

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 829**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2010 E 14180970 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2823822**

54 Título: **Cepa de Bifidobacterium**

30 Prioridad:

11.11.2009 US 616752
11.05.2010 IE 20100290

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.05.2017

73 Titular/es:

ALIMENTARY HEALTH LIMITED (50.0%)
2800 Cork Airport Business Park Kinsale Road
Cork, IE y
IAMS EUROPE B.V. (50.0%)

72 Inventor/es:

O'MAHONY, LIAM y
KIELY, BARRY

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 610 829 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*

Introducción

5 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 bacterias intestinales son muy complejos y comprenden aspectos inmunológicos y no inmunológicos (1). Los mecanismos de defensa innatos incluyen el pH bajo del estómago, las sales biliares, la peristalsis, las capas de mucina y compuestos microbianos tales como lisozimas (2). Los mecanismos inmunológicos incluyen agregados linfoides especializados, células M subyacentes, llamadas placas de Peyer, que se distribuyen por todo el intestino delgado y el colon (3). Los antígenos luminales presentes en estos sitios dan lugar a la estimulación de subconjuntos 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 los linfocitos intraepiteliales y las células inmunitarias (5) subyacentes a la lámina propia. Por lo tanto, el hospedador invierte de forma sustancial en la defensa inmunitaria del tracto gastrointestinal. Sin embargo, dado que la mucosa gastrointestinal es la superficie más grande en la cual el hospedador interactúa con el ambiente externo, deben implantarse mecanismos de control específicos para regular la sensibilidad inmunitaria a las 100 toneladas de alimento que el tracto gastrointestinal gestiona durante un lapso de vida media. 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 hospedador. De hecho, la flora intestinal contribuye a defender al hospedador compitiendo con microorganismos potencialmente patógenos ingeridos recientemente.

15 Se cree que las bacterias probióticas son más eficaces cuando se derivan de las especies, o de especies estrechamente relacionadas, con las que se van a tratar. Por lo tanto, existe necesidad de cepas probióticas derivadas de animales de compañía a utilizar en animales de compañía que sean diferentes a las que se derivan de seres humanos.

20 El documento WO 01/90311 divulga microorganismos probióticos aislados de muestras fecales obtenidas de gatos que tienen actividad probiótica. Sin embargo, estas bacterias se obtuvieron de muestras fecales, y pueden no formar parte de la microflora intestinal natural presente en la porción superior del tracto GI.

30 En consecuencia, existe una necesidad de proporcionar cepas de bacterias obtenibles mediante aislamiento de la microflora intestinal natural presente en la porción superior del tracto GI que se adapten concretamente para gatos, y que se hayan seleccionado por sus propiedades y capacidades probióticas para sobrevivir al procesamiento, y para incorporar estas cepas a composiciones que sean adecuadas para su uso.

Afirmaciones de la invención

35 De acuerdo con la invención, se proporciona una cepa aislada de *Bifidobacterium* NCIMB 41675.

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 sujeto felino.

La cepa de *Bifidobacterium* puede ser significativamente inmunomoduladora tras el consumo oral.

40 La invención proporciona también una formulación que comprende una cepa de *Bifidobacterium* como se describe en el presente documento.

45 La formulación puede comprender además un material prebiótico. La formulación puede comprender además un transportador ingerible. El transportador ingerible puede ser un transportador farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo. El transportador ingerible puede ser un producto alimentario tal como una suspensión oleosa, una composición basada en leche, queso, una composición basada en manteca de cacao, una salsa y/o una composición basada en yogur.

La invención proporciona también un producto alimentario que comprende una cepa de *Bifidobacterium* o una formulación, como se describe en el presente documento.

50 El producto alimentario puede ser un producto alimentario seco. El producto alimentario puede ser un producto alimentario húmedo. El producto alimentario puede comprender además un material prebiótico. El producto alimentario puede comprender además un material prebiótico. El producto alimentario puede ser un pienso para animal de compañía.

La invención proporciona también una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso como medicamento.

5 Se describe también en el presente documento una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de actividad inflamatoria indeseable.

Se describe también en el presente documento una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de actividad inflamatoria gastrointestinal indeseable.

10 La invención proporciona también una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos autoinmunitarios debidos a una actividad inflamatoria indeseable.

La invención proporciona también una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad diarreica debida a una actividad inflamatoria indeseable.

15 Se describe también en el presente documento una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso en la regulación o en la mejora del sistema inmunitario de animales de compañía.

20 La invención proporciona también una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en animales de compañía.

La invención proporciona también una cepa de *Bifidobacterium*, o una formulación, o un producto alimentario como se describe en el presente documento para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de la inflamación en animales de compañía.

Los inventores describen la cepa AH121A de *Bifidobacterium* (NCIMB 41675) o mutantes o variantes de la misma.

25 La cepa se puede obtener mediante aislamiento a partir de tracto gastrointestinal de felino resecado y lavado.

El mutante puede ser un mutante genéticamente modificado. La variante puede ser una variante de origen natural de *Bifidobacterium*.

La cepa puede ser un probiótico. Puede estar en forma de un cultivo biológicamente puro.

Se describe también una cepa aislada de *Bifidobacterium* NCIMB 41675.

30 Las cepas de *Bifidobacterium* pueden estar en forma de células viables. Como alternativa, Las cepas de *Bifidobacterium* pueden estar en forma de células no viables.

35 El uso general de bacterias probióticas puede estar en forma de células viables. Sin embargo, puede extenderse también a células no viables tales como cultivos muertos o composiciones que contienen factores beneficiosos expresados por las bacterias probióticas. Esto puede incluir también microorganismos muertos térmicamente o microorganismos muertos por exposición a pH alterado o sometiéndolos a presión. Con células no viables, la preparación del producto puede ser más sencilla, las células se pueden incorporar fácilmente a 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 muertas térmicamente como un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención del crecimiento tumoral, como se describe en la patente de EE.UU. N.º US4347240.

40 Los inventores describen también usos de las bacterias obtenibles mediante el aislamiento de células resecadas y lavadas de tracto gastrointestinal de felino para mantener y mejorar la salud de los animales de compañía, y composiciones que comprenden bacterias acidolácticas.

45 Los inventores describen una formulación que comprende la cepa de *Bifidobacterium* descrita en el presente documento, la formulación puede incluir otro material probiótico, la formulación puede incluir un material prebiótico.

50 *Bifidobacterium* es un microorganismo comensal. Se han aislado de flora microbiana en el interior del tracto gastrointestinal humano. El sistema inmunitario del interior del tracto gastrointestinal no puede tener una reacción pronunciada a miembros de esta flora, puesto que la actividad inflamatoria resultante también destruiría células hospedadoras y la función tisular. Por lo tanto, existe(n) algún(unos) mecanismos por los que el sistema inmunitario puede reconocer miembros no patógenos comensales de la flora gastrointestinal como diferentes de los organismos patógenos. Esto asegura que el daño producido a los tejidos hospedadores quede restringido y que se continúe manteniendo una barrera defensiva.

A lo largo de la memoria descriptiva los términos mutante, variante y mutante genéticamente modificado incluyen una cepa de Bifidobacterias cuyas propiedades genéticas y fenotípicas están alteradas en comparación con la cepa precursora. La variante natural de *Bifidobacterium longum* incluye las actividades espontáneas de las propiedades diana aisladas selectivamente. La alteración deliberada de las propiedades de la cepa precursora se lleva a cabo mediante tecnologías de manipulación genética convencionales (*in vitro*), tales como disrupción génica, transferencia conjugativa, etc. La modificación genética incluye la introducción de secuencias de ADN exógeno y/o endógeno en el genoma de una cepa de Bifidobacterias, por ejemplo, mediante inserción en el genoma de la cepa bacteriana mediante vectores, incluyendo ADN plásmido, o bacteriófagos.

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.

Los términos mutante, variante y mutante genéticamente modificada también incluyen una cepa de Bifidobacterium 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, resistencia a antibióticos.

Una persona experta en la técnica apreciará que se pueden identificar cepas mutantes o variantes de Bifidobacterias mediante análisis de homología de secuencias de ADN con la cepa precursora. Las cepas de Bifidobacterias que tienen una identidad de secuencia próxima a la cepa precursora se consideran cepas mutantes o variantes. Una cepa de bifidobacterias con una identidad de secuencia (homología) de 96 % o más, tal como 97 % o más, o 98 % o más, o 99 % o más con la secuencia de ADN precursora se puede considerar un mutante o una variante. Se puede determinar la homología de la secuencia utilizando el programa "BLAST" de algoritmo de homología en línea, disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Los mutantes de la cepa precursora incluyen cepas de Bifidobacterias derivadas que tienen al menos un 85 % de homología de la secuencia, tal como al menos un 90 % de homología de la secuencia, o al menos un 95 % de homología de la secuencia con la secuencia polinucleotídica del espaciador intergénico 16s - 23s de la cepa precursora. 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 fotografía de *B. longum* AH121A creciendo sobre una placa de Agar Rojo Congo;

la Fig. 2 es un diagrama de barras que ilustra la relación IL-10:IL-12p70 para las PBMC estimuladas con la cepa *Bifidobacterium longum* 121A (*Bifidobacterium* 121 A);

La Fig. 3. es una gráfica que ilustra la supervivencia de la cepa 121A en un ambiente de pH bajo. Las cepas se estimularon a pH 2,5 durante 6 horas y se evaluó su supervivencia utilizando recuentos de placas;

Las Figs. 4 a 6 son gráficas de secreciones de citoquinas procedentes de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) cultivadas *in vitro*;

la Fig. 7A a E son gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de IL-10 en PBMC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121A y Bif 35624;

la Fig. 8A a D gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de IL-1 β en PBMC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121A y Bif 35624;

la Fig. 9A a D son gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de IL-6 en PBMC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121A y Bif 35624;

la Fig. 10A a D son gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de IL-8 en PBMC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121A y Bif. 35624;

la Fig. 11A a D son gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de IL-12 p70 en PBMC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121A y Bif. 35624;

la Fig. 12A a E son gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de TNF- α en PMBC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121A y Bif. 35624;

la Fig. 13A a C son gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de IFN- γ en PMBC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121 A y Bif. 35624;

5 la Fig. 14A a D son gráficas de líneas que muestran el perfil de inducción de CSF en PBMC tras estimulación *in vitro* con concentraciones crecientes de 121A y Bif. 35624;

la Fig. 15 es un diagrama de barras que muestra el efecto de 121A sobre la secreción de IL-10 e IL-12 p70 por las células dendríticas de tipo mielóide humanas; y

10 la Fig. 16 es un diagrama de barras que muestra el efecto de 121A sobre linfocitos T CD4⁺ humanos no expuestos a tratamiento anteriormente.

Descripción detallada de la invención

Se depositó una cepa de *Bifidobacterium longum* AH121A en las 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 41675.

15 Se depositó de la cepa *Bifidobacterium longum* UCC 35624 en las National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (NCIMB) Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido el 13 de enero de, 1999, y se registró con el número de registro NCIMB 41003.

Bifidobacterium longum puede ser un mutante genéticamente modificado o puede ser una variante de origen natural del mismo.

20 Preferentemente, el *Bifidobacterium longum* está en forma de células viables.

Como alternativa, el *Bifidobacterium longum* puede estar en forma de células no viables.

Como se usa en el presente documento, "animal de compañía" significa un animal doméstico. Preferentemente, "animal de compañía" significa un felino doméstico (gato), cánido (perro), un conejo, hurón, caballo, vaca, o similares. Más preferentemente, "animal de compañía" significa un felino doméstico.

25 Cepas de Bifidobacterias acidolácticas

El primer aspecto de la presente invención comprende una cepa de bacterias acidolácticas del género *Bifidobacterium* obtenible mediante aislamiento de tracto gastrointestinal de felino resecado y lavado que tiene actividad probiótica en animales. Los probióticos son microorganismos, tanto viables como muertos, composiciones procesadas de microorganismos, sus constituyentes tales como proteínas o hidratos de carbono, o fracciones purificadas de fermentos bacterianos que influyen beneficiosamente a un hospedador. 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. Puede incluir microorganismos térmicamente muertos, o microorganismos muertos por exposición a pH alterado o sometido a presión. Para los fines de la presente invención, se pretende además que "probióticos" incluya los metabolitos generados por los microorganismos de la presente invención durante la fermentación, si no se indican por separado. Estos metabolitos pueden liberarse al medio de fermentación, o pueden almacenarse en el microorganismo. Como se usa en el presente documento, "probiótico" incluye también bacterias, homogenados bacterianos, proteínas bacterianas, extractos bacterianos, sobrenadantes de fermentos bacterianos, y mezclas de los mismos, que llevan a cabo funciones beneficiosas en el animal hospedador cuando se administran a una dosis terapéutica.

40 Se ha descubierto que las bacterias acidolácticas del género *Bifidobacterium* obtenibles mediante aislamiento directo del tracto GI resecado y lavado de mamíferos se adhieren al tracto gastrointestinal tras la alimentación de células bacterianas viables, y son también significativamente inmunomoduladoras cuando se alimentan a animales en forma viable, no viable o fraccionada. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que las Bifidobacterias obtenibles mediante aislamiento de tracto GI resecado y lavado se asocian estrechamente con los tejidos mucosales del intestino. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna más, se cree que esto da como resultado que las Bifidobacterias probióticas de la presente invención generen respuestas alternativas en el hospedador que den lugar a la acción probiótica. Se ha descubierto que las bacterias probióticas obtenibles mediante aislamiento del tracto GI resecado y lavado pueden modular el sistema inmunitario del hospedador mediante interacción directa con el epitelio de la mucosa, y las células inmunitarias del hospedador. Esta inmunomodulación, junto con el mecanismo tradicional de acción asociado con bacterias probióticas, es decir, la prevención de la adherencia de patógenos al intestino mediante oclusión y competición por los nutrientes, da lugar a que las Bifidobacterias de la presente invención sean muy eficaces como organismos probióticos.

El *Bifidobacterium* de la presente invención, obtenible mediante aislamiento de tracto GI de felino resecado y lavado, tiene actividad antimicrobiana *in vitro* contra numerosas cepas/especies bacterianas patógenas. Sin pretender quedar

vinculado por teoría alguna, se piensa que esta actividad antimicrobiana *in vitro* es indicadora de actividad probiótica potencial *in vivo* en animales, preferentemente animales de compañía tales como felinos. Las bacterias acidolácticas de la presente invención tienen preferentemente actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* o *Escherichia coli*, más preferentemente, una mezcla de estas cepas, más preferentemente, además, todas estas cepas.

Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que la actividad antimicrobiana de las bacterias acidolácticas de la presente invención puede ser el resultado de numerosas acciones diferentes por las bacterias acidolácticas en el presente documento. Se ha sugerido previamente en la técnica que varias cepas de bacterias aisladas de muestras fecales ejercen su efecto probiótico en el tracto GI tras el consumo oral evitando la unión de organismos patógenos a la mucosa del intestino mediante oclusión. Esto requiere el consumo oral de células bacterianas "vivas" o viables a fin de que se establezca una colonia de bacterias en el intestino. Sin embargo, se cree que las Bifidobacterias de la presente invención, obtenible mediante aislamiento de tracto GI de felino ressecado y lavado, ejerciendo a la vez algún efecto probiótico debido a la oclusión si se administran en una forma viable, pueden suministrar un efecto probiótico sustancial tanto en forma viable como no viable debido a la producción durante la fermentación *in vitro* de una sustancia o sustancias que bien inhiben el crecimiento o destruyen microorganismos patógenos, y/o alteran la competencia inmunitaria del hospedador animal. Esta forma de actividad probiótica es deseable, dado que las bacterias de la presente invención pueden administrarse tanto como cultivos viables como no viables de productos de fermentación purificados y suministrar además un efecto terapéutico beneficioso al animal hospedador.

Preferentemente, las bacterias acidolácticas de la presente invención son capaces de mantener la viabilidad tras el tránsito a través del tracto GI. Esto es deseable para los cultivos vivos de bacterias que se ingieren por vía oral, y para que se produzca la colonización en los intestinos y que siga el tránsito hacia el intestino a través del esófago y el estómago. La colonización del intestino por las bacterias acidolácticas de la presente invención es deseable para que se administren beneficios probióticos a largo plazo al hospedador. La dosificación oral de células no viables o aislados purificados de las mismas induce beneficios temporales, pero dado que las bacterias no son viables, no pueden crecer, y suministrar de forma continua un efecto probiótico *in situ*. Como resultado, esto puede requerir dosificar con regularidad al hospedador a fin de mantener los beneficios para la salud. Por el contrario, las células viables que son capaces de sobrevivir al tránsito gástrico en forma viable, y posteriormente colonizar adhiriéndose y proliferando en la mucosa intestinal son capaces de proporcionar efectos probióticos de forma continua *in situ*. Por lo tanto, es preferible que las bacterias acidolácticas de la presente invención mantengan la viabilidad tras la suspensión en un medio que tiene un pH de 2,5 durante 1 hora. Como se usa en el presente documento, "mantener la viabilidad" significa que al menos un 25 % de las bacterias inicialmente suspendidas en el medio de ensayo son viables utilizando el procedimiento del recuento de placas conocido por los expertos en la técnica. Preferentemente, "mantener la viabilidad" significa que al menos el 50 % de las bacterias inicialmente suspendidas son viables. Es deseable que la bacteria acidoláctica de la presente invención mantenga la viabilidad tras la exposición a pH bajo ya que esto imita la exposición a los jugos gástricos en el estómago y el intestino superior *in vivo* tras el consumo oral en animales.

La cepa de bacterias acidolácticas del género *Bifidobacterium* obtenible mediante aislamiento de tracto gastrointestinal de felino ressecado y lavado se puede usar para proporcionar un beneficio probiótico tras el consumo oral en animales, preferentemente animales de compañía o seres humanos. Este beneficio probiótico mantiene y mejora generalmente la salud global del animal. Los ejemplos no limitantes de salud y fisiología animal que benefician, tanto en el alivio terapéutico de los síntomas, como en la prevención de la enfermedad mediante la profilaxis incluyen trastornos inflamatorios, inmunodeficiencia, enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de intestino irritable, cáncer (particularmente aquellos de los sistemas gastrointestinales e inmunitarios), enfermedad diarreica, diarrea asociada a antibióticos, apendicitis, trastornos autoinmunitarios, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, artritis reumatoide, artritis, movilidad de la articulación, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, infecciones bacterianas, infecciones víricas, infecciones fúngicas, enfermedad periodontal, enfermedad urogenital, trauma asociado a cirugía, enfermedad metastásica inducida por cirugía, septicemia, pérdida de peso, ganancia de peso, acumulación excesiva de tejido adiposo, anorexia, control de la fiebre, caquexia, cicatrización de heridas, úlceras, infección de la barrera intestinal, alergia, asma, trastornos respiratorios, trastornos circulatorios, enfermedad cardíaca coronaria, anemia, trastornos del sistema de coagulación de la sangre, enfermedades renales, trastornos del sistema nervioso central, enfermedad hepática, isquemia, trastornos nutritivos, osteoporosis, trastornos endocrinos, y trastornos epidérmicos, se prefiere el tratamiento del tracto gastrointestinal, incluyendo el tratamiento o prevención de la diarrea; regulación del sistema inmunitario, preferentemente el tratamiento o la prevención de la enfermedad y la inflamación autoinmunitaria; mantenimiento o mejora de la salud de la piel y/o el sistema de revestimiento, preferentemente tratando o evitando la enfermedad atópica de la piel; mejorando o reduciendo los efectos del envejecimiento, incluyendo los niveles de conciencia y actividad mentales; previniendo los trastornos asociados con el eje hipotálamo-pituitario-adrenal, y mejorando la salud de la articulación por lo cual mejora la movilidad.

El tratamiento de los trastornos divulgados anteriormente puede medirse usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los trastornos inflamatorios incluyendo la enfermedad y la inflamación autoinmunitaria pueden detectarse y vigilarse utilizando ensayos de la función inmunitaria *in vivo* tales como la blastogénesis de linfocitos, la actividad de linfocitos citolíticos naturales, respuesta de anticuerpos a vacunas, hipersensibilidad de tipo retardado, y mezclas de los mismos. Dichos procedimientos se describen de forma breve en el presente documento, pero son bien conocidos por los expertos en la materia.

1. Blastogénesis de linfocitos: Este ensayo mide la respuesta proliferativa *in vitro* de linfocitos aislados a partir de sangre completa reciente de animales de ensayo y control a diversos mitógenos y es una medida de la función global de los linfocitos T y B. En resumen, se aislaron mononucleocitos de sangre periférica (PBMC) a partir de sangre completa mediante procedimientos de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque conocidos por los expertos en la materia. Los PBMC aislados se lavaron dos veces en medio de células RPMI1640 suplementado con HEPES, L-glutamina y penicilina/estreptomicina. Las células lavadas se volvieron a suspender en RPMI 1640, se contaron, y la densidad celular se ajustó adecuadamente. Las 2×10^5 células se expusieron a un intervalo de concentraciones (0,1 µg/ml a 100 µg/ml) de diversos mitógenos, algunos ejemplos de los cuales incluyen mitógeno de hierba carmín (Gibco), fito-hemaglutinina (Gibco) y conconavalina A (Sigma) por triplicado durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5 % con suero de feto de bovino al 10 % (Sigma). A las 54 horas, las células se sometieron a pulso con 1 µCi de H-timidina, y se recogieron las células y se leyeron mediante recuento por centelleo en un TopCount NXT a las 72 horas.

2. Actividad de los linfocitos citolíticos naturales: Como se describe en el documento US 6.310.090, este ensayo mide la actividad efectora *in vitro* de los linfocitos citolíticos naturales aislados de sangre completa reciente de animales de ensayo y control. Los linfocitos citolíticos naturales son un componente de la función inmunitaria innata de un mamífero. Se utilizaron células de adenocarcinoma de tiroides de felino como células diana en la evaluación de la actividad citotóxica de los linfocitos NK. Se mostró previamente que esta línea de células era susceptible a la muerte por los linfocitos NK de felino. Se cultivaron células diana en un matraz T75 con 20 ml de medio esencial mínimo (MEM; Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) suplementado con suero de feto de ternera al 10 % (FCS), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Cuando llegaron a la confluencia, las células diana se tripsinizaron, se lavaron 3 veces y se volvieron a suspender a 5×10^5 células/ml en medio completo (RPMI-1640+ FCS al 10 % +100 U/ml de penicilina +100 µg/ml de estreptomicina). Se pipetearon alícuotas de 100 µl por triplicado en placas de 96 pocillo de fondo en U (Costar, Cambridge, Mass.) y se incubaron durante 8 horas para permitir la adherencia celular. A continuación se añadieron linfocitos (células efectoras; 100 µl) aislados mediante separación de Ficoll-Hypaque (como se ha descrito anteriormente) a las células diana para proporcionar una relación de célula efectora/diana (E: T) de 10:1. Después de 10 h de incubación a 37°C, se añadieron 20 µl de un sustrato que contenía 5 µg of bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). La mezcla se incubó durante 4 horas a 37°C. tras lo cual, el MTT no metabolizado se eliminó mediante aspiración. Los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 200 µl de etanol al 95 %. La densidad óptica se midió a 570 nm usando un lector de microplacas. Se calculó el porcentaje de lisis específica de los linfocitos NK como sigue: Citotoxicidad específica (%) = $100 \times (1 - [(DO \text{ de las células diana y las células efectoras} - DO \text{ de las células efectoras}) / (DO \text{ de las células diana})])$

3. Respuesta de anticuerpos a vacunas: Se proporcionó a los sujetos de ensayo una matriz (hasta de 5) de vacunas después de al menos 12 semanas de alimentación con probióticos o de control. Las vacunas pueden ser una mezcla de vacunas novedosas y vacunas redundantes. Los ejemplos no limitantes de matrices de vacunas que se pueden usar incluyen mezclas de vacunas preparadas por Fort Dodge Animal Health. Los ejemplos no limitantes de vacunas adecuadas para su uso en el presente documento incluyen el moquillo felino, adenovirus, coronavirus, síndrome paragripal, y parvovirus. Los antecedentes de vacunas de los sujetos de ensayo determinarán las vacunas que se van a usar. Se midieron en sangre los anticuerpos específicos de las vacunas proporcionadas durante 3 semanas y se compararon la longitud y la resistencia de las respuestas en los grupos con alimentación control y con alimentación de probiótico. 4. Hipersensibilidad de tipo retardado: Un procedimiento no invasivo *in vivo*, para evaluar el estado del sistema inmunitario. Este ensayo comprende administrar una inyección intradérmica del mitógeno policlonal Fitohemaglutinina (PHA) en combinación con una vacuna multivalente de glóbulos rojos de oveja, histamina (100 µl de 0,0275 g/ de Histamina Fosfato; Greer, Lenoir, NC) o PBS (100 µl de Solución salina tamponada con fosfato, 8,5 g/l; Sigma). Se registró la respuesta inmunitaria al antígeno como espesor del pliegue cutáneo usando calibres a intervalos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Un aumento en el espesor del pliegue cutáneo es indicativo de una respuesta de hipersensibilidad mayor que debería disminuir mediante el tratamiento con las bacterias de la presente invención.

Los procedimientos adicionales para determinar el efecto de las bacterias Bifidobacterium de la presente invención se describen en los documentos US 6.133.323 y US 6.310.090.

Además, puede determinarse la mejora de los efectos del envejecimiento utilizando absorptometría de rayos x dual o barrido CT para medir la composición del cuerpo, incluyendo la masa de la grasa corporal, la masa exenta de grasa y el contenido mineral óseo. De manera similar, este procedimiento puede utilizarse para determinar cambios en la anatomía tales como pérdida de peso o densidad ósea en sujetos tras infección.

Las Bifidobacterias de la presente invención pueden también utilizarse en un procedimiento para reducir los niveles de estrés en animales de compañía. Pueden medirse las concentraciones de las hormonas del estrés incluyendo epinefrina, norepinefrina, dopamina, cortisol, proteína C reactiva y otras proteínas en fase aguda para determinar los niveles de estrés y su reducción o mantenimiento. Estas hormonas son biomarcadores de estrés reconocidos y se pueden medir fácilmente utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Adicionalmente, la medida directa del tamaño adrenal como un marcador *in vivo* de la actividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal puede medirse mediante formación de imágenes CT.

Más aún, el mantenimiento o mejora de la salud de la piel y/o el sistema de revestimiento de los animales de compañía, incluyendo la enfermedad atópica de la piel, puede medirse utilizando las evaluaciones de la piel y el revestimiento llevadas a cabo por dos individuos entrenados. Los ejemplos de los criterios examinados durante dichas evaluaciones incluyen: a) Índice de desprendimiento: Se asigna un índice de protección a cada sujeto de ensayo recogiendo pelo durante un procedimiento de cepillado normalizado. Se recoge el pelo y se pesa, y se comparan los sujetos del control y del ensayo, b) Evaluaciones subjetivas de revestimiento de la piel: Panelistas entrenados evaluaron subjetivamente la piel y la condición de revestimiento evaluando el desprendimiento, la caspa, el brillo, la uniformidad, suavidad y densidad, c) Evaluación funcional de la piel: Se puede evaluar la función de barrera de la piel frotando la superficie de la piel con una gamuza humedecida en acetona. Esta técnica perturba, eficazmente la barrera de la piel eliminando las capas de células individuales y las fracciones lipídicas asociadas del estrato córneo. Se cuantificó la perturbación de la barrera midiendo el aumento en la pérdida de agua transepidérmica (TEWL) y el grado de enrojecimiento del sitio lesionado utilizando los procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Se obtuvieron puntuaciones del enrojecimiento (eritema) utilizando la cámara y el sistema de iluminación anteriormente descritos. Las lecturas TEWL y las puntuaciones del enrojecimiento se obtuvieron inmediatamente antes y después de la perturbación, y los criterios de valoración a las cinco y las 24 horas para evaluar las propiedades protectoras y de cicatrización de la piel.

Además, el tratamiento de la infección gastrointestinal en animales de compañía puede comprender mejorar la ecología microbiana de los animales de compañía. La mejora de la ecología microbiana de los animales de compañía comprende preferentemente la reducción de los niveles de bacterias patógenas en las heces de los animales de compañía. Los niveles de bacterias patógenas presentes en las heces de los animales de compañía se pueden enumerarse utilizando el procedimiento de recuento en placa convencional conocidos del experto en la técnica. Más preferentemente, las bacterias patógenas se seleccionan del grupo que consiste en Clostridia, Escherichia, Salmonella, bacteroides y mezclas de los mismos. Los ejemplos no limitantes de cepas adecuadas de bacterias patógenas incluyen *C. perfringens*, *C. difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y mezclas de los mismos.

