tracto gastrointestinal humano se transfirió a un tubo de colección que contenía solución salina tamponada con fosfato (PBS), suplementada con cisteína-HCl al 0,05%. Se añadió Tritón X-100 (0,05%) para liberar los microorganismos adherentes de la muestra del tejido. Se incubaron muestras de tejido durante 10 min. Las muestras se agitaron vigorosamente en vórtex y se aislaron *Lactobacilli* y *Bifidobacterias* adherentes del tejido gastrointestinal en placas de agar selectivo (De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) agar + Vancomicina y Wilkins-Chalgren Agar + Mupirocina, respectivamente). Se tomaron las colonias aisladas de las placas y se volvieron a aplicar estrías tres veces para garantizar su pureza. Se utilizaron examen al microscopio, tinción Gram, prueba de Catalasa, evaluación de Fructosa-6-Fosfato Fosfocetolasa para determinar las especies de *Bifidobacterias* presuntivas y se almacenaron los productos aislados en glicerol al 40% y se almacenaron a -20 °C y -80 °C. Se usó secuenciación de región espaciadora intergénica 16S para confirmar la identidad de las cepas recién aisladas.

50 Después de aislar una cepa de *bifidobacterias* puras, a la que se dio la designación AH1714, se evaluaron las características microbiológicas y se resumen a continuación en la Tabla 1. AH1714 es una bacteria con forma pleomórfica catalasa negativa, gram positiva que es Fructosa-6-Fosfato Fosfocetolasa positiva, lo que confirma su identidad como *bifidobacterium*.

Tabla 1 - Características fisicoquímicas de *B.longum* AH1714

Características de cepa	<i>B.longum</i> AH1714
Tinción Gram	+
Catalasa	-
Motilidad	-
F6PPK*	+

55 Se llevó a cabo secuenciación con Espaciador intergénico 16s-23s (IGS) para identificar la especie de *Bifidobacterias* aisladas. En resumen, se aisló ADN de AH1714 utilizando 100 μ l de solución de extracción y 25 μ l de solución de preparación de tejidos (kit XNAT2, Sigma). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente seguido de 2 h a 95 °C y a continuación se añadieron 100 μ l de solución de neutralización (kit XNAT2, Sigma). Se cuantificó la

solución de ADN genómico utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y se almacenó a 4 °C. Se realizó PCR utilizando los cebadores IGS. Los pares de cebadores utilizados fueron IGS R 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' (SEQ ID No. 4) y IGS L 5'-GCTGGATCACCTCCTTTCT-3' (SEQ ID No. 3). Las condiciones de los ciclos fueron de 94 °C durante 4 min (1 ciclo), 94 °C durante 45 s, 53 °C durante 45 s, 72 °C durante 45 s (28 ciclos). La reacción de PCR contenía 2 µl (100 ng) de DNA, PCR mix (Sigma, Red Taq), 0,025 nM de IGS L y cebador R (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Biotherma. Los productos de PCR (10 µl) se trataron junto a un marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, Roche) en un gel teñido con EtBr agarosa al 2% en TAE, para determinar el perfil de IGS. Los productos de PCR de *Bifidobacterium* (banda única) se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR Promega Wizard. Los productos PCR purificados se secuenciaron usando las secuencias del cebador (citadas) para la región del espaciador intergénico. A continuación se hizo una búsqueda de los datos de secuencia en la base de datos de nucleótidos de NCBI para determinar la identidad de la cepa mediante homología nucleotídica. Los datos de secuencia de ADN resultantes se sometieron al motor de búsqueda BLAST de homología nucleótido-nucleótido estándar de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se identificó la máxima coincidencia con la secuencia y a continuación se alinearon las secuencias para compararlas usando el programa DNASTAR MegAlign. Las secuencias (SEQ ID NO. 1 [secuencia directa IGS] y SEQ ID NO. 2 [secuencia inversa IGS]) obtenidas pueden verse en el listado de secuencias. Una búsqueda en la base de datos de NCIMB reveló que AH1714 tiene una secuencia única IGS (SEQ ID NO. 1 [secuencia directa] y SEQ ID NO. 2 [secuencia inversa]) que es la homología más próxima con *Bifidobacterium longum*.

Para desarrollar un perfil de PCR con código de barras para AH1714, se llevó a cabo PCR utilizando cebadores BOX (8). Las condiciones del ciclo eran 94 °C durante 7 min (1 ciclo); 94 °C durante 1 minuto, 53 °C durante 45 s, 65 °C durante 8 minutos, (30 ciclos) y 65 °C durante 16 minutos. La reacción de PCR contenía 50 ng de ADN, mezcla de PCR (Sigma, Red Taq) y 0,03 nM de cebador BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (SEQ ID NO. 5) (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Biotherma. Los productos de PCR se aplicaron en un gel de agarosa al 3% junto con un marcador de peso molecular (Roche, escalera de 100 pb) y se sometieron a análisis de imagen.

Perfiles de sensibilidad a antibióticos

Los perfiles de sensibilidad a antibióticos para *B. longum* AH1714 se determinaron utilizando el ensayo de "susceptibilidad en disco". Los cultivos se cultivaron en el medio de cultivo apropiado durante 48 h y se esparcieron (100 µl) en una placa con medio de agar. Se colocaron discos con concentraciones conocidas de los antibióticos sobre el agar. Se examinaron las cepas para evaluar su sensibilidad al antibiótico al cabo de 1-2 días de incubación a 37 °C bajo condiciones anaerobias.

Tabla 2 – Resistencia al antibiótico

Antibiótico	Grupo	AH1714
Penicilina G	Antibiótico β-lactámico	S
Ampicilina	Antibiótico β-lactámico	S
Meticilina	Antibiótico β-lactámico	M
Estreptomicina	Antibiótico aminoglucosídico	R
Gentamicina	Antibiótico aminoglucosídico	M
Vancomicina	Antibiótico glicopeptídico	S
Ácido nalidíxico	Antibiótico quinolona sintético	R
Novobiocina	Antibiótico aminocumarina	S
Tetraciclina	Antibiótico policétido	S
Sulfametoxazol	Antibiótico sulfonamida	R
Trimetoprim\Sulfametoxazol	Antibiótico sulfonamida	R
Trimetoprim		R
Rifampicina	Antibiótico rifampicina	S
Cloramfenicol		S
Metronidazol	Antibióticos nitroimidazol	M
Mupirocina		R

R= Resistente (Tamaño zonas ≤ 14 mm)

M= Moderadamente sensible (Tamaño zona 15-19 mm)

S = Sensible (Tamaño zona ≥ 20 mm)

Tránsito intestinal

Para determinar si *Bifidobacterium longum* AH1714 podría sobrevivir a valores de pH bajos equivalentes a los valores presentes habitualmente en el estómago, se cultivaron células bacterianas a partir de cultivos obtenidos

durante la noche, se lavaron dos veces en tampón fosfato (pH 6,5) y se resuspendieron en caldo TPY ajustado a pH 2,5 (con HCl 1 M). Las células se incubaron a 37 °C y se midió su supervivencia a intervalos de 5, 30, 60 y 120 minutos utilizando el método de conteo de placa. AH1714 sobrevivió bien durante 5 minutos a pH 2,5 sin que se recuperasen células viables al cabo de 30 minutos.

Después de salir del estómago, los probióticos putativos se exponen a sales biliares en el intestino delgado. Para determinar la capacidad de *B. longum* AH1714 de sobrevivir la exposición a la bilis, se sembró por estrías en placas de agar TPY suplementadas con bilis porcina al 0,3% (peso/volumen), 0,5%, 1%, 2%, 5%, 7,5% o 10%. Se observó crecimiento de *B. longum* AH1714 sobre placas que contenían hasta un 0,5% en bilis.

Tabla 3 – Crecimiento de AH1714 en presencia de bilis porcina (resultados por duplicado)

Cepa	Bilis porcina % (peso/volumen)							
	0,0	0,3	0,5	1,0	2,0	5,0	7,5	10,0
AH 1714	+++	++	+	-	-	-	-	-

+++ = muy buen crecimiento ~100%

++ = buen crecimiento ~66%

+ = mal crecimiento ~33%

- = sin crecimiento ~0%

En un modelo murino exento de gérmenes, se evaluó la capacidad de *B. longum* AH1714 de transitar el tracto gastrointestinal. Los ratones consumieron 1×10^9 AH1714 diariamente y se examinaron sus excrementos para determinar la presencia del microorganismo alimentado. Se facilitó la detección AH1714 aislando una variante resistente a rifampicina espontánea de las bifidobacterias. La incorporación de rifampicina en las placas de RCA + cisteína para evaluar el tránsito garantizó que solo se cultivasen las bifidobacterias resistentes a rifampicina alimentadas. Se recogieron muestras fecales diariamente y se confirmó el tránsito de *B. longum* AH1714 a través del tracto gastrointestinal (ver Fig. 1)

Actividad antimicrobiana

Para evaluar las actividades antimicrobianas de *B. longum* AH1714 frente a cultivos indicadores y determinar si la actividad antimicrobiana era debida a la producción de ácidos, se cultivó AH1714 durante la noche en MRS (suplementado con cisteína-HCl al 0,05%). Se inocularon 2 µl de cultivo de AH1714 en el agar y se incubó durante 24 h. Los organismos indicadores se cultivaron en TSB (*E. coli* y *Salmonella typhimurium*), caldo de Brucella (*Campylobacter jejuni*) y Medio de clostridia reforzado (RCM, *Clostridium difficile*). El césped indicador se preparó inoculando una capa superior fundida con un 2% (volumen/volumen) del cultivo indicador durante la noche, que se vertió sobre la superficie de los cultivos probióticos inoculados después del cultivo durante la noche en las placas de agar. Las placas se incubaron a 37 °C bajo condiciones adecuadas para la cepa indicadora y se registró el crecimiento al cabo de 24-48 h. Las zonas de clareamiento con un diámetro mayor a 1 mm se consideraron sensibles a la cepa probiótica. Este ensayo se llevó a cabo también en medios suplementados con β-glicerofosfato al 2% como agente tamponador para limitar la actividad antagonista debida a la producción de ácido.

Tabla 4 – Actividad antimicrobiana de AH1714

Cepa indicadora	Zona de inhibición (mm)	
	No tamponada	Tamponada
<i>Campylobacter jejuni</i>	9	9
<i>Clostridium perfringens</i>	20	10
<i>Salmonella typhimurium</i>	19	11
<i>E. coli</i> O157:H7	16	11

Generación de cepas resistentes a rifampicina (Rif^R) de 1714

Para hacer el seguimiento del tránsito de AH1714 en las muestras fecales, se aisló una variante resistente a rifampicina espontánea (rif+) del siguiente modo: se esparció en una placa un cultivo de caldo recién preparado de AH1714 (100 µl) sobre MRS + rifampicina + cisteína con la menor concentración de rifampicina (el intervalo fue de 0,1%, 0,08%, 0,06%, 0,04%, 0,02% y 0,002%). El medio de la placa sin rifampicina se incluyó como control positivo. Se incubaron anaeróbicamente ambas series de placas a 37 °C (48 horas). Se evaluó la pureza de las placas retiradas antes de inocular una colonia de la placa de agar suplementada con rifampicina y de aplicar estrías a la placa suplementada con rifampicina de la siguiente concentración alta. Además, se cultivó por estrías una colonia de la placa de agar de MRS sobre una placa de agar de MRS recién preparada y ambas series de placas se incubaron anaeróbicamente a 37 °C (48 horas). Este proceso se repitió para todo el rango de placas suplementadas con rifampicina. Se utilizó una colonia única de un cultivo completamente desarrollado sobre una placa de agar MRS suplementada con 50 µg/ml de rifampicina para inocularla en

un cultivo MRS de 20 ml y se utilizó el cultivo resultante para un almacenamiento posterior. Se confirmó la identidad de la variante mediante evaluación microscópica, análisis de secuencia de IGS y análisis de PCR específica.