El procedimiento para usar las bacterias de la presente invención también puede incluir el tratamiento, tanto profiláctico como terapéutico del tracto urinario de mamíferos, preferentemente animales de compañía. Los ejemplos no limitantes de tratamientos del tracto urinario incluyen el tratamiento o la prevención de infecciones del tracto urinario, tratamiento y prevención de la enfermedad renal, incluidas las piedras del tracto urinario, el tratamiento o la prevención de infecciones de la vejiga y similares. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que las bacterias de *Bifidobacterium* de la presente invención son de utilidad en la prevención de estas dolencias como resultado de su capacidad para degradar el ácido oxálico, como se demuestra *in vitro*. El ácido oxálico es un subproducto del metabolismo urinario que se puede formar precipitados insolubles que dan como resultado infecciones del riñón, vejiga y otras partes del tracto urinario. Al degradar el ácido oxálico, y por tanto evitar potencialmente su precipitación y acumulación en el tracto urinario, las bacterias de la presente invención pueden tratar y prevenir infecciones y otras dolencias del tracto urinario. La degradación del ácido oxálico se puede medir *in vitro* usando el kit de ensayo para ácido oxálico n.º de cat. 755699 comercializado por Boehringer Mannheim/R-Biopharm.

Las *Bifidobacterium* de la presente invención se pueden usar en un procedimiento para mejorar o mantener la salud de los animales de compañía, que comprende mejorar la digestión de la fibra. La mejora de la digestión de la fibra es deseable, ya que estimula el crecimiento de dichas bacterias probióticas, así como la microflora endógena beneficiosa, que ayuda a suprimir algunas bacterias potencialmente patógenas. Además, se ha documentado en seres humanos una disminución en la cantidad de metabolitos y enzimas perjudiciales que resultan de la fermentación colónica (6). La digestión de la fibra se puede determinar con el procedimiento descrito en Vickers y col. (7), con la excepción de que, en lugar de la inoculación con muestras fecales diluidas, cada experimento utiliza cultivos puros de las cepas bacterianas de interés

Las cepas probióticas felinas de la presente invención se pueden utilizar para reducir el olor de las heces y, por tanto, del arenero, reduciendo la producción de compuestos en las heces y la orina productores de olor. Los ejemplos no limitantes de compuestos productores de olor incluyen amoniaco, indoles, fenoles, aminas, ácidos grasos de cadena ramificada, y compuestos volátiles que contienen azufre. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la reducción de los niveles de estos compuestos en las heces o la orina de un animal de compañía reduce el olor asociado con las heces o la orina. Además, para los animales de compañía que utilizan un arenero, existe una disminución paralela del olor del arenero.

El procedimiento de uso de las bacterias acidolácticas de la presente invención implica normalmente el consumo oral por parte del animal. El consumo oral puede tener lugar como parte de la ingesta dietética normal, como un suplemento de la misma. El consumo oral se suele producir al menos una vez al mes, preferentemente al menos una vez a la semana, más preferentemente al menos una vez al día. Las bacterias acidolácticas de la presente invención se pueden proporcionar al animal de compañía en una cantidad terapéuticamente eficaz para mantener o mejorar la salud del animal, preferentemente un animal de compañía. Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" con referencia a las bacterias acidolácticas, significa la cantidad de las bacterias suficiente para proporcionar el efecto deseado o beneficioso a un animal hospedador que necesita el tratamiento, pero lo suficientemente baja para evitar efectos adversos tales como toxicidad, irritación, o respuesta alérgica, proporcionada a una relación beneficio/riesgo razonable cuando se utiliza en la forma de la presente invención. La "cantidad terapéuticamente eficaz" específica variará con factores tales como la dolencia concreta que se está

tratando, el estado físico del usuario, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea (si existe), la forma farmacéutica específica a utilizar, el transportador utilizado, la solubilidad de la forma farmacéutica, y el régimen de dosificación particular.

5 Preferentemente, la bacteria acidoláctica se proporcionan al animal de compañía a una dosis de $1,0E+04$ a $1,0E+14$ UFC por día, más preferentemente de $1,0E+06$ a $1,0E+12$ UFC por día. La composición puede contener preferentemente al menos un 01 % de $1,0E+04$ a $1,0E+12$ UFC/g de la bacteria acidoláctica del género Bifidobacterium, que se puede obtener mediante aislamiento del tracto GI de felino. La bacteria acidoláctica se puede proporcionar al animal en cualquier forma viable, o como células muertas, o destilados, aislados u otras fracciones de los productos de fermentación de las bacterias acidolácticas de la presente invención, o cualquier mezcla de las mismas.

10 Preferentemente, la bacteria acidoláctica, o una fracción aislada o purificada a partir de la misma, se utiliza para preparar una composición destinada a mantener o mejorar la salud del animal. Como se ha indicado anteriormente, la composición puede formar parte de la ingesta dietética normal, o un suplemento. Cuando la composición forma parte de la ingesta dietética normal, la composición puede ser en la forma de un alimento seco para animales tales como galletas o croquetas, un alimento en grano procesado, un pienso húmedo para animales, yogures, salsas, gomas de mascar, golosinas y similares.

Este tipo de composiciones pueden comprender componentes adicionales. Otros componentes son beneficiosos para su inclusión en las composiciones usadas en el presente documento, pero son opcionales para los propósitos de la invención. Por ejemplo, las composiciones de alimento están nutricionalmente equilibradas. En una realización, las composiciones de pienso pueden comprender, en base de materia seca, de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 50 % de proteína bruta, preferentemente de aproximadamente un 22 % a aproximadamente un 40 % de proteína bruta, en peso de la composición de pienso. El material de proteína bruta puede comprender cualquier material que tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente un 15 % por peso, cuyos ejemplos no limitantes incluyen proteínas vegetales tales como la soja, semillas de algodón, y cacahuete, proteínas de origen animal, tales como la caseína, albúmina, y tejido cárnico. Los ejemplos no limitantes de tejido cárnico de utilidad en el presente documento incluyen carne fresca, y carne seca o hidratada tal como harina de pescado, carne de ave, harina de carne, harina de hueso y similar. Otros tipos de fuentes adecuadas de proteína bruta incluyen gluten de trigo o gluten de maíz, y proteínas extraídas de fuentes microbianas tales como levadura.

Además, las composiciones de pienso pueden comprender, en base de materia seca, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 35 % de grasa, preferentemente de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 % de grasa, en peso de la composición de pienso. Además, las composiciones de pienso que comprenden la bacteria acidoláctica de la presente invención pueden también comprender de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 25 % de fibra alimenticia total. Las composiciones también pueden comprender múltiples fuentes de almidón, como se describe en el documento WO 99/51108.

35 Las composiciones de la presente invención pueden comprender además una fuente de carbohidratos. Los granos o cereales como el arroz, maíz, mijo, sorgo, cebada, alfalfa, trigo, y similares son fuentes ilustrativas. Además, las composiciones también pueden incluir otros materiales tales como el suero deshidratado y otros subproductos lácteos.

Las composiciones que comprenden las bacterias de la presente invención también pueden comprender un prebiótico. "Prebiótico" incluye sustancias o compuestos que se fermentan por la flora intestinal del animal de compañía y de esta forma estimulan el crecimiento de bacterias acidolácticas en el tracto gastrointestinal del animal de compañía a expensas de las bacterias patógenas. El resultado de esta fermentación es una liberación de ácidos grasos, en particular, ácidos grasos de cadena corta en el colon. Esto tiene el efecto de reducir el valor de pH en el colon. Los ejemplos no limitantes de prebióticos adecuados incluyen oligosacáridos, tales como inulina y sus productos de hidrólisis comúnmente conocidos como fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, xilooligosacáridos u oligoderivados de almidón. Los prebióticos se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, el prebiótico se puede proporcionarse en forma de material vegetal que contiene la fibra. Los materiales vegetales adecuados incluyen espárrago, alcachofas, cebollas, trigo o achicoria, o residuos de estos materiales vegetales. Como alternativa, la fibra prebiótica puede suministrarse como un extracto de inulina, por ejemplo, son adecuados los extractos de achicoria. Los extractos de inulina adecuados se pueden obtener de Orafti SA of Tirlemont 3300, Bélgica, con la marca comercial "Raftiline". Por ejemplo, la inulina se puede proporcionar en forma de Raftiline (g) ST, que es un polvo fino de color blanco que contiene aproximadamente de un 90 a aproximadamente un 94 % en peso de inulina, un máximo de aproximadamente un 4 % en peso de la glucosa, y de aproximadamente un 4 a aproximadamente un 9 % en peso de sacarosa.

55 Como alternativa, la fibra puede estar en forma de un fructooligosacárido como el obtenido de Orafti SA de Tirlemont 3300, Bélgica, con la marca comercial "Raftilose". Por ejemplo, la inulina se puede proporcionar en la forma de Raftilose (g) P95. Por otra parte, los fructooligosacáridos se puede obtener hidrolizando inulina, por procedimientos enzimáticos, o mediante el uso de microorganismos.

Para pienso seco para animales de compañía, un procedimiento adecuado es la cocción con extrusión, aunque se puede usar el horneado y otros procedimientos adecuados. Cuando se utiliza la cocción con extrusión, el pienso seco

para animales de compañía se proporciona generalmente en forma de una croqueta. Si se utiliza un prebiótico, el prebiótico se puede mezclar con el resto de ingredientes del pienso seco para animales de compañía antes del procesamiento. Un procedimiento adecuado se describe en la solicitud de patente europea n.º 0850569. Si se utiliza un microorganismo probiótico, el organismo se reviste por encima o rellena el interior del pienso seco para animales de compañía. Un procedimiento adecuado se describe en la publicación de patente europea n.º EP 0 862 863.

Para alimentos húmedos, se pueden usar los procedimientos descritos en las patentes de EE.UU. 4.781.939 y 5.132.137 para producir productos cárnicos simulados. También se pueden utilizar otros procedimientos para producir productos de tipo fragmentado; por ejemplo, cocción en un horno de vapor. Como alternativa, se pueden producir productos panificados emulsionando un material cárnico adecuado para producir una emulsión cárnica, adición de un agente gelificante adecuado, y calentando la emulsión cárnica antes de rellenar latas u otro tipo de recipientes. Las composiciones de alimento húmedo típicas pueden comprender de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % de proteína, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % de grasa, y de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 7 % de fibra. Los ingredientes no limitantes que se pueden usar en las composiciones para comida húmeda incluyen pollo, pavo, ternera, pescado blanco, caldo de pollo, caldo de pavo, caldo de ternera, hígado de pollo, arroz machacado, sémola de maíz, harina de pescado, huevo, pulpa de remolacha, cloruro, linaza de carne, subproductos de cordero y ternera, subproductos de pollo y mezclas de los mismos. En otra realización, composiciones de suplementos tales como galletas, gomas de mascar, y otras golosinas pueden comprender, en base de materia seca, de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 60 % de proteína, o de aproximadamente un 22 % a aproximadamente un 40 % de proteína, en peso de la composición de suplemento. Como ejemplo adicional, las composiciones de suplemento pueden comprender, en base de materia seca, de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 35 % de grasa, o de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 % de grasa, en peso de la composición de suplemento. Las composiciones de alimento y suplemento previstas para su uso por felino o félidos son bien conocidas en la técnica.

Los piensos para animales de compañía pueden incluir otros principios activos tales como ácidos grasos de cadena larga y cinc. Los ácidos grasos de cadena larga adecuados incluyen ácido alfa-linoleico, ácido gamma-linolénico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico, y ácido docohexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácidos eicosapentanoico y docosahexanoico.

El aceite de borraja, el aceite de semillas de grosella y el aceite de onagra son fuentes adecuadas de ácido gamma linolénico. Los aceites de cártamo, aceites de girasol, aceites de maíz y aceites de soja son fuentes de ácido linoleico adecuadas. Estos aceites también se pueden utilizar para revestir los sustratos anteriormente citados. El cinc se puede proporcionar en varias formas adecuadas, por ejemplo, como sulfato de cinc u óxido de cinc. Adicionalmente, muchos ingredientes utilizados comúnmente en los alimentos en los piensos para animales de compañía son fuentes de ácidos grasos y cinc. Se ha observado que la combinación de achicoria, como fuente de prebiótico, con un aceite rico en ácido linoleico, como el aceite de soja, proporciona beneficios inesperados, que sugieren un efecto sinérgico.

Cuando la composición está en la forma de una salsa, la composición comprende preferentemente al menos un 10 % de caldo, o carne desmenuzada, cuyos ejemplos no limitantes incluyen carne desmenuzada de hortalizas, ternera, pollo o jamón. Las composiciones de salsa típicas pueden comprender de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 15 % de proteína, de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 5 % de grasa bruta, y de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de fibra.

Otros ejemplos no limitantes de suplementos adecuados para su uso en el presente documento incluyen polvo, suspensiones oleosas, suspensiones de base láctea, quesos, composiciones basadas en manteca de cacao y pastillas o cápsulas. Cuando la composición está en la forma de una pastilla, se necesitan agentes aglutinantes adecuados para mantener la pastilla en una forma sólida comprimida. Los ejemplos no limitantes de agentes aglutinantes adecuados incluyen las gomas naturales como la goma xantana, pectinas, lecitinas, y otras conocidas de los expertos en la materia. Cuando la composición está en la forma de una cápsula, la composición se encapsula preferentemente utilizando tecnologías conocidas del experto en la técnica. Los ejemplos no limitantes de materiales de encapsulación adecuados incluyen el poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), alginatos, y gelatina. Las composiciones basadas en yogur pueden comprender de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de proteína, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % de carbohidratos, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de fibra, de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de grasa y de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 90 % de un transportador líquido tal como leche.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la misma de ninguna forma.

55 Ejemplo 1 - Aislamiento de *Bifidobacterium longum* AH121A

La cepa AF1121 de *Bifidobacterium longum* se aisló de tejido de intestino de felino.

Las muestras de tejido intestinal felino se obtuvieron de gatos sanos llevados al veterinario local por sus dueños, que iniciaron y autorizaron la eutanasia. Todos los animales estaban sanos y exentos de enfermedades. El colon, colon

intermedio, ciego e ileon de cada gato se diseccionaron para exponer la mucosa.

Se eliminaron los sobrenadantes tras agitación del tejido mucoso (sometido a vortización durante 1 minuto) y tras la homogeneización mecánica del tejido. Cada sobrenadante se sembró en agar Mann Rogosa Sharpe (MRS). Se incubaron anaeróticamente, usando el sistema Anerocult GasPak, durante 48 horas a 37°C. Las colonias aisladas de las placas se volvieron a sembrar sobre cualquier tipo de MRSy se dejaron crecer de nuevo anaeróticamente en las mismas condiciones. Las colonias aisladas se volvieron a sembrar 4 veces para purificar una sola cepa. Se evaluaron la morfología y el aspecto al microscopio de las colonias. Los aislados adecuados se ensayaron para determinar la reacción de Grant y la actividad catalasa. La identificación de bacilos gram positivos, catalasa negativos, se llevó a cabo con una prueba API (API 5 OCHL, BioMerieux). Las células cosechadas se lavaron dos veces en tampón fosfato 0,05 M (pH 6,5) y cisteína-HCl (500 mg/l) seguido por sonicación. La centrifugación eliminó los residuos celulares. Los sobrenadantes se incubaron con NaF (6 mg/ml) y yodoacetato Na (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo mediante incubación con hidroxilamina HCl (pH 6,5) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El desarrollo del color se siguió después de la adición de HCl (4 M), FeCl₃·6H₂O (5 % (w/v) en HCl 0,1 M) y fructosa-6-fosfato (sal de Na). La formación de acetil fosfato a partir de fructosa-6-fosfato se evidenció por el color rojizo formado por el quelato férrico de su hidroximato.

Identificación de especies

Se llevó a cabo secuenciación con espaciador intergénico 16s (EIG) para identificar la especie de bifidobacteria aislada. En resumen, se aisló ADN de AH121A utilizando 100 µl de solución de extracción y 25 µl de solución de preparación de tejidos (Sigma, kit XNAT2). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido por 2 h a 95°C, a continuación, se añadieron 100 µl de solución de neutralización (kit XNAT2). La solución de ADN genómico se cuantificó usando un espectrofotómetro Nanodrop y se almacenó a 4°C. Se llevó a cabo la PCR usando los cebadores IGS, IGS L: 5'-GCTGGATCACCTCCTTTCT-3' (SEQ ID NO. 3) que da como resultado la identificación de la SEQ ID NO. 1, e IGS R: 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' (SEQ ID NO. 4) que da como resultado la identificación de la SEQ ID NO. 2. Las condiciones de ciclación fueron 94°C durante 3 min (1 ciclo), 94°C durante 30 s, 53°C durante 30 s, 72°C durante 30 s (28 ciclos). La reacción de la PCR contenía 4 µl (50 ng) de ADN, mezcla PCR (kit XNAT2), cebadores IGS L y R 0,4 µM (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf. Los productos de la PCR (10 µl) se analizaron junto con un marcador de peso molecular (escalera de 100 pb, Roche) en un gel de agarosa al 2 % teñido con EtBr en TAE, para determinar el perfil de IGS. Los productos de la PCR de Bifidobacterium (banda única) se purificaron utilizando el kit de purificación PCR Promega Wizard. Los productos de la PCR purificados se secuenciaron usando las secuencias del cebador (más arriba) para la región del espaciador intergénico. A continuación, se hizo una búsqueda de los datos de la secuencia en la base de datos de nucleótidos NCBI para determinar la identidad de la cepa mediante homología de nucleótidos. Los datos de la 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 coincidencia más próxima con la secuencia y a continuación se alinearon las secuencias para comparación usando el programa informático DNASTAR MegAlign. Las secuencias (SEQ ID NO. 1 [secuencia IGS directa] y la SEQ ID NO. 2 [secuencia IGS inversa]) obtenidas se pueden ver en el listado de secuencias. Una búsqueda en la base de datos de NCIMB reveló que AH121A 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*.

Ejemplo 2 - Cribado con agar Rojo congo

Se usó un cribado en agar rojo Congo para seleccionar fenotípicamente las cepas bacterianas que expresan EPS. En resumen, se inocularon asépticamente 10 ml de medio de cultivo Rogosa modificado (+ 0,05 % de cisteína) con una colonia recién desarrollada de la cepa bacteriana y se incubó anaeróticamente a 37°C hasta 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 la colonia de color crema/blanco. Las cepas que producen menos EPS capturan la tinción rojo Congo fácilmente, dando como resultado una morfología de la 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.

En referencia a la Fig. 1, la morfología de la colonia de *B. longum* AH121A es una colonia convexa mucoide de color blanco brillante.

Ejemplo 3

Para determinar la resistencia del aislado bacteriano felino AHF121A a diferentes concentraciones de bilis porcina y para evaluar la supervivencia del aislado bacteriano felino AHF121A a pH 2,5 durante 6 horas y resistencia a la bilis posterior usando varias concentraciones de bilis.

Diseño experimental:

La cepa de ensayo fue *Bifidobacterium longum* AHF121A. La resistencia a la bilis se examinó utilizando placas de agar MRS/RCA suplementadas con bilis porcina (0,3, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 7,5 y 10 %). La supervivencia de las cepas a pH 2,5

ES 2 610 829 T3

se controló en intervalos de -5, 5, 30, 60, 120, 180 y 360 min usando el procedimiento de recuento en placa. La resistencia a la bilis se estudió después de estimular las cepas a pH 2,5 durante 6 h.

Procedimiento:

El procedimiento para determinar la resistencia a la bilis de felino se detalla a continuación.

- 5 Se llevó a cabo una evaluación de la tasa de supervivencia de bacterias criodesecadas en presencia de diferentes concentraciones de bilis de felino, comprendidas entre 0,3 % al 10 %.

Se prepararon placas con bilis de felino sintética de diferentes concentraciones, preparando una solución madre al 45 % de bilis sintética, tratamiento térmico de la solución madre de bilis a 80°C durante 10 min para destruir cualquier célula vegetativa.

- 10 Las diferentes concentraciones de bilis utilizadas fueron:

2 % = 6,67 ml de solución madre de bilis + 143,33 agar adecuado
1 % = 3,33 ml de solución madre de bilis + 146.67 ml de agar
5 % = 1,67 ml de solución madre de bilis + 148.33 ml de agar

- 15 Para cada dilución, el agar sin fundir deseado se eliminó tras autoclavado, y se sustituyó por el volumen adecuado de solución madre de bilis.

Las placas de bilis se prepararon nuevas diariamente, pero se pueden almacenar durante hasta una semana.

Las UFC/g de cada cepa de ensayo criodesecada se cuantificó mediante la técnica de diseminación en placa.

- 20 Se distribuyeron 9 cepas de ensayo sobre las placas de bilis porcina resuspendiendo 10 UFC/ml de cepas criodesecadas en 10 ml de PBS estéril, dividiendo las placas de bilis porcina en 1/4 y distribuyendo 4 cepas (10 µl) /placa.

Las placas se secaron sobre la poyata durante 30 min (o hasta que la mancha se hubo secado en el agar) y se incubaron en condiciones adecuadas.

El procedimiento para evaluar las tasas de supervivencia de las cepas bacterianas en un entorno de pH bajo (pH 2,5) se detalla a continuación.

- 25 La enumeración del polvo criodesecado se llevó a cabo usando la técnica de diseminación en placa. El medio se acidificó añadiendo HCl 6 M a 100 ml de caldo ajustado a pH 2,5. Se registró el volumen necesario para realizar el ajuste y, mediante el uso de técnicas estériles, el pH del caldo MRS 4 x 100 ml (caldo remanente) se ajustó usando el mismo volumen de ácido. Las UFC/g de cada cepa de ensayo criodesecada se cuantificó usando la técnica de diseminación en placa

- 30 9 10 UFC/ml de bacterias criodesecadas se resuspendieron en medio acidificado y se incubaron en condiciones aproximadamente anaerobias. La supervivencia se midió tomando alícuotas a 5, 30, 60, 120, 180, 240 y 360 min y determinando las UFC/ml usando la técnica de diseminación en placa.

Resultados:

Tabla 1. Crecimiento de aislados bacterianos en presencia de bilis de felino

Cepa	% Bilis porcina (p/v)			
	0,0	0,5	1,0	2,0
AHF121A	+++	+++	+++	++
+++ = muy buen crecimiento ~100 % ++ = buen crecimiento ~66 %				

35

Conclusiones:

- La Tabla 1 demuestra el efecto de la bilis de felino sobre el crecimiento de la cepa. La cepa bacteriana de felino pudo tolerar concentraciones ≤ 2 % de bilis de felino,
- La Figura 3 muestra la tolerancia al ácido a pH 2,5

40

Ejemplo 4 - Efecto de 121A sobre la relación IL-10 : IL-12

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de sangre periférica de ser humano sano utilizando tubos BD Vacutainer CPT (catálogo BD 362761), según las instrucciones del fabricante. Las PBMC se lavaron y se resuspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco Medium-Glutamax™ (Glutamax (sustituto de glutamina) + piruvato + 4,5 g/l de glucosa (catálogo Gibco 10569-010), suero de feto bovino al 10 % (catálogo Sigma F4135), y penicilina/estreptomina al 1 % (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 μ l de una suspensión bacteriana (a una concentración de 1×10^7 UFC/ml). Las PBMC se incubaron simultáneamente con bacterias durante 48 horas a 37 °C / CO₂ al 5 % en una incubadora. Tras el periodo de incubación de 2 días, las placas se centrifugaron a 300 x g, y el sobrenadante se retiró y se almacenó congelado a -80°C hasta el análisis. Se cuantificaron los niveles de Interleuquina-10 (IL-10) e Interleuquina-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)

Se prepararon las bacterias para experimentos de cultivo simultáneo en dos formatos, (a) Se hicieron crecer bacterias recién desarrolladas en medio MRS de Difco y se recogieron justo después de entrar en fase estacionaria. Todas las células se hicieron crecer en condiciones anaerobias a 37°C. (b) Las bacterias se cultivaron en condiciones anaerobias a 37 °C en medio MRS de Difco y se recogieron justo después de entrar en la fase estacionaria. Se generaron polvos liofilizados para cada una de dichas bacterias y se almacenaron a -80°C en viales de 100 mg previamente alicuatados. Inmediatamente antes del 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 10 ml de solución de ringer, 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 su adición a las PBMC. Se incluyó también un control sin bacterias en todos los experimentos. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

la Fig. 2 ilustra el efecto de la cepa 121A sobre la inducción de IL-10:IL-12. Tanto los cultivos recientemente desarrollados como los criodesecados mostraron un efecto similar.

Ejemplo 5 - Efecto de 121A sobre la secreción de IL-10

La respuesta inmunitaria adecuada a los microbios es un determinante importante de la salud global del hospedador. Una respuesta excesiva puede llevar a enfermedades inflamatorias (por ejemplo, colitis) mientras que respuestas inadecuadas conducen a persistencia y diseminación de patógenos. Los inmunoensayos descritos en el presente documento están bien descritos en la bibliografía, y son procedimientos útiles para determinar la actividad inmunológica del hospedador en respuesta al encuentro con microbios específicos.

Células mononucleares de sangre periférica (PBMC - contienen monocitos, células dendríticas, linfocitos B y linfocitos T) se obtuvieron de voluntarios sanos y se estimularon *in vitro* con cada cepa bacteriana. A continuación, se retiraron los sobrenadantes de los cultivos, y se cuantificaron los niveles de citoquinas.

IL-10 es una citoquina muy importante para controlar las respuestas inmunitarias proinflamatorias anómalas. Los animales con inactivación génica de IL-10 desarrollan colitis y tumores gastrointestinales, mientras que los linfocitos reguladores del sistema inmunitario secretan utilizan IL-10 para controlar las respuestas inmunitarias potencialmente perjudiciales. Por lo tanto, la secreción potenciada de esta citoquina sería protectora contra la actividad inflamatoria inadecuada y respuestas inmunitarias excesivas a los patógenos.

La secreción de IL-10 desde células mononucleares de sangre periférica (PBMC) cultivadas *in vitro* se determinó 48 horas después de una incubación simultánea con cada cepa bacteriana. Las cepas indujeron la secreción de IL-10 con niveles de IL-10 análogos notificados para AHF121A y 35624. (Figs. 4 a 6).

Ejemplo 6: Bif. AH121a tiene actividad inmunomoduladora cuando se incuba simultáneamente con células del sistema inmunitario humano *in vitro*, diferente a la de la Bif. AH35624.**45 Materiales y Procedimientos**

Se someten a ensayo Bifidobacterium longum infantis cepa UCC35624 (B624) y Bifidobacterium longum cepa 121a utilizando un ensayo de inducción de citoquinas de PBMC. Se prepararon las bacterias para experimentos de cultivo simultáneo en los siguientes formatos. Las bacterias se cultivan en condiciones anaerobias a 37°C en medio Difco MRS y se recogen justo después de entrar en fase estacionaria. Se generan polvos criodesecados por congelación para cada una de dichas bacterias y se almacenaron a -80°C en viales de 100 mg previamente distribuidos en alícuotas. Inmediatamente antes del 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 10 ml de solución de ringer, y después se centrifugaron. En cada ocasión se usa un vial nuevo.

Se llevaron a cabo recuentos microscópicos directos utilizando una cámara de recuento Petroff-Hausser según las instrucciones del fabricante y se normalizaron las células lavadas según el número de células antes de su adición a la prueba de PBMC. Se añadieron 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.

Ensayo de inducción de citoquinas de PBMC (células mononucleares de sangre periférica)

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de sangre periférica de ser humano sano utilizando tubos BD Vacutainer CPT (catálogo BD 362761), según las instrucciones del fabricante. Las PBMC se lavaron y se resuspendieron en medio Eagle modificado por Dulbecco Medium-Glutamax™ (Glutamax (sustituto de glutamina) + piruvato + 4,5 g/l de glucosa (catálogo Gibco 10569-010), suero de feto bovino al 10 % (catálogo Sigma F4135), y penicilina/estreptomicina al 1 % (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 μ l de una suspensión bacteriana (en intervalos de concentración de $1 \times 10^{6-8}$ UFC/ml). Se sometieron a ensayo hasta 6 cantidades diferentes de bacterias: 2,5E+08, 1,0E+08, 5,0E+07, 2,5E+07, 1,0E+07, y 1,0E+06. También se analizó un control no bacteriano. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Después de 2 días de incubación a 37°C, las placas se centrifugaron a 300 x g, y el sobrenadante se retiró y se almacenó congelado a -80°C hasta el análisis. Las PBMC se incubaron simultáneamente con bacterias durante 48 horas a 37 °C / CO₂ al 5 % en una incubadora. Se analizaron las citoquinas de los sobrenadantes de los cultivos utilizando un kit de ensayo de 96 pocillos de Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD; catálogo K15008B-1). Interleuquina 1 beta (11-1 p) de Fluman, Interleuquina 6 (II-p) de Fluman, Interleuquina 8 (II-8) de Fluman Interleuquina 10 (II-10) de Fluman, Interleuquina 12p70 (1112p70) de Fluman, Interferón gamma (IFN- γ) de Fluman, Factor alfa de necrosis tumoral (TNF α) de Fluman y G-CSF de Fluman se cuantificaron y se notificaron en picogramos por mililitro (pg/ml). Cada muestra se analizó en 3-5 replicados (A a E).