Ejemplo 2 - Cribador agar rojo Congo

Se usó un cribado en agar rojo Congo para seleccionar fenotípicamente las cepas bacterianas que expresan EPS. Resumiendo, se inocularon 10 ml de medio de cultivo Rogosa modificado (+ 0,05% cisteína) asépticamente con una colonia recién desarrollada de la cepa bacteriana y se incubó anaeróticamente a 37 °C hasta lograr turbidez (de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas). Los cultivos del caldo se extendieron asépticamente sobre placas de agar rojo Congo y se incubaron de forma anaerobia a 37 °C durante 48 horas. Se cree que el EPS producido como subproducto del crecimiento y/o el metabolismo de determinadas cepas evita la captación de la tinción rojo Congo dando como resultado una morfología de colonia de color crema/blanco. Las cepas que producen menos EPS capturan la tinción rojo Congo fácilmente, dando como resultado una morfología de colonia de color rosa/rojo. Las cepas que no producen EPS se tiñen de color rojo y tienen un aspecto casi transparente en el fondo de agar rojo.

Haciendo referencia a la Fig. 2, la morfología de colonias de *B. longum* AH1714 es convexa, mucoide, de color blanco brillante

Ejemplo 3 - *Bifidobacterias 1714* inducen una relación IL-10:IL-12 significativamente elevada.

Se aislaron células mononucleares de sangre periféricas (PBMC) de sangre periférica de humano sano utilizando tubos BD Vacutainer CPT (catálogo BD 362761), según las instrucciones del fabricante. Las PBMC se lavaron y resuspendieron en medio Eagle modificado de Dulbecco Glutamax™ (Glutamax (sustituto de Glutamina) + piruvato + 4,5 g/l glucosa (catálogo Gibco 10569-010) 10% suero bovino fetal (catálogo Sigma F4135), y 1% de penicilina/estreptomicina (catálogo Sigma P0781). Las PBMC se incubaron (2×10^5 células por pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano y se añadieron 20 µl de una suspensión bacteriana (a una concentración de 1×10^7 UFC/ml). Las PBMC se incubaron con bacterias durante 48 horas a 37 °C / 5% CO₂ en un incubador. Al cabo de un período de incubación de 2 días, se centrifugaron las placas a 300 x g y se retiraron los sobrenadantes y se congelaron para almacenarlos a -80 °C hasta la realización del análisis. Se cuantificaron los niveles de Interleucina-10 (IL-10) e Interleucina-12p70 (IL-12p70) en los sobrenadantes de cultivo utilizando un kit de ensayo de 96 pocillos de Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD; catálogo K15008B-1)

Las bacterias se prepararon para experimentos de cultivo conjunto en dos formatos: (a) las bacterias recién cultivadas se cultivaron en medios Difco MRS y se cultivaron justo después de entrar en fase estacionaria. Todas las células se cultivaron en condiciones anaerobias a 37 °C. (B) Las bacterias se cultivaron en condiciones anaerobias a 37 °C en medios Difco MRS y se cultivaron justo después de entrar en fase estacionaria. Se generaron polvos liofilizados para cada una de dichas bacterias y se almacenaron a -80 °C en viales de 100 mg previamente alícuotados. Inmediatamente antes de su uso, se retiró una alícuota de cada cepa del congelador y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. Cada cepa se lavó 3 veces en soluciones ringer de 10 ml y después se centrifugaron. En cada ocasión se utilizó un vial nuevo. Se trazaron las curvas de crecimiento (DO vs número de células vivas) para cada condición de crecimiento, y las células lavadas se normalizaron según el número de células antes de la adición a PBMC. Se incluyó también un control sin bacterias en todos los experimentos. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

El control de las enfermedades inflamatorias se lleva a cabo a diferentes niveles. Los factores de control incluyen hormonas, prostaglandinas, productos intermedios con oxígeno y nitrógeno reactivo, leucotrienos y citoquinas. Las citoquinas son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular involucradas en la generación y en el control de las respuestas inmunológicas e inflamatorias. Las citoquinas son producidas por diversos tipos de célula, siendo los neutrófilos, los monocitos y los linfocitos las fuentes principales durante las reacciones inflamatorias debido a su mayor número en la zona lesionada.

Existen mecanismos múltiples por los cuales las citoquinas generadas en las zonas de inflamación afectan a la respuesta inflamatoria. La quimiotaxis estimula el anidamiento de las células inflamatorias en la zona lesionada, mientras que determinadas citoquinas favorecen la infiltración de las células en el tejido. Las citoquinas liberadas en el tejido lesionado dan lugar a la activación del infiltrado inflamatorio. La mayoría de las citoquinas son pleiotrópicas y expresan múltiples actividades que se solapan desde el punto de vista biológico. Puesto que las respuestas inflamatorias incontroladas pueden ocasionar enfermedades tales como IBD, es razonable suponer que la producción de citoquinas está alterada en los individuos que padecen dichas enfermedades.

La interleucina-10 (IL-10) es una citoquina antiinflamatoria producida por muchos tipos de células incluidos monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos (en particular linfocitos T reguladores). La IL-10 regula por defecto la expresión de las citoquinas Th1 proinflamatorias, los antígenos MHC de clase II, y las moléculas coestimuladoras en células que expresan antígenos. Potencia también la supervivencia de los linfocitos B, la proliferación, y la producción de anticuerpos. Esta citoquina puede bloquear la actividad de NF-κB y participa en la regulación de la ruta de señalización de JAK-STAT. Estudios en murinos de inactivación genética han demostrado el papel esencial de IL-10 en la inmunorregulación ya que los ratones IL-10KO desarrollan colitis grave. Además, las bacterias que son inductoras

potentes de IL-10 han demostrado favorecer la diferenciación de los linfocitos T reguladores *in vivo* contribuyendo así a la homeostasis inmunológica (7; 8).

La interleucina-12 (IL-12) es una citoquina proinflamatoria asociada con la polarización de las respuestas de los linfocitos T Th1 efectoras y estimula la producción de otras citoquinas Th1 proinflamatorias, tales como interferón gamma (IFN- γ) y factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) procedentes de los linfocitos T y las células citotóxicas naturales (NK). Los niveles elevados de expresión de IL-12 están asociados con la autoinmunidad. La administración de IL-12 a personas que padecen enfermedades autoinmunes ha mostrado empeorar los síntomas inmunes. Por el contrario, ratones inactivados genéticamente para IL-12 o el tratamiento de ratones con anticuerpos neutralizantes de IL-12 mejoró la enfermedad.

Las cascadas y redes de citoquina controlan la respuesta inflamatoria y no la acción de una citoquina en concreto en un tipo celular en concreto. Los niveles relativos de expresión, o equilibrio, de las dos citoquinas (tales como IL-10 e IL-12) son más informativos que la expresión de una única citoquina. En estos estudios, los inventores estimularon PBMC humanas con una gama de cepas bacterianas diferentes. Todas las cepas indujeron IL-10 y todas las cepas indujeron IL-12. Sin embargo, el examen de la relación de inducción entre IL-10 e IL-12 reveló que algunas cepas bacterianas indujeron una relación mayor (es decir, más IL-10 con menos IL-12) en comparación con otras cepas. Esta es una observación significativa ya que es el equilibrio entre cada una de estas señales opuestas el que determina en última instancia el resultado inmunológico. Se anticipa que una relación alta de IL-10:IL-12 promovería una respuesta antiinflamatoria asociada con actividad inmunorreguladora adecuada mientras que una relación IL-10:IL-12 baja contribuiría a una polarización Th1 de la respuesta inmune. De esta manera, la relación PBMC IL-10:IL-12 es un importante criterio de selección para identificar cepas bacterianas con propiedades inmunorreguladoras.

Ejemplo 4 - Alimentación a largo plazo de ratones con Bif. AH1714 se asocia con un aumento de citoquina antiinflamatoria IL-10 y con una disminución de citoquinas proinflamatorias y Th1 TNF- α IFN- γ e IL-12 en animales sanos en un modelo de sepsis/inflamación.

Materiales y métodos:

Se obtienen ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad de Harlan UK y se alojan en jaulas individualmente ventiladas y se les proporciona acceso *ad libitum* a comida estándar estéril para ratones y agua.

Se distribuyen de forma aleatoria ratones de peso similar en 2 grupos y se les administra PBS (control de vehículo n= 9), cepa *Bifidobacterium longum* AH1714 (n=17) mediante alimentación forzada por vía oral diariamente durante 115 días. Después del período de administración se toman muestras de sangre de 10 ratones AH1714 y 6 controles de vehículo se estimularon con 1 mg/kg de LPS (Sigma, L4391) mediante inyección por vía intraperitoneal.

Después del período de administración, se toman muestras de sangre de 6 ratones AH1714 y 4 controles de vehículo, se extrae suero y se conserva para la medición de citoquinas. También se extraen los bazo y se cultivan suspensiones monocelulares *in vitro*. Las citoquinas se miden en sobrenadantes de celulares después de cultivar durante 48 horas.

A otros 10 ratones AH1714 y 6 ratones de control se les administra una dosis única de inyección vía intraperitoneal con una concentración en LPS de 1 mg/kg. Al cabo de 2 horas se toma una muestra de sangre y se sacrificaron los ratones. Se trataron células séricas y de esplenocitos y se analizaron del modo anteriormente descrito en la presente memoria.

Análisis de citoquinas de esplenocitos

Los esplenocitos se aíslan de los bazo y se incuban durante 48 horas a 37 °C (en presencia de penicilina y estreptomycin) con medios de control, LPS, o antiCD3/CD28. Se analizan las citoquinas de los cultivos sobrenadantes utilizando un kit de ensayo de 96 pocillos de Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD; catálogo K15008B-1). Se cuantifican Interleucina 1 beta (IL-1b), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8) Interleucina 10 (IL-10), Interleucina 12p70 (IL12p70), Interferón-gamma (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α) y se registran en picogramos por mililitro (pg/ml).

Ensayo de citoquinas séricas

Se analiza suero utilizando el kit ultrasensible de IL-10 y TNF- α para ratones Meso Scale Discovery.

Resultados

Alimentación de ratones a largo plazo (115 días) con Bif. AH1714 está asociada con un aumento en las citoquinas IL-10 antiinflamatorias procedentes de PBMC estimuladas *ex vivo*, en comparación con un grupo de placebo (alimentado con PBS) para ratones sanos (ver Figura 4 [B]) o en un modelo de Sepsis/Inflamación (ratones estimulados con LPS; ver Figura 4 [C]).