Resultados

Se someten a ensayo *Bifidobacterium longum infantis* cepa UCC35624 (B624) y *Bifidobacterium longum* cepa 121a se analizaron para determinar la inmunomodulación utilizando un ensayo de inducción de citoquinas de PBMC, para generar curvas de dosis-respuesta prolongadas con hasta 6 cantidades diferentes de bacterias analizadas: 2,5E+08, 1,0E+08, 5,0E+07, 2,5E+07, 1,0E+07, y 1,0E+06. Se analizaron los sobrenadantes para determinar un grupo de citoquinas, incluidas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 y IL-12, TNF- α , IFN- γ y G-CSF. La medición de citoquinas se representa como promedio (+/- SEM) de un máximo de 5 individuos (A a E).

Por comparación con 35624, la cepa 121a mostró un modelo muy similar para la inducción de la mayoría de las citoquinas, incluyendo IL-10, pero un modelo bastante diferente y una mayor producción de IL-6 e IL-8.

IL-10: La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 7). La inducción de IL-10 es cualitativa y cuantitativamente similar a la incubación con 35624. La inducción máxima de IL-10 no parece cumplirse hasta $1,0 \times 10^9$ bacterias por pocillo.

IL-1 β : La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 8). La inducción de IL-1 β es cualitativa y cuantitativamente similar a la incubación con 35624. La inducción máxima de IL-1 β no parece cumplirse hasta $1,0 \times 10^9$ bacterias por pocillo.

IL-6: La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina IL-6 en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 9). Cuantitativamente, el modelo es diferente de 121a comparado con 35624 con mayores niveles de IL-6 medido con 121a especialmente a bajas dosis de bacterias por pocillo.

IL-8: La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina IL-8 en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 10). Cuantitativamente, el modelo es diferente de 121a comparado con 35624; con niveles más elevados de IL-8 medidos con 121a para todas las dosis de bacterias por pocillo.

IL-12: La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina proinflamatoria IL-12 en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 11). El modelo de modulación de IL-12 tiene forma de campana con 121a y con 35624, aumentando a niveles punta y después disminuyendo para concentraciones bacterianas más elevadas. Cuantitativamente, el modelo es algo variable para IL-12, pero en conjunto similar con 121a en comparación con 35624.

TNF- α : La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina proinflamatoria TNF- α en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 12). La inducción de TNF- α es cualitativa y cuantitativamente similar a la incubación con 35624 para 3 de 5 réplicas, con elevados niveles de TNF- α encontrados en 2 de 5 réplicas (véanse C y E). Parece que la inducción máxima de IL-10 se cumple con hasta $1,0 \times 10^8$ bacterias por pocillo.

INF- γ La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina proinflamatoria INF- γ en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 13). Cuantitativamente, el modelo es algo variable para INF- γ , pero en conjunto similar con 121a en comparación con 35624.

G-CSF: La incubación con 121a induce un aumento sensible a la dosis de la citoquina G-CSF en PBMC tras estimulación *in vitro* (Fig. 14). La inducción de G-CSF es cualitativa y cuantitativamente similar a la incubación con 35624.

55

Ejemplo 7- Efecto de 121A sobre la producción de citoquinas mediante células dendríticasSumario

La respuesta inmunitaria es un procedimiento estrechamente regulado que suele dar como resultado la protección de la infección y la tolerancia a antígenos ambientales inocuos. Sin embargo, en enfermedades inflamatorias, la respuesta inmunitaria activada da como resultado un estado proinflamatorio crónico caracterizado por la activación de la respuesta inmunitaria innata y la expansión de subconjuntos de linfocitos T polarizados. Actualmente, el tratamiento de las enfermedades inflamatorias se centra en la supresión de los mediadores inflamatorios clave o poblaciones de células inflamatorias. Sin embargo, estas hipótesis solamente proporcionan una supresión temporal de los síntomas de la enfermedad. El tratamiento o la prevención correctos a largo plazo solamente se pueden proporcionar mediante la potenciación de los procedimientos celulares reguladores que protegen del daño producido por las respuestas proinflamatorias. *Bifidobacterium* AFIF121A es un microbio probiótico que estimula selectivamente la secreción de IL-10 desde el sistema inmunitario innato (es decir, las células dendríticas, e induce la polarización de los linfocitos T reguladores positivos para Foxp-3 *in vitro*. *In vivo*, la secreción de IL-10 y los linfocitos T reguladores son potentes supresores de las respuestas inflamatorias anómalas.

Linfocitos T_{reg}

El papel fundamental de los linfocitos T reguladores (T_{reg}) en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria se ha demostrado en una amplia variedad de modelos animales, en los que se ha demostrado que la transferencia adoptiva o la expansión deliberada de los linfocitos T_{reg} previene o cura varias enfermedades mediadas por linfocitos T, incluidas alergia, inflamación pulmonar asmática, enfermedades autoinmunitarias y rechazo de aloinjerto, restaurando la tolerancia inmunitaria a los alérgenos, autoantígenos o aloantígenos [8]. Se han descrito múltiples mecanismos moleculares para la inmunosupresión mediada por T_{reg} donde la secreción de IL-10 es especialmente importante [9]. La ausencia, o un defecto, en el funcionamiento de los linfocitos T_{reg} también se ha correlacionado con el síndrome hiperIgE, hipereosinofilia y autoinmunidad en seres humanos, mientras que su presencia se ha asociado con la tolerancia inmunitaria [10]. Los estudios realizados sobre los mecanismos por los que las respuestas inmunitarias a antígenos ambientales no patógenos conducen bien a alergia o a inmunidad no dañina han demostrado que los T_{regs} productores de IL-10 específica de alérgeno (linfocitos T_{R1}) son el conjunto de linfocitos T predominante en individuos sanos [11, 12]. La exposición repetida de criadores de abejas sanos no alérgicos al veneno de abeja durante la estación de cría de abeja representa un *valioso modelo in vivo* para dilucidar mecanismos de tolerancia inmunitaria a los antígenos venenosos [13]. Tras múltiples picaduras de abeja, los linfocitos T_{H1} y T_{H2} específicos de antígeno del veneno se transforman en linfocitos T_{R1} que segregan IL-10. Esto se produce en paralelo con la supresión de las respuestas cutáneas tardías a los alérgenos y la inhibición de los linfocitos T_{H1} y T_{H2} específicos de alérgeno. La respuesta se observa siempre que la exposición al veneno persista y vuelva a los niveles iniciales en un plazo de 2 a 3 meses después de finalizar la estación de cría de abejas.

Varias estrategias, que están diseñadas para potenciar la función de los T_{reg} *in vivo* están actualmente en investigación. Estas incluyen la transferencia adoptiva de linfocitos T_{reg} inducibles o constitutivos y su inducción mediante adyuvantes o inmunomoduladores específicos. Estas hipótesis son atractivas, comparadas con los tratamientos convencionales, ya que la capacidad supresora de los linfocitos T_{reg} específicos de antígeno no da como resultado la inmunosupresión general, y en realidad puede llevar a una regulación duradera específica de antígeno *in vivo*. Además, son posibles tratamientos específicos de pacientes con efectos secundarios limitados. Muchos inmunomoduladores que se han desarrollado o están en desarrollo, como rapamicina, el bloqueante de la coestimulación de CD80/CD86:CD28 abatacept (Orencia; Bristol-myers Squibb), los anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD3 no mitogénicos, el agotamiento de los linfocitos T y los mAbs contra el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) muestran efectos directos o indirectos sobre los linfocitos T_{reg}, que pueden potenciar o suprimir su función [14-18]. Existe una ventaja selectiva de expandir una población de linfocitos T_{reg}, que se pueda dirigir al órgano (o a los ganglios linfáticos que drenan el órgano) mediante el reconocimiento de un alérgeno o un autoantígeno expresado en órganos inflamados en modelos de ratón [19]. Por lo tanto, la transferencia de linfocitos T_{reg} específicos de órgano puede ser eficaz para suprimir una enfermedad en curso, aunque dichos linfocitos T_{reg} no tienen que reconocer necesariamente con exactitud el mismo autoantígeno que los linfocitos T efectores autoagresivos [20]. Esto tiene implicaciones en las estrategias terapéuticas destinadas a dirigir en brazo de los linfocitos T_{reg}, de la tolerancia inmunitaria contra los alérgenos, autoantígenos o antígenos del trasplante. Se están investigando las posibilidades de la transferencia adoptiva de linfocitos T_{reg} o compuestos de molécula pequeña que induzcan linfocitos T_{reg} en el tejido [19], pero hasta el momento no se han notificado estudios con doble enmascaramiento controlados por placebo. Hasta la fecha, el alérgeno-SIT es el único enfoque específico de antígeno que induce la producción y la activación de linfocitos T_{reg} en seres humanos. El alérgeno-SIT induce linfocitos T_{reg} y linfocitos análogos a T_{R1} secretadores de IL-10, y el tratamiento con glucocorticoides y agonistas β 2 adrenérgicos parece promover el número y la actividad de estas células [21-23]. Los elementos transcripcionales esenciales que regulan la expresión del promotor Foxp3 se han notificado recientemente, y proporcionarán nuevas dianas para el desarrollo de sustancias terapéuticas novedosas [24, 25].

Microbios como novedosas opciones terapéuticas

Crece el interés por la administración deliberada de microbios o metabolitos microbianos para el tratamiento de la actividad inflamatoria anómala. Los microbios típicos que se están estudiando en la actualidad incluyen *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *E. coli* no patógenas y cepas de *Bacteroides* [26-31]. Los efectos protectores asociados con estos microbios están probablemente mediados por múltiples mecanismos que implican células epiteliales, células dendríticas y linfocitos T. Sin embargo, un rasgo común de estos microbios, del que se tiene cada vez más información es su capacidad para inducir linfocitos T_{reg}. Por ejemplo, el contacto de una mezcla de microbios comensales (cóctel probiótico VSL#3) con el intestino de murino, ha mostrado impulsar el desarrollo de linfocitos T_{reg} en la mucosa, que se asocia con una atenuación de la inflamación en un modelo de colitis en murino [32]. Además, el consumo de una cepa de *Bifidobacterium infantis* estimula la conversión de linfocitos T_{reg} y protege contra la activación de NF-κB inducida por LPS *in vivo* mientras que *Lactobacillus reuteri* induce linfocitos T_{reg} que protegen contra una respuesta alérgica de las vías respiratorias en ratones [33, 34]. Los linfocitos T_{reg} se derivan del timo, pero también se pueden inducir en órganos periféricos, incluida la mucosa intestinal [35, 36]. Las células dendríticas CD103+ de la mucosa son las principales responsables de la conversión de los linfocitos T_{reg} mediante procedimientos dependientes de TGF-β y ácido retinoico [37, 38]. Es probable que la conversión está impulsada por factores específicos del ambiente gastrointestinal específico, con presencia de grandes cantidades de organismos comensales. Sin embargo, es improbable que todos los microbios comensales sean igualmente eficaces para inducir linfocitos T_{reg} *in vivo*. Un reciente estudio, que compara múltiples organismos comensales (*Bifidobacterium longum* AH1206, *Bifidobacterium breve* AH1205 y *Lactobacillus salivarius* AH1102), ha demostrado que *Bifidobacterium longum* AH1206 induce linfocitos T_{reg} y también fue capaz de proteger contra el alistamiento de eosinófilos hacia el pulmón y bloquear la inducción de la IgE sérica en modelos murinos [39]. El resto de cepas bacterianas no indujo eficazmente linfocitos T_{reg} y no pudieron proteger de la inflamación alérgica en los mismos modelos. Por lo tanto, la inducción de linfocitos T_{reg} puede ser una característica crítica de la biota sana, que protege del desarrollo de una reactividad inmunológica anómala a antígenos potenciales. Además de utilizar microbios vivos para el tratamiento de la alergia, otra hipótesis interesante es identificar los factores microbianos responsables del efecto beneficioso y el uso de estos factores aislados solos. Por ejemplo, el polisacárido A derivado de *Bacteroides fragilis* estimula un equilibrio adecuado de T_H1/T_H2 en ratones exentos de gérmenes tras presentación mediante células dendríticas de la mucosa, y protege de la colitis en modelos animales mediante linfocitos T CD4⁺ secretores de IL-10 [29, 40]. La continua identificación de nuevos compuestos microbianos que induzcan células dendríticas tolerogénicas y actividad de linfocitos T_{reg} indudablemente conducirá a novedosas moléculas terapéuticas para su evaluación en estudios clínicos.

Diferenciación y maduración de células dendríticas

Se aislaron monocitos humanos de la sangre usando una combinación de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll y separación celular usando microperlas magnéticas revestidas con anticuerpo específico de CD 14 (MiltenyiBiotec). La pureza de la fracción de linfocitos CD14+ aislados fue mayor del 90 % en todos los experimentos. Para generar DC inmaduras (iDC), los linfocitos CD 14+ purificados se cultivaron durante 5 días en presencia de IL-4 (R&D systems) y GM-CSF (R&D systems) para diferenciación a células dendríticas mieloides. El día 6, las células se dejaron sin estimulación (iDC) o se estimularon con LPS (1 mg/ml) 5x10⁵ MDDCs o células bacterianas durante 24 horas. B longum cepa AHF121A s (relación 10:1 entre bacterias y DC (5x10⁶), relación 1:1 entre bacterias y DC (5x10⁵) durante 24 horas. Como se anticipaba, como consecuencia de la aplicación de antibióticos, no se observó crecimiento bacteriano durante este periodo. En ese momento, los sobrenadantes se aislaron y se analizaron para determinar los niveles de IL-10 e IL-12p70 usando la plataforma multiplexada Luminex.

Aislamiento de linfocitos T CD4+ T humanos y cultivo simultáneo con DC

Las PBMC se aislaron mediante centrifugación de capas leucocitarias en gradientes de Lymphoprep. Los linfocitos T CD4+ se separaron usando columnas de afinidad de selección negativa (R&D Systems), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la separación, los linfocitos T se lavaron y se resuspenden en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero de feto bovino al 10 % térmicamente inactivado, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, y L-glutamina 2 mmol/l. Los linfocitos T CD4+ purificados (1 x se estimularon mediante la combinación de mAb inmovilizados dirigidos contra CD3 (1 µg/ml) contra CD28 soluble (5 µg/ml) (Pharmingen). Posteriormente, los linfocitos T CD4+ se incubaron con las DC anteriores. Después de 48 h, los linfocitos T CD4+ se permeabilizaron y se tiñeron para determinar CD25 y Foxp-3. Las células se evaluaron usando citometría de flujo.

Los resultados muestran que las células dendríticas estimuladas con AHF121A impulsan la polarización y/o la expansión del subconjunto de linfocitos T reguladores, que expresan CD25 y Foxp-3.