Alimentación de ratones a largo plazo (115 días) con Bif. AH1714 está asociada con una disminución en las citoquinas proinflamatorias y Th1 TNF- α IFN- γ y IL-12 (subunidad p70) de PBMC *ex vivo* estimuladas, en

comparación con grupo de placebo (alimentado con PBS) en un modelo de Sepsis/Inflamación (ratones estimulados con LPS; ver Figura 5 [B], Figura 6 [B] y Figura 7 [B]).

5 Alimentación de ratones a largo plazo (115 días) con Bif. AH1714 está asociado con un aumento en los niveles séricos de citoquinas antiinflamatorias IL-10 y una disminución en las citoquinas proinflamatorias y Th1 TNF- α , en comparación con un grupo de placebo (alimentado con PBS) en un modelo de Sepsis/Inflamación (ratones sometidos a LPS; Ver Figuras 8 [A & B]).

10 Conjuntamente, estos resultados muestran que la cepa Bifidobacterium longum 1714 tiene actividad inmunomoduladora sistémica *in-vivo* y actividad antiinflamatoria y protege frente a respuestas inflamatorias mediadas por LPS o TLR-4.

Ejemplo 5 - Bif 1714 tiene actividad inmunomoduladora cuando se incubaba conjuntamente con células del sistema inmunológico humano in vitro, diferentes de Bif. AH35624.

15 Materiales y Métodos

Se someten a ensayo Bifidobacterium longum infantis cepa UCC35624 (B624), dos lotes independientes de cultivo (1 y 2) y Bifidobacterium longum cepa 1714 utilizando un ensayo de inducción de citoquinas de PBMC. Se preparan bacterias para experimentos de cultivo conjunto en los siguientes formatos. Las bacterias se cultivan en condiciones anaerobias a 37 °C en Medios Difco MRS y se cultivan justo después de entrar en fase estacionaria. Se generan polvos desecados por congelación para cada una de dichas bacterias y se almacenan a -80 °C en viales de 100 mg previamente alicuotados. Inmediatamente antes de su uso, se retira una alícuota de cada cepa del congelador y se permite que alcance la temperatura ambiente. Se lava cada cepa 3 veces en solución ringer de 10 ml y a continuación se centrifuga. En cada ocasión se usa un vial nuevo.

25 Se llevan a cabo conteos microscópicos directos utilizando una cámara de conteo Petroff-Hausser según las instrucciones del fabricante y se normalizan las células lavadas por número de células antes de la adición a la prueba de PBMC. Se añaden bacterias (20 μ l en solución salina tamponada con fosfato [PBS]) a cada pocillo de PBMC para obtener el número total de bacterias indicado para cada experimento.

30 *Prueba de inducción de citoquinas de PBMC (células mononucleares de sangre periférica)*

Se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre periférica de humano sano usando tubos BD Vacutainer CPT (catálogo BD 362761), según las instrucciones del fabricante. Se lavan PBMC y se resuspenden en Medio Eagle modificado de Dulbecco - Glutamax TM (Glutamax (sustituto de Glutamina) + piruvato + 4,5 g/l glucosa (catálogo Gibco 10569-010) 10% suero bovino fetal (catálogo Sigma F4135), y 1% penicilina/estreptomicina (catálogo Sigma P0781). Se incuban PBMC (2 x 10⁵ células por pocillo) en placas de 96 pocillos de fondo plano y 20 μ l de una suspensión bacteriana. También se aplica un control no bacteriano. Todas las pruebas se realizan por triplicado. Tras un período de incubación de 2 días a 37 °C, se centrifugaron las placas a 300 x g, y los sobrenadantes se retiraron y se almacenaron en condiciones de congelación a -80 °C hasta la realización del análisis. Se incuban PBMC junto con bacterias durante 48 horas a 37 °C / 5% CO² en un incubador. Después del período de incubación de 2 días, las placas se centrifugan a 300 x g, y se retiran los sobrenadantes y se almacenan en condiciones de congelación a -80 °C hasta la realización del análisis. Se analizan las citoquinas de los cultivos sobrenadantes utilizando un kit de ensayo de 96 pocillos de Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD; catálogo K15008B-1). Se cuantifican Interleucina 1 beta humana (IL-1 β), Interleucina 6 humana (IL-6), Interleucina 8 humana (IL-8), Interleucina 10 humana (IL-10), Interleucina 12p70 humana (IL12p70), Interferón-gamma humano (IFN- γ) y Factor de Necrosis Tumoral humano alfa (TNF α) y se registran como picogramos por mililitro (pg/ml). Cada muestra se somete a ensayo por duplicado.

50 *Resultados*

Se someten a ensayo Bifidobacterium longum infantis cepa UCC35624 (B624), dos lotes de cultivo independientes (1 y 2), y Bifidobacterium longum cepa 1714 para analizar la inmunomodulación utilizando ensayo de inducción de citoquinas de PBMC con 1,0E+07 bacterias. Se analizan los sobrenadantes para un grupo de citoquinas, incluidas IL-1 β , -6, -8, -10 y -12, TNF- α y IFN- γ .

En comparación con la cepa 35624 (para la cual ambos cultivos dieron un patrón similar para todas las citoquinas medidas), la cepa 1714 mostró un patrón muy similar para muchas de las citoquinas medidas. Sin embargo, de forma sorprendente, 1714 dio un patrón bastante diferente para IL-12, IFN γ y IL-6.

60 **IL-6:** La incubación con 1714 induce un nivel significativamente inferior de IL-6 en comparación con 35624 para 1,0 x 10⁷ bacterias por pocillo (ver Tabla 5)

65 Tabla 5

Cepa (1 x10E7 bacterias)	IL-6 (~pg/ml)
--------------------------	---------------

35624	28.000
1714	16.000

IL-12: La incubación con 1714 induce un nivel significativamente inferior de IL-12 en comparación con 35624 para $1,0 \times 10^7$ bacterias por pocillo (ver Tabla 6)

5 La incubación con **INF- γ** 1714 induce un nivel significativamente inferior de INF- γ en comparación con 35624 para $1,0 \times 10^7$ bacterias por pocillo (ver Tabla 6)

Tabla 6

Cepa (1×10^7 bacterias)	IL-12 (~pg/ml)	IL-12 (~pg/ml)	IFN- α (~pg/ml)	IFN- γ (~pg/ml)
35624	500	180	5000	1500
1714 (1)	220	115	2400	750
1714 (2)	240	80	2600	400

10 Foligne y col.¹⁹, han demostrado que las cepas de bacterias del ácido láctico que muestran capacidad *in vitro* de inducción de altos niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y bajos niveles de la citoquina inflamatoria IL-12 ofrecían la mejor protección en los modelos de colitis *in vivo* mientras que, en cambio, las cepas que daban lugar a una baja relación de citoquinas IL-10/IL-12 no podían aliviar los síntomas de la colitis de forma significativa. La protección *in vivo* observada fue específica para cada cepa. El perfil de citoquinas obtenido para Bif. AH1714 podía sugerir que esta cepa tiene potencialmente una eficacia mejorada en el modelo de colitis ulcerosa *in vivo*.

15 La IL-6 es una citoquina fuertemente implicada en la patología de IBS. L-6 es relevante para muchos procesos patológicos tales como la diabetes, la aterosclerosis, la depresión, la enfermedad de Alzheimer, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide. Por lo tanto, existe interés en el desarrollo de agentes anti IL-6 como terapia contra muchas de estas enfermedades.

Ejemplo 6 - Bif. AH1714 reduce la actividad NkB inducida por LPS en un modelo murino in-vivo

25 Materiales y Métodos

Los ratones transgénicos Nfkb^{luc} en un fondo de C57BL/6J-CBA/J se obtienen de los laboratorios Charles River (Wilmington, EE. UU.) y se crían internamente. Los ratones se mantienen en condiciones restringidas.

30 A las hembras se les alimenta Bif. AH1714, como un polvo liofilizado reconstituido en agua a una concentración de aproximadamente 1×10^9 unidades formadoras de colonia/día/animal, o un control de placebo. Los ratones consumen el microorganismo comensal en su agua de bebida *ad libitum* durante 20 días antes de la estimulación con LPS.

35 La actividad de NFkB se mide después de administrar la luciferina de sustrato y se obtienen imágenes utilizando el Xenogen IVIS 100. La actividad de NFkB base se mide antes de la estimulación con una dosis única de 0,5 mg/kg de LPS. Después de 3 horas se vuelve a someter a todos los animales a la toma de imágenes. La actividad de NFkB del cuerpo entero se evalúa sustrayendo las lecturas de base.

40 A continuación, se sacrifican todos los animales y se extraen los bazos, los hígados, el intestino delgado y el colon y se colocan en una placa de cultivo para la toma individual de imágenes.

Resultados

45 Bif. AH1714 reduce la actividad sistémica de Nfkb inducida por LPS en un modelo murino *in-vivo* de Sepsis/Inflamación como pone de manifiesto una actividad de Nfkb reducida en bazos aislados 3 horas después de la estimulación (ver Fig. 9) así como de la toma de imágenes del animal entero 1,5 horas después de la estimulación (ver Fig. 10) de animales alimentados con 1714 en comparación con animales a los que se alimentó Placebo. Estos resultados demuestran que la alimentación con Bif. 1714 está asociada con un menor nivel de inflamación sistémica asociada con el factor de transcripción NFkB.

50 Ejemplo 7 - 1714 presenta ventajas positivas en modelos animales de depresión y ansiedad

55 La depresión y la ansiedad son los desórdenes psiquiátricos más comunes, con una alta prevalencia en la sociedad. Los desórdenes de ansiedad se subdividen generalmente en trastorno fóbico, trastorno de ansiedad generalizado, trastorno postraumático y trastorno obsesivo-compulsivo.

Los antidepresivos modernos, tales como los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (p. ej., fluoxetina) y los inhibidores selectivos de la recaptación noradrenalina y serotonina (p. ej., venlafaxina) son de

amplio uso en el tratamiento de dichos trastornos. Sin embargo, los tratamientos no son siempre eficaces y no son aceptables para los pacientes. Es necesario desarrollar estrategias alternativas. La posibilidad de que las sustancias probióticas puedan ser eficaces en dichas condiciones es sugerida por los datos previos que indican que el probiótico *Bifidobacterium Infantis* reduce la hormona corticosterona del estrés en roedores (9).

Examinamos los efectos de conducta de *Bifidobacterium AH1714* en modelos de estrés en ratones y los comparamos con un SSRI ampliamente utilizado, el escitalopram, que se utiliza para tratar tanto la ansiedad como la depresión. Los animales se tratan con escitalopram o con AH1714 durante tres semanas.

Materiales y métodos

Prueba de suspensión del rabo

Una prueba bien caracterizada para evaluar la actividad de tipo depresivo y de tipo antidepresivo. Los ratones se suspenden individualmente por el rabo en una barra con soporte de anillo (distancia al suelo = 30 cm) utilizando cinta adhesiva (distancia a la punta del rabo = 2 cm). De forma típica, los ratones demuestran diversos tipos de comportamiento orientados a la huida intercalados con fases temporalmente crecientes de inmovilidad. Se emplea una sesión de ensayo de 6 minutos grabada con una cámara. Los vídeos son posteriormente puntuados por un observador altamente cualificado que no está informado acerca del tratamiento. El parámetro registrado es el número de segundos que el ratón permanece inmóvil.

Prueba de condicionamiento de miedo

Ampliamente usada para evaluar los componentes cognitivos de los desórdenes de ansiedad. Usamos un protocolo de tres días que permite la observación del aprendizaje del miedo asociado a contexto y a indicios. Después de explorar durante 3 minutos su entorno, se dio a los ratones 6 pares de 20 segundos de un indicio específico (tono de 10 KHz, 70dB combinado con una luz encendida) acoplado al final con 2 segundos de una descarga eléctrica suave (0,4 mA) en el pie. Ello va seguido de 1 min de exposición al contexto solamente. El procedimiento se repite dos días consecutivos. Sin embargo, no se produce descarga y se observa constantemente el comportamiento de paralización ante el contexto o indicio. El primer día permite llevar a cabo la evaluación de la capacidad de intervención para alterar la fuerza del condicionamiento de miedo inducido por contexto y por indicios, mientras que el tercer día permite observar el aprendizaje de extinción del miedo. La extinción es la formación de nuevas memorias y los medicamentos que facilitan la extinción pueden desempeñar un papel en el tratamiento del desorden de estrés postraumático.

La prueba de enterramiento con canicas

Propuesto como modelo para el desorden obsesivo-compulsivo. Los animales más ansiosos deben entablar comportamientos activos (enterramiento defensivo de canicas) para evitar estímulos ansiogénicos en la caja luminosa-oscura y laberintos elevados. Los ratones son colocados individualmente en jaulas pequeñas, en las que se han colocado de forma uniforme 20 canicas encima de un lecho de 5 cm de profundidad de serrín, y con una tapa de alambre situada encima de la jaula. Se evita alterar a los ratones durante 30 min, tras lo cual se cuenta el número de canicas enterradas (es decir, las que están cubiertas por serrín en más de tres cuartas partes).

Resultados

En la prueba de suspensión por el rabo AH1714 da un resultado positivo que sugiere una posible actividad antidepresiva. Haciendo ahora referencia a la Fig. 11, AH1714 indujo un menor tiempo de inmovilidad que el vehículo (Veh), lo que es indicativo de un menor comportamiento de tipo depresivo en animales alimentados con 1714. Esto es similar al efecto de antidepresivos convencionales como Lexapro®.

En términos cognitivos, en la prueba de condicionamiento de miedo, los animales sometidos a ensayo tratados con AH1714 mostraron un efecto de aprendizaje positivo. Con referencia a la Fig. 12, en pruebas de condicionamiento de miedo por contexto (principalmente memorias dependientes de hipocampo y de amígdala), 1714 indujo una mayor paralización frente al contexto (Cxt) que el vehículo (Veh) el día 1 y el día 2, con el mismo porcentaje de paralización que el vehículo el día 3, lo que sugiere que 1714 favorece el aprendizaje contextual del miedo y la memoria sin menoscabo de la extinción, sugiriendo así un papel positivo en la memoria contextual de eventos generadores de miedo. Con referencia a la Fig. 13, en pruebas de condicionamiento de miedo por indicio (dependiente de amígdala), 1714 indujo una mayor paralización al indicio (estímulo) generador de miedo mayor que el vehículo (Veh) el día 1, con el mismo porcentaje de paralización que el vehículo los días 2 y 3. Esto sugiere que 1714 favorece el aprendizaje del miedo dependiente de amígdala (indicio) y la memoria sin limitar la memoria ni la extinción, lo que sugiere un papel positivo en la memoria de un estímulo generador de miedo independientemente del contexto.

De los estudios con la prueba de enterramiento con canicas se desprende un posible efecto en el desorden obsesivo-compulsivo. Los animales tratados con AH1714 enterraron menos canicas en la tarea de enterramiento con canicas, lo que indica una menor ansiedad en los animales alimentados con 1714 y sugiere un posible efecto en el desorden

obsesivo-compulsivo (Fig. 14). Como en el caso del escitalopram, AH1714 indujo un menor aumento de temperatura corporal inducido por el estrés del suceso (menor hipotermia inducida por estrés), lo que sugiere una menor ansiedad en los animales alimentados con 1714 (Fig. 24). No hay diferencias entre los resultados con cada intervención.

5 *Conclusión*

AH1714 en modelos de depresión animal y ansiedad muestra un comportamiento similar al de un antidepresivo convencional. El impacto observado es similar al descrito en la bibliografía de los antidepresivos tales como los SSRI.

10 En conjunto, los datos indican que AH1714 puede ser ventajoso en el tratamiento de los síndromes psiquiátricos de la depresión y la ansiedad.

Ejemplo 8: 1714 presenta ventajas positivas en los marcadores inflamatorios en la obesidad inducida por la dieta

15 En los últimos años, se ha determinado que la obesidad está asociada con una inflamación de bajo grado que contribuye al desarrollo de las patologías asociadas con la obesidad que incluyen diabetes mellitus de tipo 2 (T2D), enfermedad cardiovascular (CVD), hipertensión, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y enfermedad del hígado graso de origen no alcohólico (NAFLD). La grasa visceral produce un número de citoquinas inflamatorias y quimioquinas (tales como leptina, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), proteína-1 quimioatrayente de macrófagos e interleucina-6, entre otras), cuya producción puede desajustarse patológicamente en caso de obesidad (revisado por Shoelson y col., 2007). Ciertamente, aunque se piensa que los macrófagos contribuyen de forma significativa a la resistencia de la insulina, otros estudios han sugerido que el uso de las propiedades antiinflamatorias de las células con un fenotipo potencialmente regulador puede tener un potencial terapéutico. Un estudio reciente sugiere que las células T_{reg} reducen el estado inflamatorio del tejido adiposo y, por lo tanto, la resistencia a la insulina en ratones (Feurer y col., 2009). Además, un cuerpo seminal de trabajo ha sugerido anomalías en la microbiota del intestino como una fuerza causante del desajuste metabólico relacionado con la obesidad, lo que sugiere que las intervenciones dirigidas a la salud del intestino tendrán ventajas beneficiosas para la salud en los desarreglos metabólicos relacionados con la obesidad. Se ha sugerido que la microbiota del intestino puede estar involucrada en el desarrollo de la obesidad en la regulación de homeostasis de energía, en la resistencia a la insulina, enfermedad del hígado graso de origen no alcohólico, en el metabolismo de energía, lípidos y aminoácidos (revisado por Ley y col., 2009)

Se escogió el modelo de ratón de Obesidad inducida por la dieta (DIO) como el modelo de ratón más apropiado para evaluar el impacto de candidatos probióticos seleccionados en la obesidad y la salud metabólica y para estudiar la relación entre la obesidad y los marcadores inflamatorios. El modelo de ratón DIO se refiere a ratones sanos alimentados con una dieta de alto contenido en grasa para inducir obesidad a lo largo del tiempo.

Diseño experimental

40 Se alimentaron ratones C57BL/J6 macho de siete semanas de edad con una dieta baja en grasa (10% de calorías de grasa; Research Diets, New Jersey; #D12450B), una dieta alta en grasa (DIO; 45% calorías de grasa; Research Diets, New Jersey; #D12451) o una dieta alta en grasa con AH1714 (1×10^9 ufc/día) en el agua de bebida durante 14 semanas. Todos los ratones se alojaron en grupos de 5 y se les administró diariamente alícuotas de probiótico fresco. El peso corporal y la ingesta de alimento se evaluaron semanalmente. Después de 14 semanas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron sus órganos internos, se pesaron y almacenaron a -80 °C. Se extrajeron los bazo y se efectuaron ensayos de citoquinas de esplenocitos como en el ejemplo 4.

Resultados

50 Como se esperaba, los ratones DIO tuvieron una ganancia de grasa significativamente mayor ($p < 0,001$) en comparación con los controles con poca grasa durante el período de alimentación de 14 semanas. En concordancia con estudios previos, los ratones DIO consumieron una cantidad de calorías significativamente mayor que los controles con poca grasa, medido mediante ingesta calórica acumulativa durante el período de 14 semanas del estudio ($p < 0,001$). En esplenocitos estimulados con LPS (estimulo de inmunidad innata) de ratones DIO, AH1714 tenían el efecto de disminuir la respuesta correspondiente a las citoquinas TNF α y IL-12 a LPS (FIG 16). En esplenocitos estimulados con CD3/CD28 (estímulo de inmunidad adaptativa), el tratamiento con AH1714 tenía el efecto de reducir la respuesta correspondiente la citoquina IL6. Estos resultados indican un efecto antiinflamatorio sistémico en el modelo de ratones DIO consistente con los datos PBMC y los datos del modelo de ratón *in vivo* ilustrados en otros ejemplos.

Inmunomodulación

60 El sistema inmunológico humano desempeña un papel significativo en la etiología y la patología de un amplio rango de enfermedades humanas. La respuesta hiperinmune e hipoinmune da lugar a, o forma parte de, la mayoría de estados patológicos. Una familia de entidades biológicas, llamadas citoquinas, es especialmente importante para el control de procesos inmunológicos. Las perturbaciones de dichas redes delicadas de citoquinas se están asociando cada vez más con muchas enfermedades. Estas incluyen, aunque no de forma limitativa, trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome del

intestino irritable, cáncer (especialmente los de los sistemas gastrointestinal e inmunológico), enfermedad
 5 diarrea, diarrea asociada a antibióticos, diarrea pediátrica, apendicitis, trastornos autoinmunes, esclerosis
 múltiple, enfermedad de Alzheimer, artritis reumatoide, celiasis, diabetes mellitus, trasplantes de órganos,
 infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, enfermedad periodontal, enfermedad urogenital,
 10 enfermedad de transmisión sexual, infección por HIV, replicación de HIV, diarrea asociada HIV, trauma asociado
 a cirugía, enfermedad metastásica inducida por cirugía, sepsis, pérdida de peso, anorexia, control de la fiebre,
 caquexia, curación de heridas, úlceras, función de barrera del intestino, alergia, asma, desórdenes respiratorios,
 desórdenes circulatorios, enfermedad coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación sanguínea,
 enfermedad renal, desórdenes del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, desórdenes
 15 nutricionales, osteoporosis, trastornos endocrinos, trastornos epidérmicos, psoriasis y *acne vulgaris*.

Los efectos en la producción de citoquinas son específicos para cada una de las cepas probióticas examinadas. Por lo
 tanto, se pueden seleccionar cepas probióticas específicas para normalizar un desequilibrio exclusivo de citoquinas
 15 específico de un tipo concreto de enfermedad. La personalización de terapias específicas de enfermedades se puede
 lograr usando una cepa única de AH1714 o variantes de las mismas o una selección de dichas cepas.