Los probióticos tienen una capacidad diferente para inducir la producción de citoquinas mediante las DC

El tipo de citoquinas liberadas puede afectar la polarización de los linfocitos T. Por lo tanto, los inventores analizaron también la producción de IL-12p70, e IL-10 por las MoDC después de 24 horas de tratamiento con bacterias, como anteriormente. LPS fue un fuerte inductor de todas las citoquinas sometidas a ensayo, mientras que la AHF121A desencadenó una liberación diferencial de citoquinas (Fig. 15). AHF121A indujo niveles menores de IL-10 cuando se compara con LPS, pero no induce un nivel detectable de IL-12p70. Así, AHF121A mostraba un potencial inflamatorio reducido.

La diferencia en la producción de citoquinas refleja diferente capacidad de polarización de los linfocitos T

- La liberación de citoquinas por las DC es importante para impulsar la polarización de linfocitos T hacia Th1, Th2, Th17 o linfocitos T reguladores. Dadas las diferencias observadas en la producción de citoquinas, los autores analizan adicionalmente si las MDDC generadas mediante AHF121A tienen la capacidad de inducir linfocitos T reguladores F_{oxp3}⁺. Las DC se incubaron con AFIF121A durante 5 días y a continuación se cultivaron simultáneamente con linfocitos T CD4⁺ alogénicos muy purificados no expuestos anteriormente. La población de linfocitos T reguladores CD4⁺F_{oxp3}⁺ se analizó a continuación mediante FACS. Los resultados muestran que las células dendríticas estimuladas con AFIF121A impulsan la polarización y/o la expansión del subconjunto de linfocitos T reguladores, que expresan CD25 y F_{oxp3}. (Fig. 16)
- Los inventores postulan que AHF121A genera DC tolerogénicas, que, a su vez, inducen la generación de linfocitos T reguladores CD4⁺F_{oxp3}⁺. De hecho, los inventores demostraron que las MDDC cultivadas con AHF121A podían convertir los linfocitos T CD4⁺CD25⁻ en linfocitos T CD4⁺CD25⁻ F_{oxp3}⁺. En resumen, AFIF121A ejerce potentes efectos inmunomoduladores mediante la regulación en exceso o la potenciación de la generación de Tregs por las MDDC *in vitro*. Los resultados muestran evidencias de la generación de Tregs CD4⁺CD25⁻F_{oxp3}⁺ en respuesta a AFIF121A *in vitro*, un efecto que puede ser terapéuticamente útil para modular trastornos inflamatorios inmunitarios *in vivo*. (Fig. 16)
- Se había demostrado anteriormente que algunos probióticos (es decir, *L. casei* y *reuteri*) pueden inducir el desarrollo de linfocitos T reguladores (32, 41, 42). Se ha demostrado que *Bifidobacterium AF11206* media la activación potente de los linfocitos T reguladores en 3 modelos animales diferentes. Además, el consumo de *Bifidobacterium AF11206* protege contra el alistamiento de eosinófilos hacia el pulmón y bloquea la inducción de IgE sérica. En este caso, se postula que los linfocitos T reguladores tienen un papel importante en la regulación de las respuestas inflamatorias específicas de alérgeno (39). Múltiples estudios en modelos animales indican que los linfocitos T CD4⁺CD25⁻F_{oxp3}⁺ se alistan hacia ambos pulmones y los ganglios linfáticos drenantes, y pueden suprimir la eosinofilia de las vías respiratorias inducida por alérgeno, la hipersecreción de moco y la hipersensibilidad de las vías respiratorias (43-48).
- Numerosos estudios en seres humanos y animales indican ahora que IBD da como resultado una pérdida de tolerancia a las bacterias comensales; El estudio de Round y Mazmanian (49) muestra que PS dirige el desarrollo de los Tregs durante la protección y cura de la colitis experimental. Estos hallazgos son consistentes con estudios que muestran que la producción de IL-10 por linfocitos T F_{oxp3}⁺ es importante para mediar la tolerancia en las superficies mucosas y para prevenir la inflamación intestinal (49, 50).

Ejemplo 8 - Composiciones ilustrativas

Se indican a continuación ejemplos de composiciones de croquetas secas que comprende las *Bifidobacteria* probióticas de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en base peso			
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4
Granos de cereal	Hasta 100	Hasta 100	Hasta 100	Hasta 100
Subproducto cárnico avícola	43,5	40	45	35
Grasa de ave	1,28	1,02	1,16	1,35
Producto de huevo	2,4	2,1	2,5	2,2
Carne de hígado de pollo	1,0	1,0	1,0	1,0
Levadura de cerveza seca	1,0	1,0	1,0	1,0
Fosfato monosódico	1,0	1,0	1,0	1,0
Carbonato de calcio	0,8	0,8	0,8	0,8
Cloruro de potasio	0,6	0,6	0,6	0,6
Vitaminas	0,4	0,4	0,4	0,4
Cloruro de colina	0,3	0,3	0,3	0,3
Minerales	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-Metionina	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloruro de sodio	0,03	0,03	0,03	0,03

(continuación)

Ingrediente	Porcentaje en base peso			
	Ej. 1	Ej. 2	Ej. 3	Ej. 4
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41675 en aceite de girasol)	1	0,5	-	0,6
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41675 en aceite de girasol)	ufc/g -	0,5	1	0,4

Se indican a continuación ejemplos de composiciones de pienso para animales de compañía que comprende las *Bifidobacterium longum* probióticas de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en base peso		
	Ej. 5	Ej. 6	Ej. 7
Agua	Hasta 38	Hasta 47	Hasta 50
Hígado de ave de corral	Hasta 25	Hasta 20	Hasta 15
Productos avícolas	25	20	20
Arroz machacado	5	7	10
Producto de huevo	3	2,5	1,5
Grasa de ave	2,9	3,0	3,2
Carne de ave	0,6	0,7	0,9
Taurina	0,1	0,1	0,1
Vitaminas	0,05	0,1	0,1
Minerales	0,05	0,1	0,1
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41675)	4	5	6

- 5 Se indican a continuación ejemplos de composiciones de suplemento para yogurt que comprende las *Bifidobacterium longum* probióticas de la presente invención.

Ingrediente	Porcentaje en base peso		
	Ej. 8	Ej. 9	Ej. 10
Leche	38	42	48
Azúcar	12	12	10
Almidón modificado	1,0	0,8	0,8
Materiales prebióticos	0,25	0,3	0,5
Probiótico (1 x 10 ¹⁰ ufc/g NCIMB 41675)	4	5	6

Aunque se han ilustrado y descrito realizaciones determinadas de la presente invención, resulta evidente 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, p.85-113.

2. Savage D.C. Interaction between the host and its microbes. In: *Microbiol Ecology of the Gut*, Clark and Bauchop (eds), Academic Press, London. 1977, p.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. Tomomatsu, H. Health effects of oligosaccharides (1994) *Food Technol.* 48: 61-65.
7. Vickers y col., Comparison of fermentation of selected fructooligosaccharides and other fibre substrates by feline colonic microflora (2001) *Am. J. Vet. Res.* 61(4): 609-615.
10. 8. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133:775-87.
9. Taylor A, Akdis M, Joss A, Akkog T, Wenig R, Colonna M, Daigle I, Flory E, Blaser K, Akdis CA. IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:76-83.
15. 10. Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:949-59.
11. Akdis M. Healthy immune response to allergens: Tregulatory cells and more. *Curr Opin Immunol* 2006; 18:738-44.
12. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004;199:1567-75.
20. 13. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Ruckert B, Akdis CA, Akdis M. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med* 2008; 205; 2887-98.
14. Hendriks TK, Velthuis JH, Klepper M, van Gorp E, Geel A, Schoordijk W, Baan CC, Weimar W. Monotherapy rapamycin allows an increase of CD4(+) CD25(bright+) FoxP3(+) T cells in renal recipients. *Transpl Int* 2009;22:884-91.
25. 15. Kremer JM, Dougados M, Emery P, Durez P, Sibilia J, Shergy W, Steinfeld S, Tindall E, Becker JC, Li T, Nuamah IF, Aranda R, Moreland LW. Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator abatacept: twelve-month results of a phase III, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2005;52:2263-71.
30. 16. Utset TO, Auger JA, Peace D, Zivin RA, Xu D, Jolliffe L, Alegre ML, Bluestone JA, Clark MR. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J Rheumatol* 2002;29:1907-13.
17. Isaacs JD, Greer S, Sharma S, Symmons D, Smith M, Johnston J, Waldmann H, Hale G, Hazleman BL. Morbidity and mortality in rheumatoid arthritis patients with prolonged and profound therapy-induced lymphopenia. *Arthritis Rheum* 2001;44:1998-2008.
35. 18. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Wames G, Isenberg DA, Mauri C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF- α therapy. *J Exp Med* 2004;200:277-85.
19. O'Connor RA, Anderton SM. Multi-faceted control of autoaggression: Foxp3+ regulatory T cells in murine models of organ-specific autoimmune disease. *Cell Immunol* 2008;251:8-18.
40. 20. Roncarolo MG, Battaglia M. Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans. *Nature Rev Immunol* 2007;7:585-98.
21. Peek EJ, Richards DF, Faith A, Lavender P, Lee TH, Corrigan CJ, Hawrylowicz CM. Interleukin-10-secreting "regulatory" T cells induced by glucocorticoids and beta2-agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:105-11.
45. 22. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, Mantel PY, Menz G, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:1425-33.
23. Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergenspecific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:780-91.

24. Klunker S, Chong MM, Mantel PY, Palomares O, Bassin C, Ziegler M, Ruckert B, Meiler F, Akdis M, Littman DR, Akdis CA. Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+ inducible regulatory T cells. *J Exp Med* 2009;206:2701-15.
- 5 25. Mantel PY, Kuipers H, Boyman O, Rhyner C, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannidis C, Lambrecht BN, Hendriks RW, Cramer R, Akdis CA, Blaser K, Schmidt-Weber CB. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF- β 1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007;5:e329.
26. van der Kleij H, O'Mahony C, Shanahan F, O'Mahony L, Bienenstock J. Protective effects of *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium infantis* in murine models for colitis do not involve the vagus nerve. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;295:1131-7.
- 10 27. Sheil B, McCarthy J, O'Mahony L, Bennett MW, Ryan P, Fitzgibbon JJ, Kiely B, Collins JK, Shanahan F. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 2004;53:694-700.
- 15 28. McCarthy J, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* 2003;52:975-80.
29. O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, Fitzgibbon J, Lee G, O'Sullivan G, Shanahan F, Collins JK. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1219-25.
- 20 30. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008;453:620-5.
31. Grabig A, Paclik D, Guzy C, Dankof A, Baumgart DC, Erckenbrecht J, Raupach B, Sonnenborn U, Eckert J, Schumann RR, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A. *Escherichia coli* strain Nissle 1917 ameliorates experimental colitis via toll-like receptor 2-and toll-like receptor 4-dependent pathways. *Infect Immun* 2006;74:4075-82.
- 25 32. Di Giacinto C, Marinaro M, Sanchez M, Strober W, Boirivant M. Probiotics Ameliorate Recurrent Th1-Mediated Murine Colitis by Inducing IL-10 and IL-10-Dependent TGF- β Bearing Regulatory Cells. *J Immunol* 2005; 174:3237-46.
33. O'Mahony C, Scully P, O'Mahony D, Murphy S, O'Brien F, Lyons A, Sherlock G, MacSharry J, Kiely B, Shanahan F, O'Mahony L. Commensal-Induced Regulatory T Cells Mediate Protection against Pathogen-Stimulated NF- κ B Activation. *PLOS Pathogens* 2008; 4:e1000112.
- 30 34. Karimi K, Inman MD, Bienenstock J, Forsythe P. *Lactobacillus reuteri*-induced regulatory T cells protect against an allergic airway response in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:186-93.
- 35 35. Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS, Wood KJ. Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J Immunol* 2004;172:923-8.
36. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
37. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007;204:1757-64.
- 40 38. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, Belkaid Y. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007;204:1775-85.
39. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ceddia M, Russell WM, Forsythe P, Bienenstock J, Kiely B, Shanahan F, O'Mahony L. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy* 2009; en prensa.
- 45 40. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005;122:107-18.
41. Foligne B, Zoumpopoulou G, Dewulf J, Ben Younes A, Chareyre F, y col. (2007) A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS ONE* 2: e313.
- 50 42. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, y col. (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 115: 1260-1267.

43. Zuany-Amorim C, Sawicka E, Manlius C y col. Suppression of airway eosinophilia by killed mycobacterium vaccae induced allergen-specific regulatory T-cells. Nat Med 2002; 8:625-9.
44. Leech MD, Benson RA, De Vries A, Fitch PM, Howie SE. Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory cells. J Immunol 2007; 179:7050-8.
- 5 45. McGlade JP, Gorman S, Zosky GR y col. Suppression of the asthmatic phenotype by ultraviolet b-induced, antigen-specific regulatory cells. Clin Exp Allergy 2007; 37:1267-76.
46. Strickland DH, Stumbles PA, Zosky GR y col. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory Tcells. J Exp Med 2006; 203:2649-60.
- 10 47. Wu K, Bi Y, Sun K, Xia J, Wang Y, Wang C. Suppression of allergic inflammation by allergen-DNA-modified dendritic cells depends on the induction of Foxp3+ regulatory T cells. Scand J Immunol 2008; 67:140-51.
48. Boudousquie C, Pellaton C, Barbier N, Spertini F. CD4+ CD25+ T cell depletion impairs tolerance induction in a murine model of asthma. Clin Exp Allergy 2009; 39:1415-26.
49. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Jul 6; 107(27): 12204-9.
- 15 50. Rubtsov YP, y col. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. Immunity. 2008;28-546-558.