Educación inmunológica

La flora entérica es importante para el desarrollo y función adecuada del sistema inmunológico intestinal. En
 20 ausencia de una flora entérica, el sistema inmunológico intestinal no está propiamente desarrollado, como ponen
 de manifiesto modelos animales exentos de gérmenes, y determinados parámetros funcionales están
 disminuidos, por ejemplo, la capacidad fagocítica de los macrófagos y la producción de inmunoglobulinas (10). La
 importancia de la flora del intestino en la estimulación de respuestas inmunes no dañinas es cada vez más
 25 evidente. El aumento en la incidencia y severidad de las alergias en el mundo occidental se ha asociado con un
 aumento en la higiene y la higienización, concordante con una disminución en el número y rango de estímulos
 infecciosos encontrados por el huésped. Esta falta de simulación inmunológica puede permitir que el huésped
 reaccione ante agentes no patógenos, pero antigénicos, dando lugar a alergia o autoinmunidad. El consumo
 deliberado de una serie de bacterias inmunomoduladoras no patógenas proporcionaría al huésped los estímulos
 30 educacionales necesarios y apropiados para un correcto desarrollo y control de la función inmunológica.

Inflamación

La inflamación es el término utilizado para describir la acumulación local de fluido, proteínas del plasma y glóbulos
 35 blancos en un lugar que ha sufrido daño físico, infección o en el que hay una respuesta inmunológica continuada. El
 control de la respuesta inflamatoria se ejerce en numerosos niveles (11). Los factores de control incluyen citoquinas,
 hormonas (p. ej., hidrocortisona), prostaglandinas, intermedios de reacción y leucotrienos. Las citoquinas son
 proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular que participan en la generación y control de respuestas
 40 inmunológicas e inflamatorias, regulando al mismo tiempo el desarrollo, reparación de tejidos y hematopoyesis.
 Proporcionan medios de comunicación entre los propios leucocitos así como con otros tipos de células. La mayor
 parte de las citoquinas son pleiotrópicas y expresan múltiples actividades biológicamente concomitantes. Las
 cascadas y redes de citoquinas controlan la respuesta inflamatoria más que la acción de una citoquina específica en
 un tipo de célula específico (12). La pérdida de la respuesta inflamatoria da lugar a concentraciones más bajas de
 45 las señales de activación apropiadas y otros mediadores inflamatorios que dan lugar al cese de la respuesta
 inflamatoria. TNF α es una citoquina proinflamatoria primordial puesto que inicia una cascada de citoquinas y efectos
 biológicos que dan lugar al estado inflamatorio. Por lo tanto, los agentes que presentan TNF α se utilizan en la
 actualidad para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo, el infliximab.

Se cree que las citoquinas proinflamatorias desempeñan un papel principal en la patogénesis de muchas
 50 enfermedades inflamatorias, incluida la Enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Las terapias actuales para el
 tratamiento de la EII se dirigen a la reducción de los niveles de dichas citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-8 y
 TNF α . Dichas terapias pueden también desempeñar un papel significativo en el tratamiento de enfermedades
 inflamatorias sistémicas, tales como la artritis reumatoide.

Las cepas de la presente invención pueden tener una aplicación potencial en el tratamiento de diversas
 55 enfermedades inflamatorias, especialmente si se usan en combinación con otras terapias antiinflamatorias, tales
 como medicamentos Antiinflamatorios no esteroideos (AINE) o Infliximab.

Citoquinas y Cáncer

La producción de citoquinas multifuncionales a lo largo de una gran variedad de tipos de tumores sugiere que se producen
 60 respuestas inflamatorias continuas en pacientes con cáncer. En la actualidad no está claro qué efecto protector tiene esta
 respuesta frente al crecimiento y desarrollo de células tumorales *in vivo*. Sin embargo, dichas respuestas inflamatorias
 podrían afectar negativamente al huésped portador del tumor. En la regulación de la producción de citoquinas y
 proliferación celular dentro del tumor y de tejidos normales (13, 14) hay involucradas complejas interacciones de
 65 citoquinas. Se ha reconocido durante mucho tiempo que la pérdida de peso (caquexia) es la causa más común de muerte
 en pacientes con cáncer y la malnutrición inicial es indicativa de un mal pronóstico. Para que un tumor crezca y se

extienda, debe inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos y degradar la matriz extracelular. La respuesta inflamatoria puede desempeñar papeles significativos en los mecanismos anteriores, contribuyendo por lo tanto al deterioro del huésped y al avance del tumor. Debido a las propiedades antiinflamatorias de *Bifidobacterium longum infantis*, estas cepas de bacterias pueden reducir la velocidad de transformación en células malignas. Además, las bacterias del intestino pueden producir, a partir de compuestos de la dieta, sustancias con actividad genotóxica, carcinógena y promotora de tumores y las bacterias del intestino pueden activar procarcinógenos, haciendo que se transformen en agentes reactivos al ADN (15). En general, las especies de *Bifidobacterium* tienen bajas actividades de enzimas metabolizantes xenobióticas en comparación con otras poblaciones dentro del intestino, tales como bacteroides, eubacteria y clostridia. Por lo tanto, aumentando el número de bacterias *Bifidobacterium* en el intestino se podrían modificar de forma ventajosa los niveles de dichas enzimas.

Suministro de vacuna/medicamento

La mayor parte de organismos patógenos penetran a través de la superficie de las mucosas. La vacunación eficaz de dichos sitios protege frente a la invasión por parte de un agente infeccioso concreto. Las estrategias de vacunación oral se han concentrado, hasta la fecha, en el uso de organismos patógenos vivos atenuados o antígenos encapsulados purificados (16). Las bacterias probióticas, manipuladas para producir antígenos a partir de un agente infeccioso, *in vivo*, pueden proporcionar una alternativa atractiva ya que dichas bacterias se consideran seguras para el consumo humano (estado GRAS).

Estudios en murinos han demostrado que el consumo de bacterias probióticas que expresan antígenos extraños puede provocar respuestas inmunes protectoras. El gen que codifica el Fragmento C de la toxina del tétanos (TTC) fue expresado en *Lactococcus lactis* y se inmunizaron ratones mediante la ruta oral. El sistema fue capaz de inducir títulos de anticuerpos lo suficientemente altos como para proteger a los ratones frente a la exposición a toxinas letales. Además de la presentación de antígenos, los vectores bacterianos vivos pueden producir compuestos bioactivos, tales como citoquinas inmunoestimuladoras, *in vivo*. *L. lactis* secretora de IL-2 o IL-6 humanas y TTC indujo 10-15 veces más títulos de IgG en suero en ratones intranasalmente inmunizados (17). Sin embargo, con esta cepa bacteriana específica, el nivel total de IgA no aumentó con la coexpresión con dichas citoquinas. También se están examinando otras bacterias, tales como *Streptococcus gordonii*, para evaluar su utilidad como vacunas mucosas. *S. gordonii* recombinante colonizadora de la cavidad oral y la cavidad vaginal murinas indujo tanto respuestas mucosales como de anticuerpos sistémicos a antígenos expresados por esta bacteria (18). Por lo tanto, la inmunización oral usando bacterias probióticas como vectores no solo protegería el huésped frente a la infección, sino que puede reemplazar los estímulos inmunológicos que provocaría normalmente el patógeno, contribuyendo por lo tanto a la educación inmunológica del huésped.

Materiales prebióticos

La introducción de organismos probióticos se logra mediante la ingesta del microorganismo en un vehículo adecuado. Sería ventajoso proporcionar un medio que favorezca el crecimiento de dichas cepas probióticas en el intestino grueso. La adición de uno o más oligosacáridos, polisacáridos u otros prebióticos, mejora el crecimiento de las bacterias del ácido láctico en el tracto gastrointestinal. Prebióticos hace alusión a cualquier componente alimenticio no viable específicamente fermentado en el colon por bacterias indígenas consideradas de valor positivo, por ejemplo, bifidobacterias, lactobacilos. Tipos de 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 mejorar el crecimiento del probiótico administrado *in vivo* dando lugar a una ventaja para la salud más pronunciada, y se denomina simbiótico.

Otros ingredientes activos

Se comprenderá que las cepas probióticas se pueden administrar de forma profiláctica o como un método de tratamiento por sí solas o con otro material probiótico y/o prebióticos según se ha descrito anteriormente en la presente memoria. Además, las bacterias se pueden usar como parte de un régimen profiláctico o de tratamiento que usa otros materiales activos tales como los utilizados para tratar la inflamación u otros trastornos, especialmente los que tienen una dinámica inmunológica. Dichas combinaciones se pueden administrar en una sola formulación o como formulaciones aparte administradas al mismo tiempo o en diferentes momentos y utilizando la misma o diferentes rutas de administración.

Las dimensiones y valores descritos en la presente memoria no deben entenderse como estrictamente limitados a los valores numéricos exactos indicados, sino que, salvo que se indique lo contrario, debe considerarse que cada dimensión significa tanto el valor indicado como un intervalo funcionalmente equivalente en torno a ese valor. Por ejemplo, está previsto que una magnitud descrita como "40 mm" signifique "aproximadamente 40 mm."

La mención de documentos no debe ser considerada como una aceptación de que forman parte del estado de la técnica anterior con respecto a la presente invención. En la medida en que cualquier significado o definición de un término en este documento entre en conflicto con cualquier significado o definición del mismo término, prevalecerá el término o definición asignado a dicho término en este documento.

Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones determinadas de la presente invención, resulta obvio para el experto en la técnica que es posible realizar diferentes cambios y modificaciones sin abandonar por ello el ámbito

de la invención. Por consiguiente, las reivindicaciones siguientes pretenden cubrir todos esos cambios y modificaciones contemplados dentro del ámbito de esta invención.

Referencias

1. McCracken V.J. and Gaskins H.R. Probiotics and the immune system. In: *Probiotics a critical review*, Tannock, GW (ed), Horizon Scientific Press, UK. 1999, pág. 85-113.
2. Savage D.C. Interaction between the host and its microbes. In: *Microbial Ecology of the Gut*, Clark and Bauchop (eds), Academic Press, London. 1977, pág. 277-310.
3. Kagnoff M.F. Immunology of the intestinal tract. *Gastroenterol.* 1993; 105 (5): 1275- 80.
4. Lamm M.E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Ann. Rev. Microbiol.* 1997; 51: 311-40.
5. Raychaudhuri S., Rock KL. Fully mobilizing host defense: building better vaccines. *Nat biotechnol*, 1998; 16: 1025-31.
6. Stallmach A., Strober W, MacDonald TT, Lochs H, Zeitz M. Induction and modulation of gastrointestinal inflammation. *Immunol. Today*, 1998; 19 (10): 438-41.
7. Liam O'Mahony, Louise O'Callaghan, Jane McCarthy, David Shilling, Paul Scully, Shomik Sibartie, Eamon Kavanagh, William O. Kirwan, Henry Paul Redmond, John Kevin Collins, and Fergus Shanahan. Differential cytokine response from dendritic cells to commensal and pathogenic bacteria in different lymphoid compartments in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G839-G845, 2006.
8. O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, Murphy S, O'Brien F, et al. Commensal-Induced Regulatory T Cells Mediate Protection against Pathogen-Stimulated NF- κ B Activation. *PLoS Pathog* 2008, 4(8): e1000112.
9. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res.* 2008 Dec; 43(2): 164-74.
10. Crabbe P. A., H. Bazin, H. Eyssen, and J.F. Heremans. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ free intestinal tract. *Int. Arch. Allergy Appl Immunol*, 1968; 34: 362-75.
11. Henderson B., Poole, S and Wilson M. 1998. In "Bacteria-Cytokine interactions in health and disease. Portland Press, 79-130.
12. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 1990;59:783-836.
13. McGee DW, Bamberg T, Vitkus SJ, McGhee JR. A synergistic relationship between TNF- α , IL-1 β , and TGF- β 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial cell line. *Immunology* 1995 Sep;86(1):6-11.
14. Wu S, Meeker WA, Wiener JR, Berchuck A, Bast RC Jr, Boyer CM. Transfection of ovarian cancer cells with tumour necrosis factor alpha (TNF- α) antisense mRNA abolishes the proliferative response to interleukin-1 (IL-1) but not TNF- α . *Gynecol Oncol* 1994 Apr; 53(1):59-63.
15. Rowland I. R. Toxicology of the colon: role of the intestinal microflora. In: Gibson G.R. (ed). *Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology*, 1995, págs 155- 174. Boca Raton CRC Press.
16. Walker, R.I. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization. *Vaccine*, 1994; 12: 387-400.
17. Steidler L., K. Robinson, L. Chamberlain, K.M Scholfield, E. Remaut, R.W.F. Le Page and J.M. Wells. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun.*, 1998; 66:3183-9.
18. Medaglini D., G. Pozzi, T.P. King and V.A. Fischetti. Mucosal and systemic immune responses to a recombinant protein expressed on the surface of the oral commensal bacterium *Streptococcus gordonii* after oral colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995;92:6868-72
19. McCracken V.J. and Gaskins H.R, 'Probiotics a critical review', Horizon Scientific Press, UK 1999, pág.278.
19. Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C, Dennin V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., and Pot, B., Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(2): 236-243.

- 20 Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine* (2009) 15, 930 - 939.
- 5 21 Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* (2007) 132, 2169-2180.
22. Ley RE. Obesity and the human microbiome. *Curr Opin Gastroenterol.* (2010) 1, 5-1 1.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Alimentary Health Limited
 <120> Cepa de Bifidobacteria probiótica
 5 <130> ALIM45/C/WO
 <150> US-12/616.752
 <151> 11/11/2009
 <150> US-61/344.030
 <151> 2010-05-11
 10 <160> 6
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 450
 <212> ADN
 15 <213> Bifidobacterium longum
 <220>
 <221> característica_var
 <222> (48)..(48)
 <223> n es a, c, g, o t
 20 <400> 1
 ttctccgagg tgtgcccc gcgcgctcgca tggcgcatg gcggcgngt tgctggtgtg 60
 gaagacgtcg ttggctttgc cctgccggtc gtgcggtggg tgctggtgtg tatggatgcg 120
 cttttgggct cccggatcgc caccacaggc tttttgcctg gcgcgattcg atgcccgctg 180
 tgcctggggg ccggccgtgt gccggcgcgga tggcggtggc gtgctggtg gcttgagaac 240
 25 tggatagtgg acgagagcaa aacaagagtt tttgaatcct tgttttgctg ttgatttcga 300
 atcgaactct attgttcggt tcgatcgttt tgtgatcatt tttagtgtga tgatttgcg 360
 tctgggaatt tgctagagga atcttgccgc catgcacttt cgtggtgtgt gttgcttgca 420
 agggcgtatg gtggatgcct tgacaccaga 450
 <210> 2
 30 <211> 462
 <212> ADN
 <213> Bifidobacterium longum
 <220>
 <221> característica_var
 35 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_var
 <222> (58)..(58)
 40 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> característica_var
 <222> (454)..(454)
 <223> n es a, c, g, o t

ES 2 595 444 T3

<400> 2
cacacacacc cacgnaagtg tcatggcccc caagtatttc ctctagcaaa ttcccagnac 60
gacaaatcat cactactaaaa atgatcacia aacgatcgaa acgaacaata gagttcgatt 120
5 cgaaatcaac agcaaaaaca agattcaaaa actcttgttt tgctcgcgtc cactatccag 180
ttctcaagcc accacgcacc gccacgccat cgcgccggca cacggccggc ccccaggcac 240
gacgggcatc gaatcgcgcc aggcaaaaag cctgggggtg cgatccggga gcccaaaagc 300
gcatccatac caccgccac ccaccgcacg accggcaggg caaagccaac gacgtcttcc 360
acaccagcaa ccccgccgcc atcgaccat gcgacgcgcg gggcgcacac cgtcggacga 420
10 acatccgact gaattctccg tagaaaggag gtgntcccag ca 462

<210> 3
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia

15 <220>
<223> sintetizada desconocida

<400> 3
gctggatcac ctcttttct 19

20 <210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia

<220>
<223> sintetizada desconocida

25 <400> 4
ctggtgcaa ggcattca 18

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
30 <213> Secuencia

<220>
<223> sintetizada desconocida

<400> 5
ctacggcaag gcgacgctga cg 22

35 <210> 6
<211> 493
<212> ADN
<213> Bifidobacterium longum

<400> 6
40 tgctgggatc acctcctttc tacggagaat tcagtcggat gttcgtccga cgggtgtgctc 60
cccgcgcgtc gcatgggtgcg atggcggcgg ggttgctggt gtggaagacg tcgttggctt 120
tgccctgccg gtcgtgcggt ggggtgcggg tggtatggat gcgcttttg gctcccggat 180
cgccaccca ggctttttgc ctggcgcgat tcgatgcccg tcgtgcctgg gggccggccc 240

ES 2 595 444 T3

	tgtgccggcg cgatggcgtg gcggtgcgtg gtggcctgag aactggatag tggacgcgag	300
	caaaacaaga gtttttgaat ctttgttttg ctggtgattt cgaatcgaac tctattgttc	360
	gtttcgatcg ttttgtgac atttttagtg tgatgatttg tcgtctggga atttgctaga	420
5	ggaatcttgc ggccatgcac tttcgtggtg tgtgttgctt gcaagggcgt atggtggatg	480
	ccttgacacc aga	493

REIVINDICACIONES

1. Una cepa aislada de *Bifidobacterium* NCIMB 41676.
- 5 2. Una cepa de *Bifidobacterium* según la reivindicación 1 en forma de células viables.
3. Una cepa de *Bifidobacterium* según la reivindicación 1 en forma de células no viables.
- 10 4. Una cepa de *Bifidobacterium* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde *Bifidobacterium* se aísla de tejido de biopsia colónica de un individuo humano sano.
5. Una cepa de *Bifidobacterium* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la cepa es significativamente inmunomoduladora después del consumo oral en humanos.
- 15 6. Una formulación que comprende una cepa de *Bifidobacterium* según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una formulación según la reivindicación 6 que además comprende un material probiótico.
8. Una formulación según la reivindicación 6 o 7 que además comprende un material prebiótico.
- 20 9. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 que además comprende un vehículo ingerible.
10. Una formulación según la reivindicación 9 en donde el vehículo ingerible es un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo.
- 25 11. Una formulación según la reivindicación 9 en donde el vehículo ingerible es un producto alimenticio tal como leche acidificada, yogur, yogur congelado, leche en polvo, concentrado de leche, quesos para untar, aderezos o bebidas.
- 30 12. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 que además comprende una proteína y/o un péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, mineral y/o elemento traza.
- 35 13. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 en donde la cepa de *Bifidobacterium* está presente en una cantidad de más de 10^5 ufc por gramo de la formulación.
14. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13 que además comprende un adyuvante.
- 40 15. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 14 que además comprende un componente bacteriano.
16. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 15 que además comprende una entidad medicamentosa.
- 45 17. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 16 que además comprende un compuesto biológico.
18. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17 para protocolos de inmunización y vacunación.
- 50 19. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar en productos alimenticios.
- 55 20. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar como medicamento.
21. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de actividad inflamatoria no deseable.
- 60 22. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la colitis ulcerosa o del síndrome del intestino irritable.
- 65

23. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la artritis reumatoide.
- 5 24. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar en la preparación de agentes bioterapéuticos antiinflamatorios para la profilaxis y/o el tratamiento de actividad inflamatoria no deseable.
- 10 25. Cepas de *Bifidobacterium* según la reivindicación 29 para usar en la preparación de un panel de agentes bioterapéuticos para modificar los niveles de IL-10.
26. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar en la preparación de agentes bioterapéuticos antiinflamatorios para reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias.
- 15 27. Una cepa de *Bifidobacterium* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 18 para usar en la profilaxis y/o el tratamiento de la depresión, trastornos del estado de ánimo, y/o trastornos de ansiedad.