Listado de secuencias

- 20 <110> Alimentary Health Limited
- <120> Cepa de Bifidobacterium
- <130> ALIM46/C/WO
- 25 <150> US 12/616.752
- <151> 11-11-2009
- <150> IE 2010/0290
- <151> 11-05-2010
- 30 <160>4
- <170> PatentIn versión 3.3
- 35 <210> 1
- <211> 466
- <212> ADN
- <213> *Bifidobacterium longum*
- 40 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (2)..(2)
- <223> n es a, c, g, o t
- 45 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (4)..(4)
- <223> n es a, c, g, o t
- 50 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (5)..(5)
- <223> n es a, c, g, o t
- 55 <220>
- <221> misc_feature
- <222> (9) .. (9)
- <223> n es a, c, g, o t

ES 2 610 829 T3

5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (51)..(51)
 <223> n es a, c, g, o t

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (240)..(240)
 <223> n es a, c, g, o t

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (265)..(265)
 <223> n es a, c, g, o t

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (461)..(461)
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 1

```

antnnagtn c gtagttctcc gaggtgtgcg ccccgcgcg t cgcgatggtgc natggcggcg 60
gggttgctgg tgtggaagac gtcggtggct ttgccctgcc ggtcgtgcgg tgggtgccgg 120
gggtggtatgg atgcgctttt gggctcccgg atcgccaccc caggcttttt gcctggcggc 180
attcgatgcc cgtcgtgcct gggggccggc cgtgtgccgg cgcgatggcg tggcggtgcn 240
tggtggcttg agaactggat agtgnacgcg agcaaaacaa gggtttttga atctttgttt 300
tgctgttgat ttcgaatcga actctattgt tcgtttcgat cgttttgtga tcatttttag 360
tgtgatgatt tgtcgtctgg gaatttgcta gaggaatcct gcggccatgc acttttgtgg 420
tgtgtggtgc ttgcaagggc gtatggtgga tgccttgcca nccaga 466
  
```

25 <210> 2
 <211> 466
 <212> ADN
 <213> *Bifidobacterium longum*

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g, o t

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (62)..(62)
 <223> n es a, c, g, o t

40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (457)..(457)
 <223> n es a, c, g, o t

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (459)..(459)
 <223> n es a, c, g, o t

50 <400> 2

ES 2 610 829 T3

```

ggcntgcggc caaacaccac aaaagtgcac ggccgcaaga attcctctag caaattccca 60
gnacgacaaa tcatcacact aaaaatgatc acaaaacgat cgaaacgaac aatagagttc 120
gattcgaat caacagcaaa acaaagattc aaaaaccctt gttttgctcg cgtccactat 180
ccagttctca agccaccacg caccgccacg ccatcgcgcc ggcacacggc cggccccag 240
gcacgacggg catcgaatcg cgccaggcaa aaagcctggg gtggcgatcc gggagcccaa 300
aagcgcatcc ataccacccc ggcaccacc gcacgacggg cagggcaaag ccaacgacgt 360
cttcacacc agcaaccccg ccgccatcgc accatgacgac gcgcggggcg cacaccgtcg 420
gacgaacatc cgactgaatt ctccgtagaa aggaggntnc ccagca 466

```

```

5 <210> 3
  <211> 19
  <212> ADN
  <213> Desconocido

10 <220>
   <223> Secuencia sintetizada

   <400> 3
   gctggatcac ctctttct          19

15 <210>4
   <211> 18
   <212> ADN
   <213> Desconocido

20 <220>
   <223> Secuencia sintetizada

   <400> 4
   ctggtgcaa ggcaccca          18

```

REIVINDICACIONES

1. Una cepa aislada de *Bifidobacterium* NCIMB 41675.
2. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de células viables.
3. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de células no viables.
- 5 4. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el *Bifidobacterium* se aísla de tejido de biopsia colónica de un sujeto felino.
5. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cepa es significativamente inmunomoduladora después de su ingestión por vía oral.
- 10 6. Una formulación que comprende una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende un material probiótico.
8. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, que además comprende un material prebiótico.
- 15 9. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además un vehículo ingerible.
10. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el vehículo ingerible es un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo.
- 20 11. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el vehículo ingerible es un producto alimentario tal como una suspensión oleosa, una composición basada en leche, queso, una composición basada en manteca de cacao, una salsa y/o una composición basada en yogur.
12. Un alimento que comprende una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11.
13. Un alimento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el alimento es un alimento seco.
14. Un alimento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el alimento es un alimento húmedo.
- 25 15. Un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que comprende además un material probiótico.
16. Un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, que comprende además un material prebiótico.
- 30 17. Un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en el que el alimento es un pienso para animales de compañía.
18. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, para su uso como medicamento.
- 35 19. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17 para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de trastornos autoinmunitarios debidos a una actividad inflamatoria indeseada.
- 40 20. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad diarreica debida a una actividad inflamatoria indeseada.
- 45 21. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria en animales de compañía.
22. Una cepa de *Bifidobacterium* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, o un alimento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, para su uso en la profilaxis y/o tratamiento de inflamación en animales de compañía.