Tránsito de AH1714 en ratones

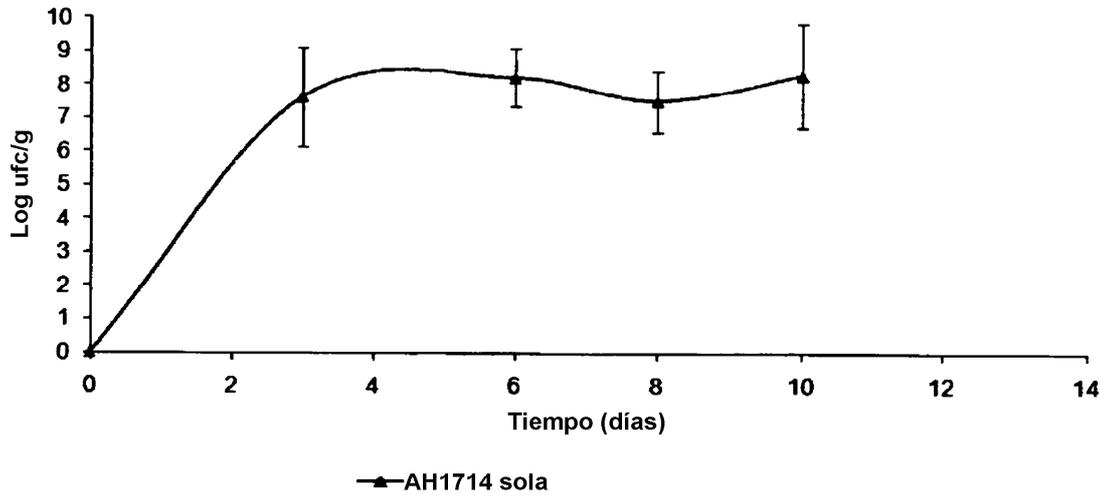


Fig. 1



Fig. 2

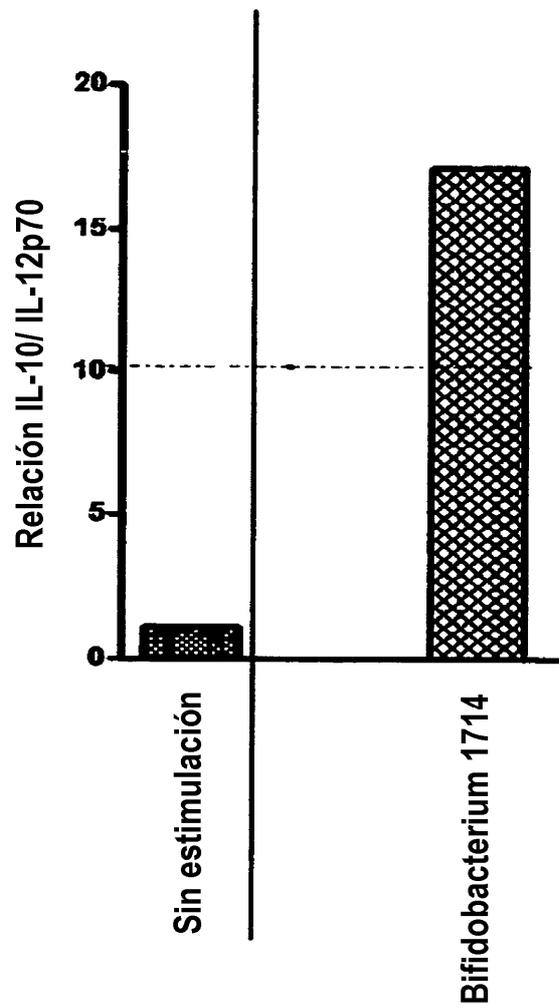


Fig. 3

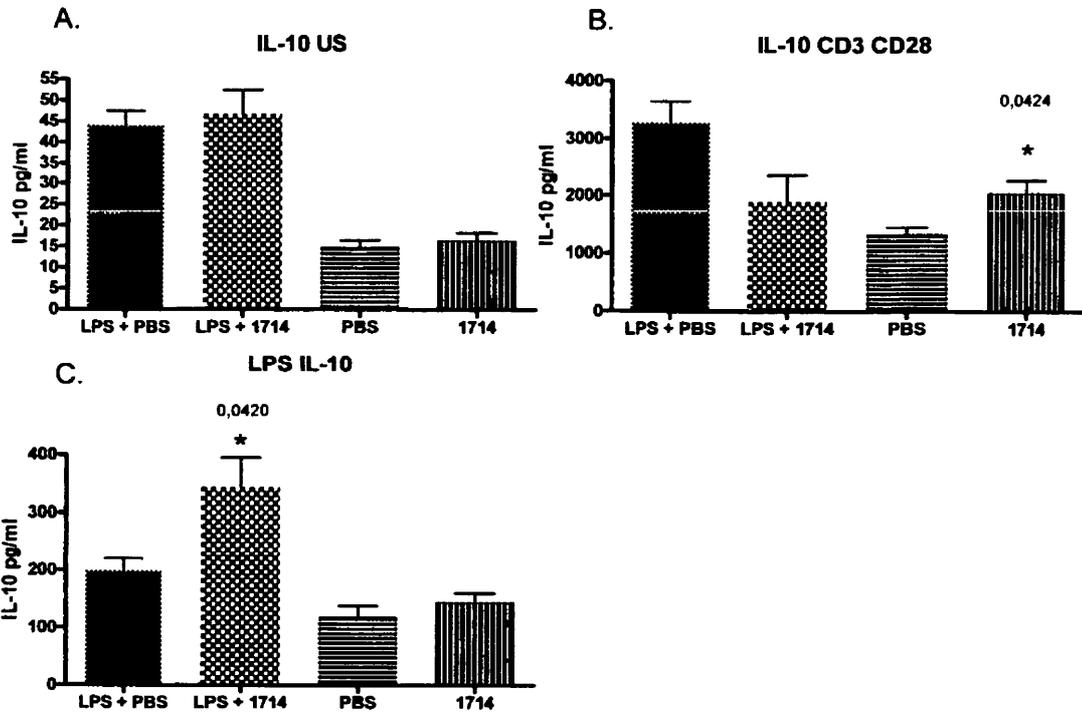


Fig. 4

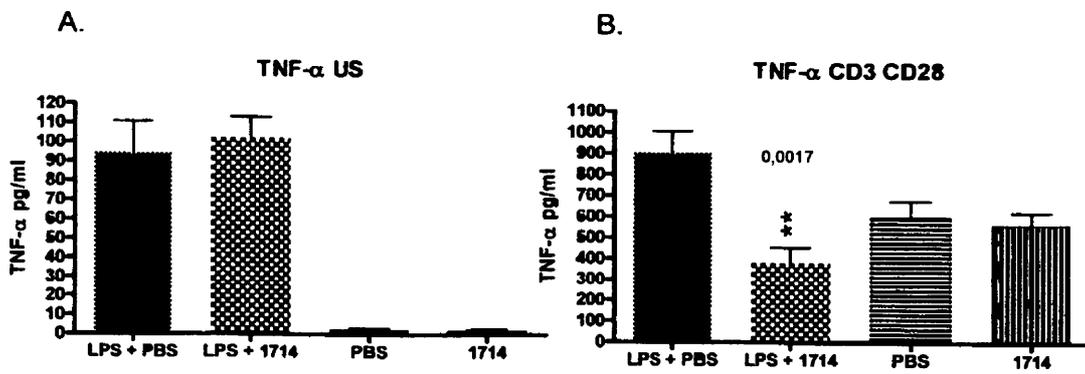


Fig. 5

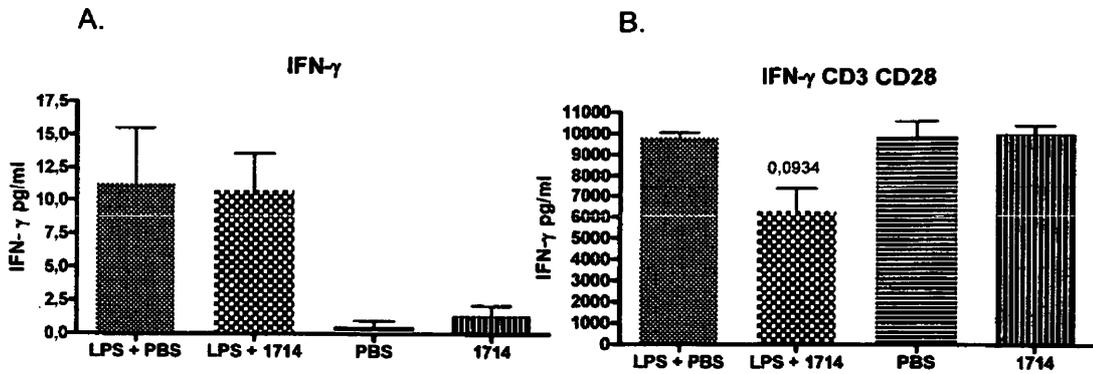


Fig. 6

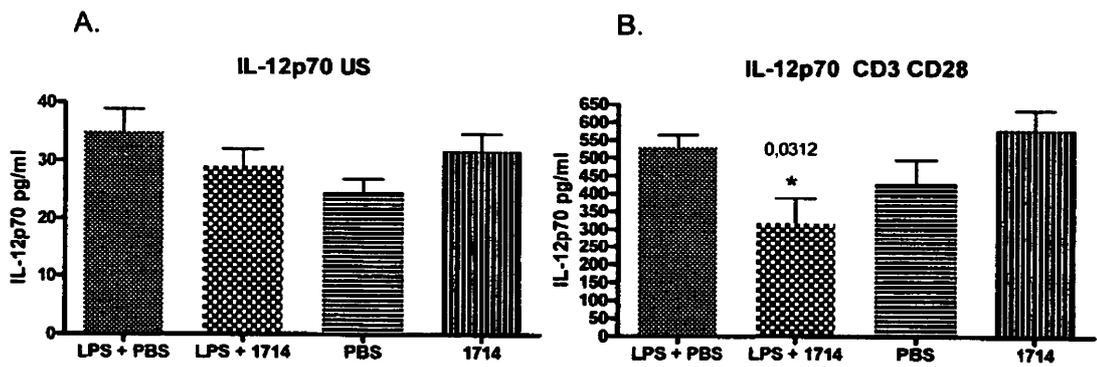


Fig. 7

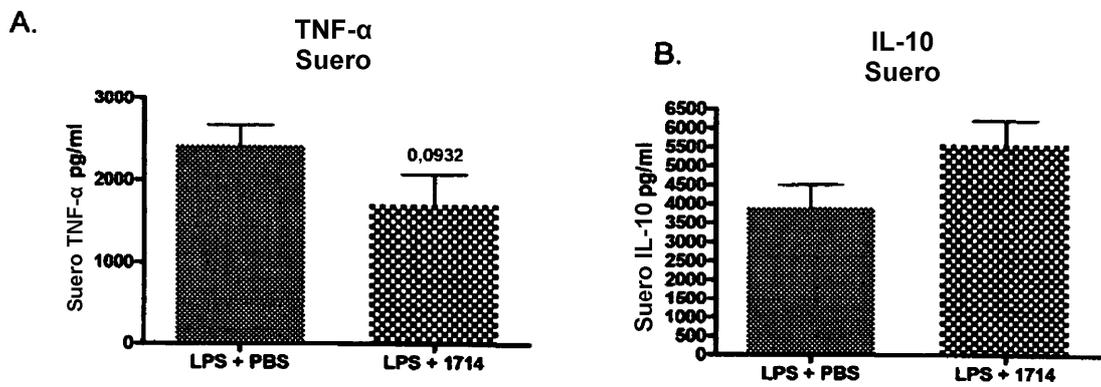


Fig. 8

Actividad de NKfB de bazo a 3 h