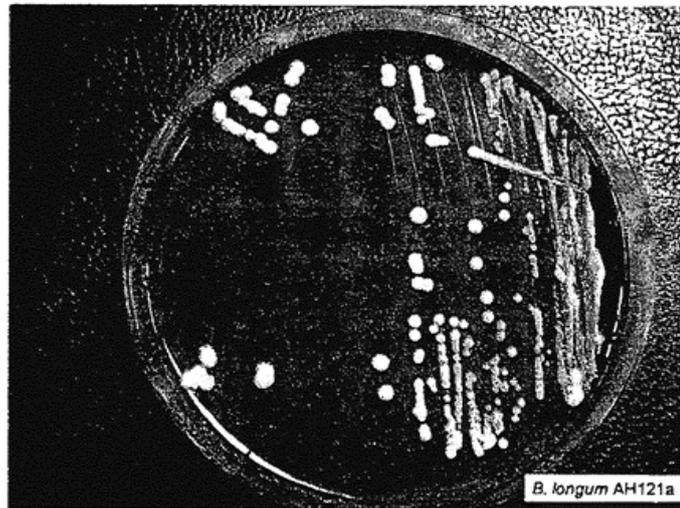


Fig. 1

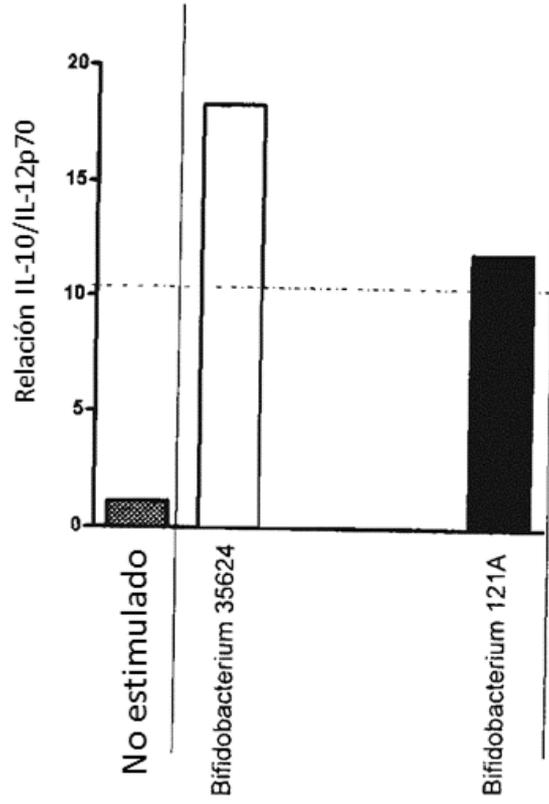


Fig. 2

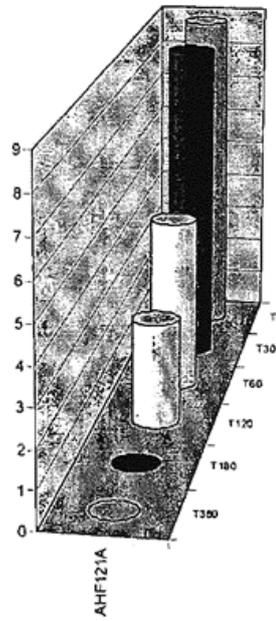


Fig. 3

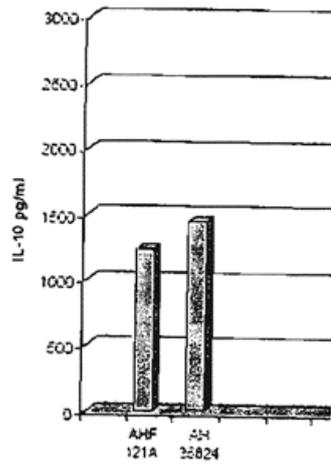


Fig. 4

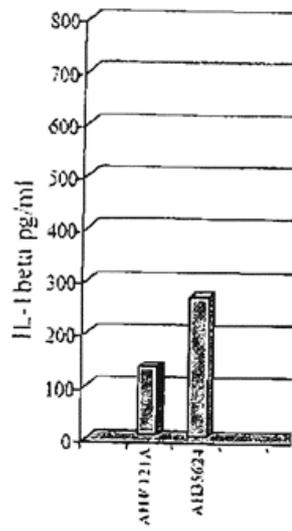


Fig. 5

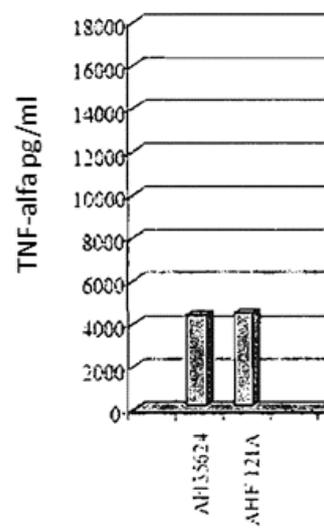


Fig. 6

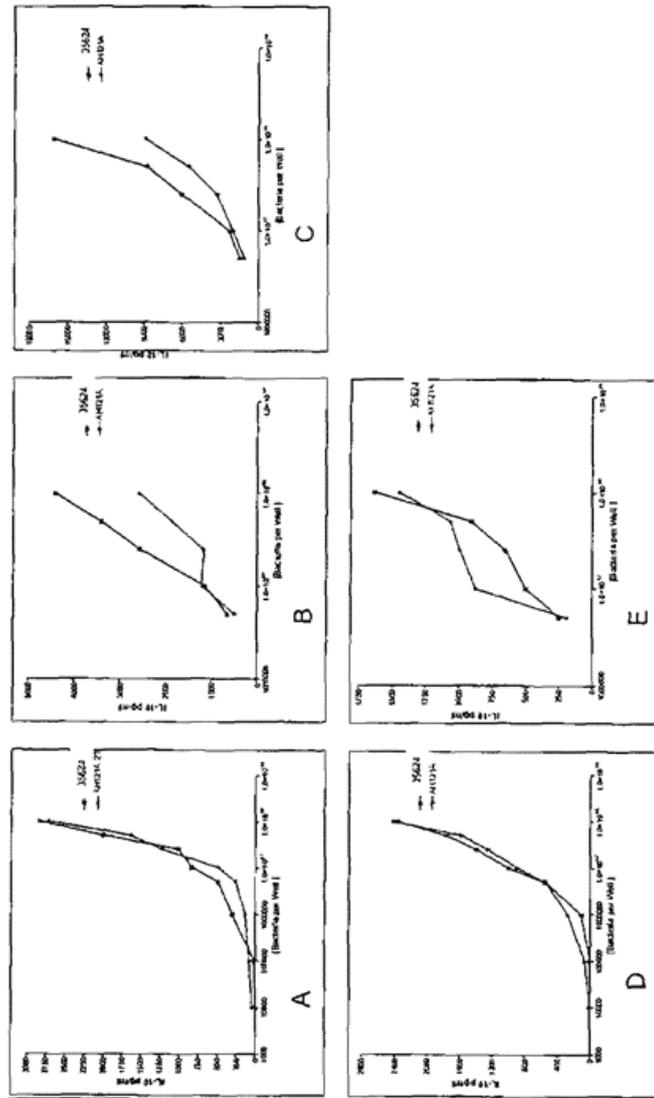


Fig. 7

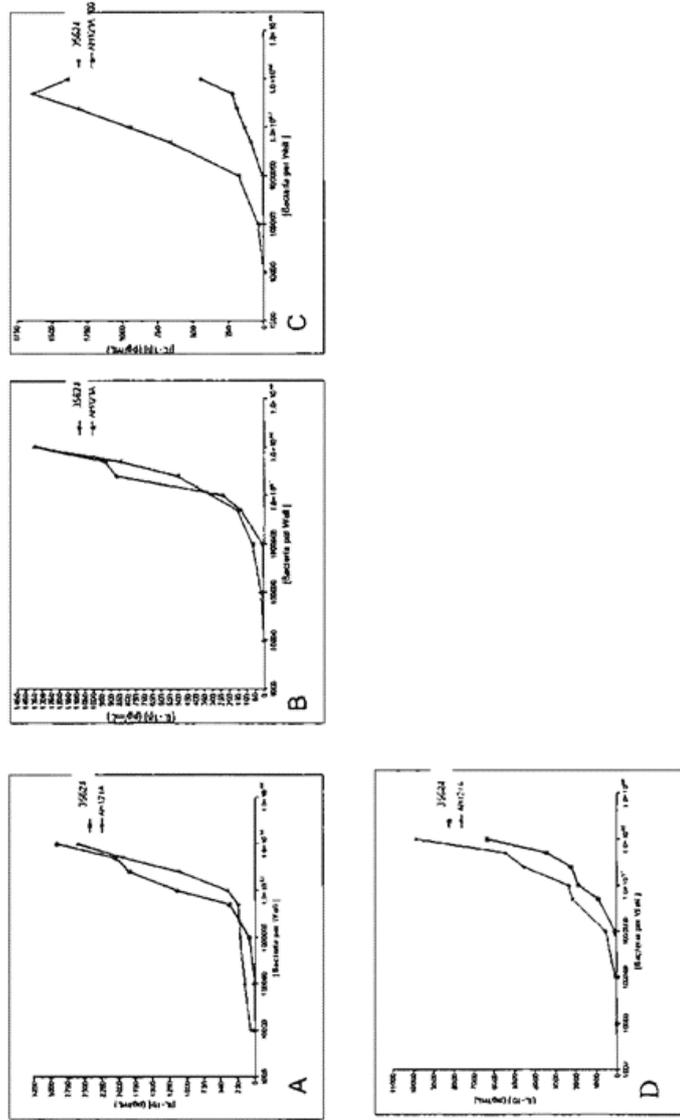


Fig. 8

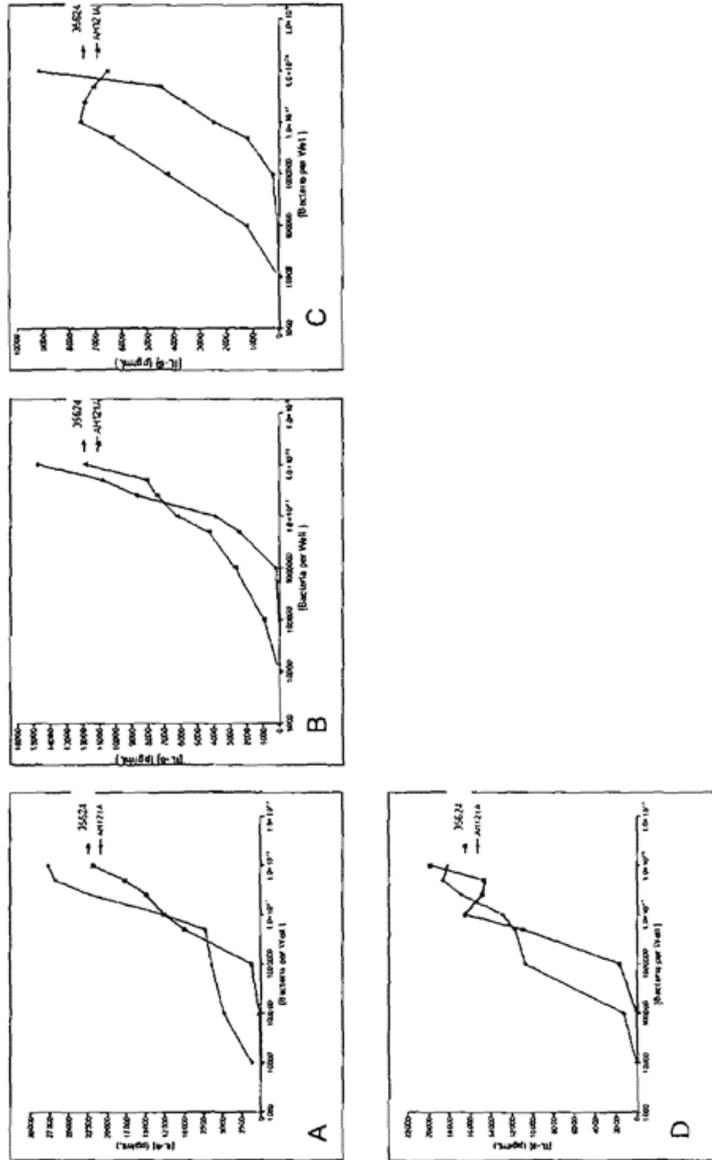


Fig. 9

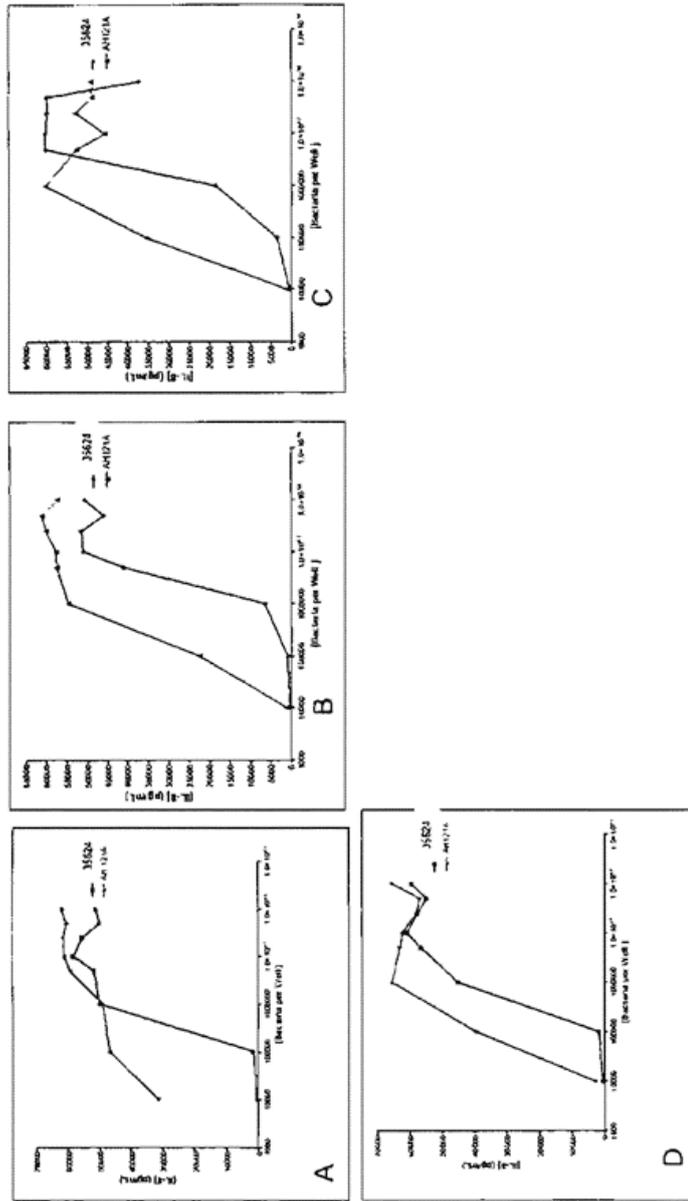


Fig. 10

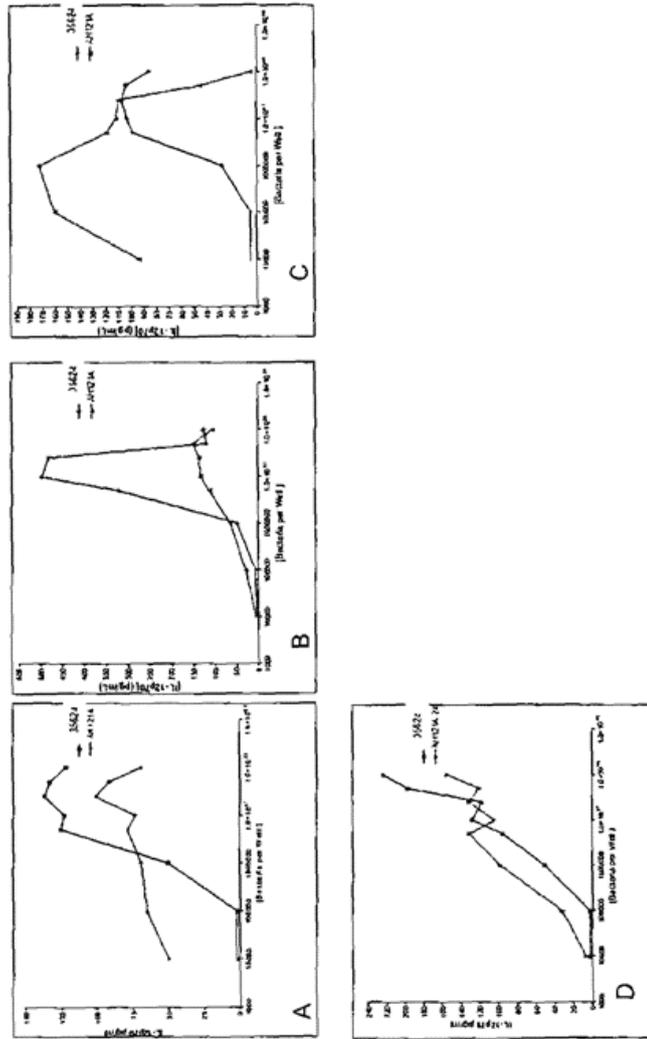


Fig. 11

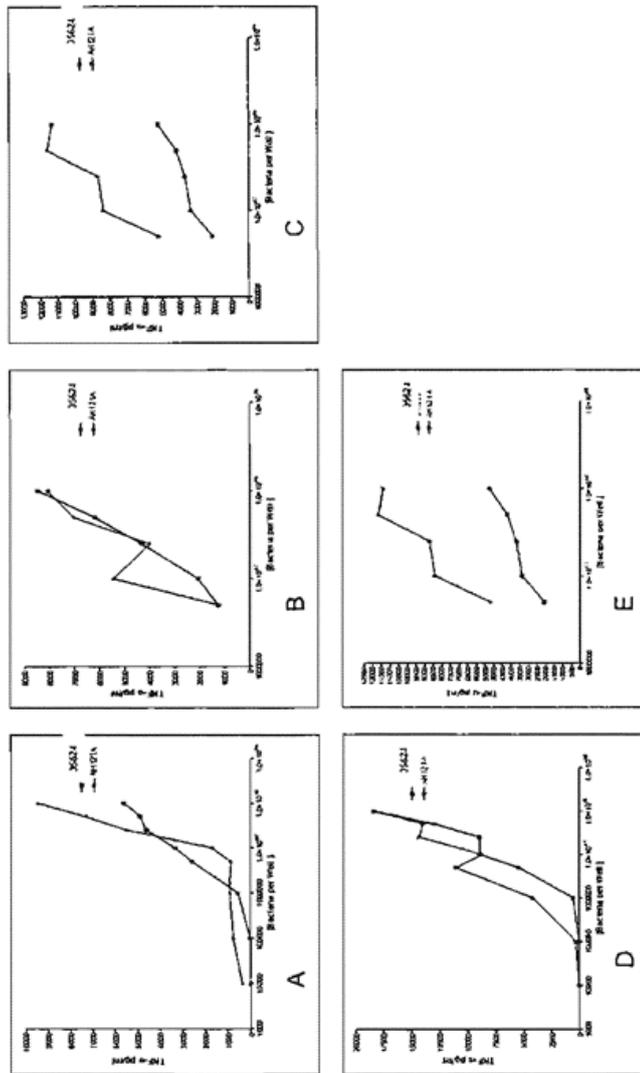


Fig. 12

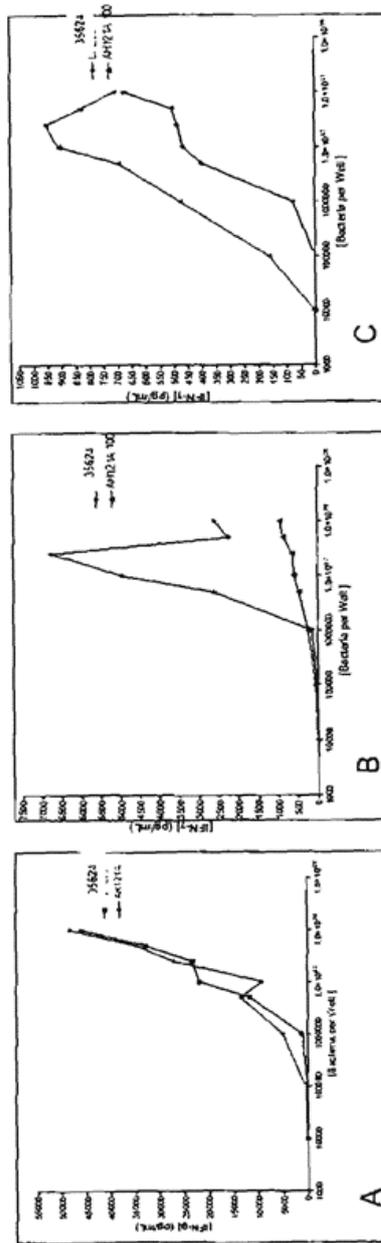


Fig. 13

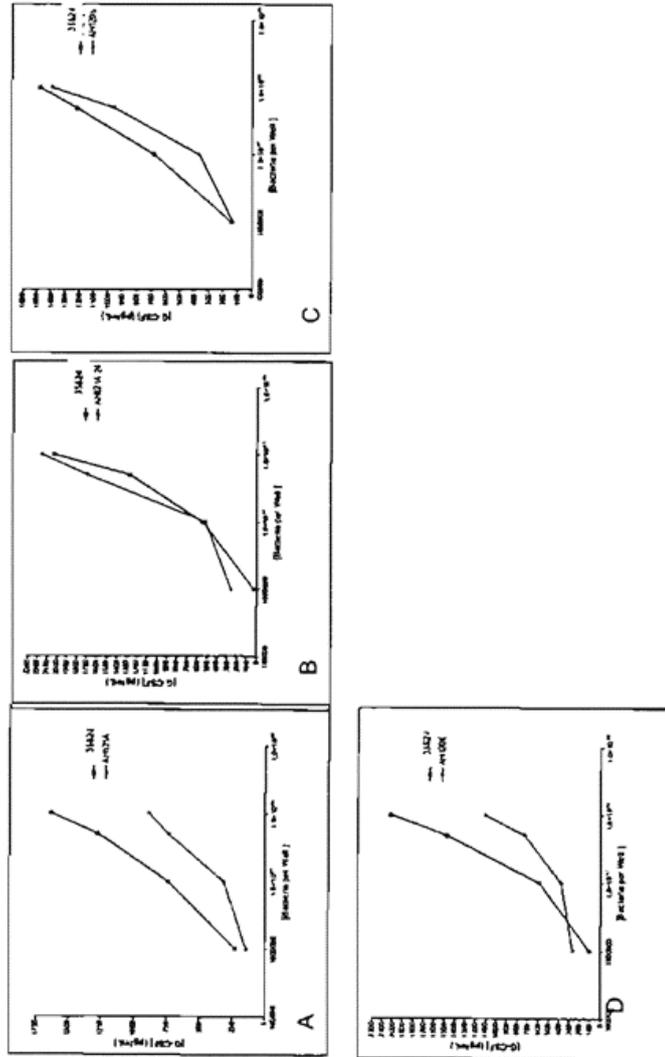


Fig. 14

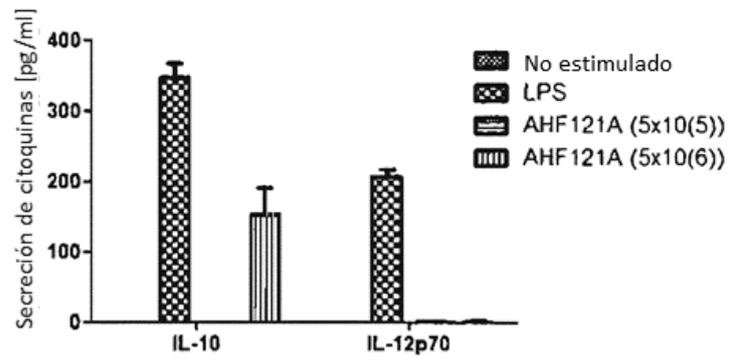


Fig. 15

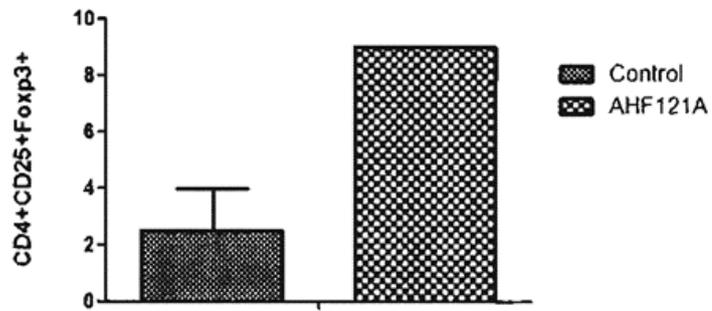


Fig. 16