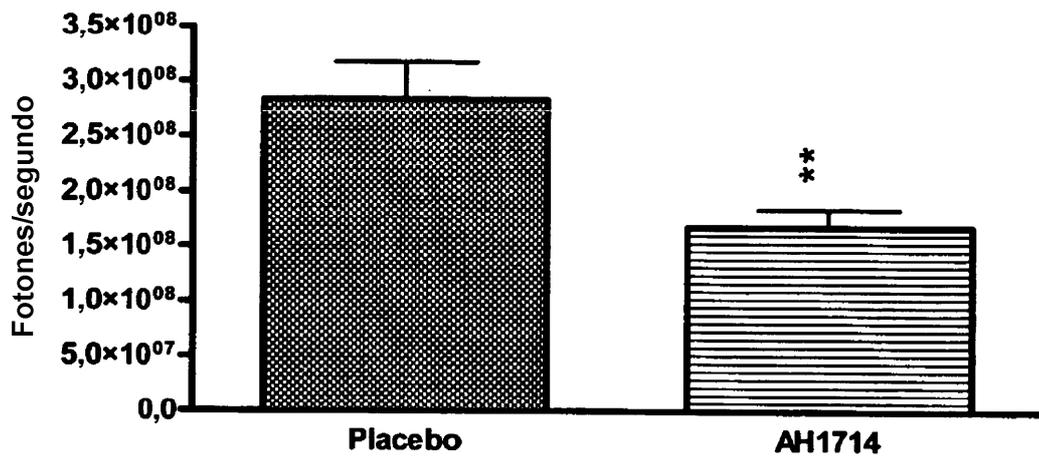


Fig. 9

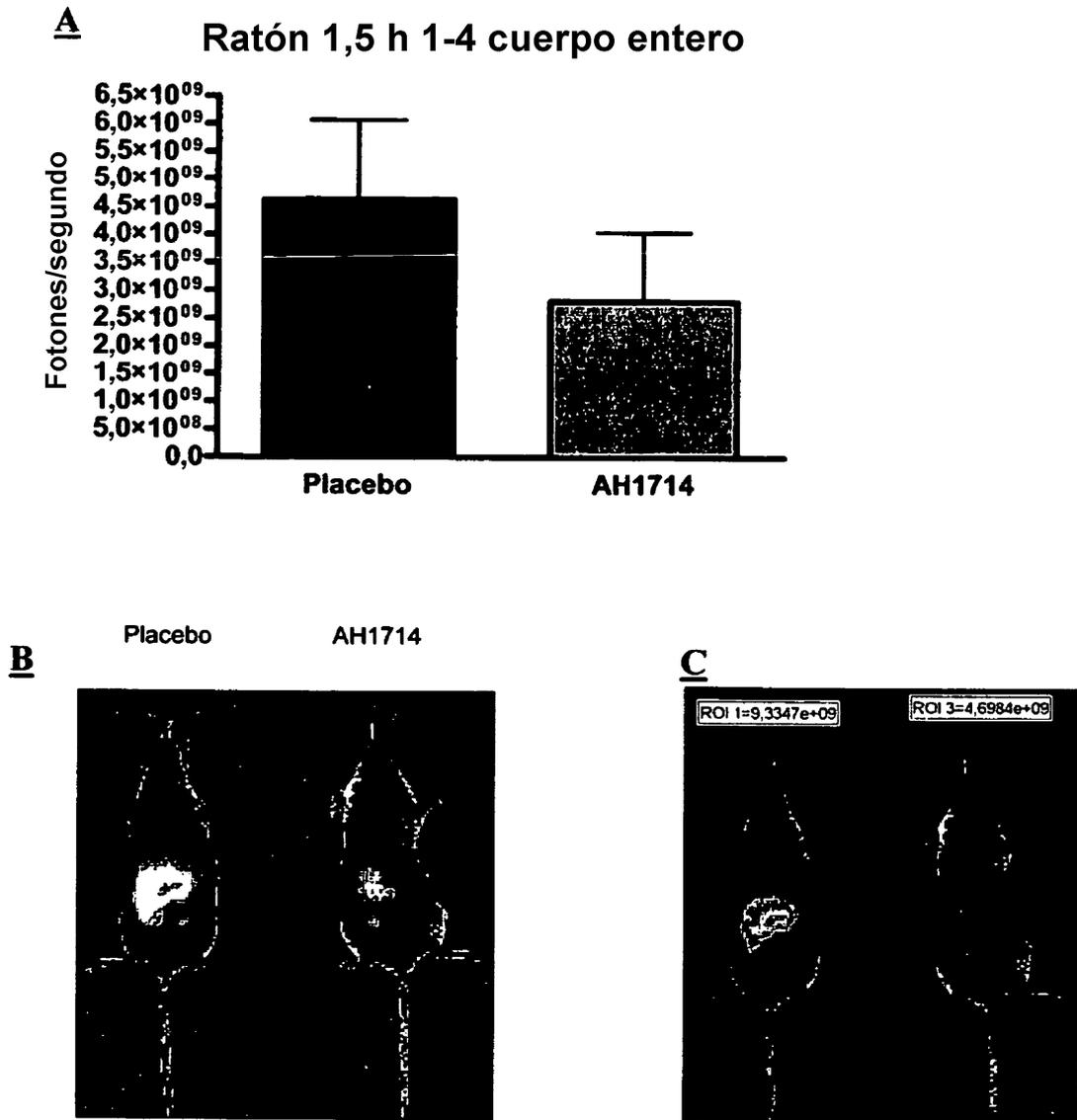


Fig. 10

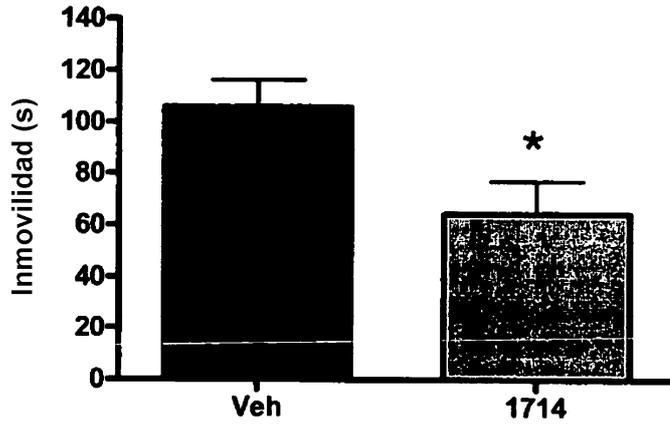


Fig. 11

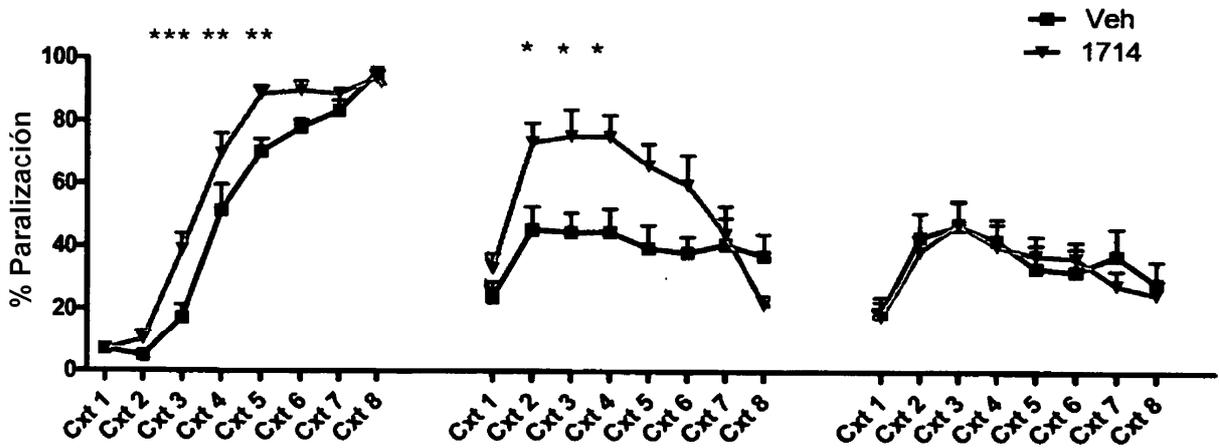


Fig. 12

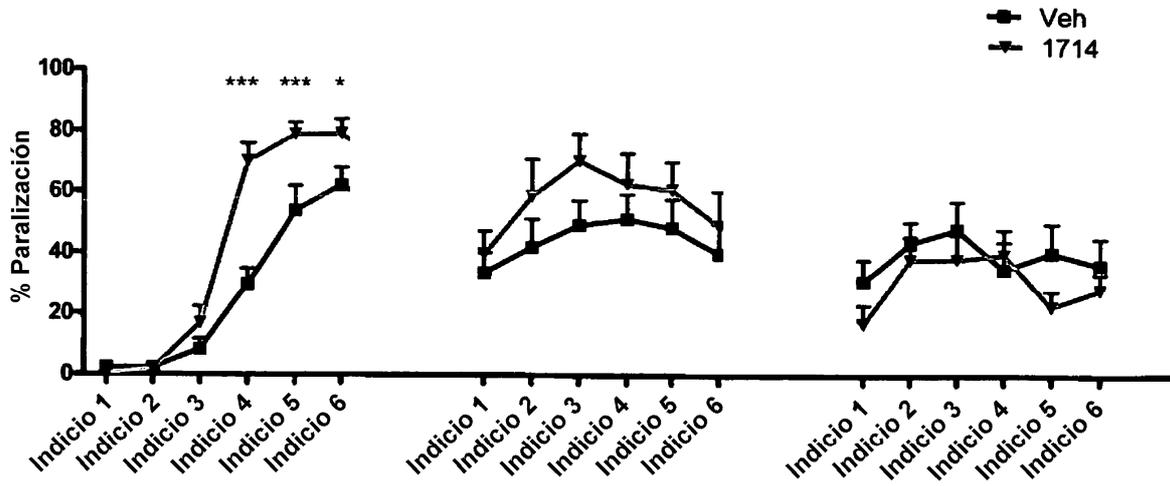


Fig. 13

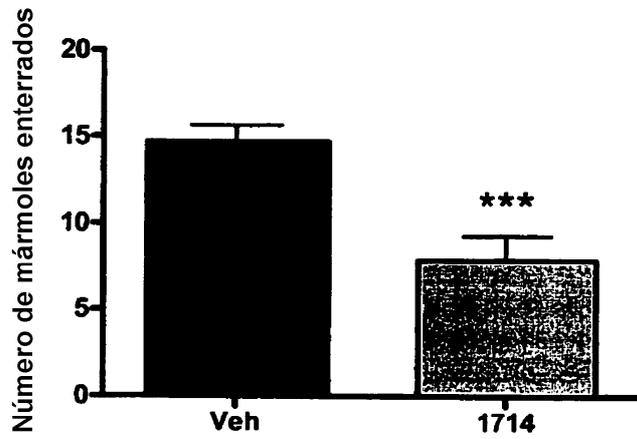


Fig. 14

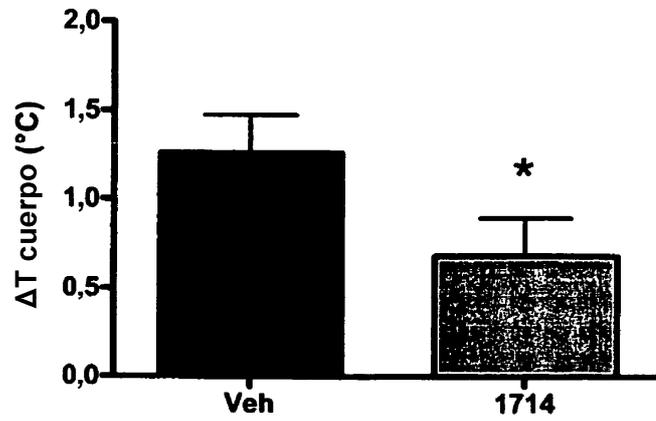


Fig. 15

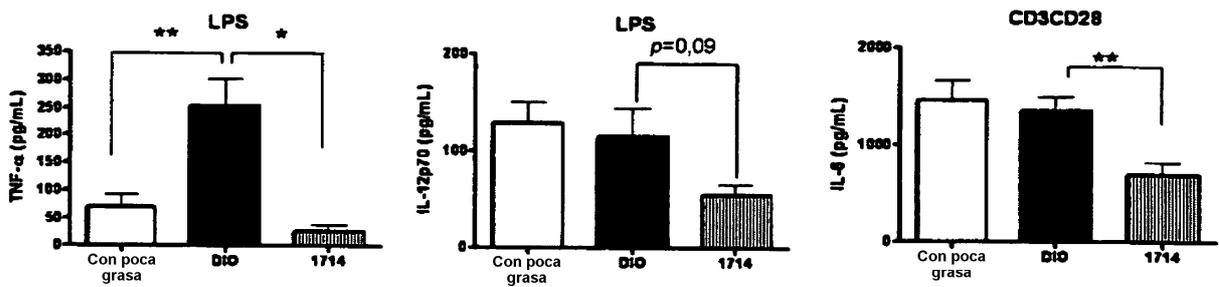


Fig. 16