

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 351**

51 Int. Cl.:

**C07H 5/06** (2006.01)

**A23L 33/135** (2006.01)

**A61K 31/715** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2008 PCT/IE2008/000054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.11.2008 WO08135959**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2008 E 08751340 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2176299**

54 Título: **Exopolisacárido de Bifidobacterium infantis 35624 (NICMB 41003)**

30 Prioridad:

**04.05.2007 US 924242 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2017**

73 Titular/es:

**ALIMENTARY HEALTH LIMITED (50.0%)  
2800 CORK AIRPORT BUSINESS PARK KINSALE  
ROAD  
CORK, IE y  
THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GRANT, RAYMOND, ALAN;  
O'MAHONY, LIAM y  
SHEIL, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 640 351 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

Exopolisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NICMB 41003)

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un exopolisacárido, y a su uso en el tratamiento y prevención de trastornos inflamatorios.

10 **Antecedentes de la invención**

El tracto gastrointestinal proporciona una zona intermedia protectora entre el medio interno y las agresiones constantes que ocasionan los antígenos derivados de los alimentos y de los microorganismos del medio externo (Sanderson y col., 1993). Se estima que el complejo ecosistema de la microflora intestinal de los adultos hospeda 15 500 especies de bacterias diferentes. Algunas de estas especies se consideran potencialmente perniciosas debido a la producción de toxinas, a la invasión de la mucosa, o a la activación de respuestas cancerígenas e inflamatorias (Salminen, 1998). Sin embargo, se han identificado cepas bacterianas con acción beneficiosa para la salud.

20 Los probióticos son bacterias beneficiosas que existen en la microflora del intestino sano y se han identificado como un grupo de organismos microbianos vivos que afectan de forma ventajosa a los animales huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal. Son "bacterias buenas" que se cultivan en condiciones de laboratorio y se usan para restablecer el equilibrio de la microflora que se ha alterado debido, por ejemplo, al estrés, a enfermedades, o como resultado del uso de antibióticos. Se ha demostrado algo importante, a saber, que la ingesta de bacterias probióticas 25 puede estabilizar la barrera inmunológica de la mucosa intestinal reduciendo la generación de citoquinas proinflamatorias locales (Isolauri, 1993; Majamaa, 1997). Se ha demostrado que la alteración de las propiedades de la microflora autóctona del organismo mediante terapia probiótica revierte alguna de las alteraciones características de la enfermedad de Crohn (Malin, 1996), alergia alimentaria (Majamaa, 1997), y eccema atópico 30 (Isolauri, 2000).

30 Una de las especies bacterianas predominantes presentes en la microflora intestinal es *Bifidobacterium*. En los intestinos, *Bifidobacterium* fermenta azúcares produciendo ácido láctico. El genoma de *Bifidobacterium longum* codifica muchas proteínas especializadas en el catabolismo de oligosacáridos, permitiendo que la bacteria utilice los llamados polímeros vegetales "no digeribles" o glucoproteínas y glucoconjugados derivados del huésped. Se piensa que la capacidad de *Bifidobacterium* IS de competir con otras bacterias gastrointestinales y ocupar un gran 35 porcentaje en la flora bacteriana de la región gastrointestinal puede ser debida en parte a la gran variedad de moléculas que es capaz de utilizar para obtener energía.

Mientras que *B. infantis*, *B. breve*, y *B. longum* son el grupo de bacterias más grande en los intestinos de los bebés, se piensa que las Bifidobacterias representan solamente el tercero o el cuarto grupo de bacterias en los adultos (y 40 solamente un 3-6 % de la flora fecal adulta). De hecho, la cantidad de estas bacterias en el cuerpo humano disminuye con la edad. En los bebés, las Bifidobacterias constituyen aproximadamente el 90 % de sus bacterias intestinales; sin embargo, esta cantidad es menor en los bebés alimentados con biberón. Cuando las dietas de los bebés alimentados con pecho se sustituyen por alimentos sólidos y leche de vaca, las Bifidobacterias se unen a una cantidad creciente de otras bacterias presentes en el cuerpo humano, tales como *Bacteroides* y *Streptococci* 45 *lactobacilli*.

Se ha demostrado que las Bifidobacterias intervienen en la modulación del sistema inmunológico. Se cree que *B. breve* libera metabolitos que ejercen un efecto anti-TNF capaz de atravesar la barrera intestinal. Se ha indicado que la inflamación de la mucosa de ratones con deficiencia en interleucina-10 (IL-10) se reduce alimentando los animales de 50 ensayo con un preparado de bacterias del ácido láctico (Madsen, K y col., 1997; O'Mahony y col., 2001; McCarthy y col., 2004). WO° 00/41168 describe una cepa de *Bifidobacterium infantis* aislada de tracto gastrointestinal humano resectado y lavado que tiene una capacidad de inmunomodulación significativa después del consumo oral en humanos.

Los estudios científicos indican una incidencia creciente de enfermedades que pueden estar causadas por una microflora 55 deficiente o comprometida (población microbiana residente natural del sistema digestivo) tales como las infecciones del tracto gastrointestinal (TGI), el estreñimiento, el síndrome del intestino irritable (SII), la enfermedad inflamatoria del intestino (EII), la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, las alergias alimentarias, la diarrea inducida por antibióticos, la enfermedad cardiovascular y determinados tipos de cáncer, tales como el cáncer colorrectal. Las pruebas indican que después del tratamiento con una sola cepa de *Bifidobacterium infantis*, se reduce la gravedad sintomática del SII 60 (Whorwell y col., 2006). La eficacia está asociada a la modulación de respuestas inmunológicas sistémicas que indican que el mecanismo de acción es mediado, en parte, por el sistema inmunológico (O'Mahony y col., 2005). La presente invención describe un compuesto aislado de *Bifidobacterium infantis* que reproduce la actividad inmunomoduladora de *Bifidobacterium infantis* *in vitro*.

65

**Afirmaciones de la invención**

La presente invención proporciona un polisacárido producido por *Bifidobacterium infantis* que muestra propiedades inmunomoduladoras. El polisacárido puede ser secretado (exopolisacárido) o no secretado.

5 Según un aspecto de la invención se proporciona un polisacárido aislado de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) que comprende la siguiente estructura:  $[-\beta](1,3)\text{-D-GalpNAc-}\beta(1,4)\text{-D-Glcp-}]_n$ .

10 El polisacárido se aísla de una cepa bacteriana de *Bifidobacterium*. La cepa es una cepa tal como NCIMB 41003.

Según otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un polisacárido de la invención de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) como medicamento.

15 Según otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un polisacárido de la invención de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la actividad inflamatoria no deseable.

20 Según otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un polisacárido de la invención de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable.

En una realización, la actividad inflamatoria gastrointestinal es la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome del intestino irritable, la pouchitis, la colitis postinfecciosa, la diarrea asociada a *Clostridium difficile*, la diarrea asociada a Rotavirus o la diarrea postinfecciosa.

25 Según otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un polisacárido de la invención procedente de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la artritis reumatoide.

30 Según otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un polisacárido de la invención procedente de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir trastornos autoinmunes.

Según otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un polisacárido de la invención procedente de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 En otra realización de la invención se proporciona también un producto alimenticio que comprende el polisacárido aislado de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003). Por ejemplo, el producto alimenticio puede ser uno o más seleccionados del grupo que comprende: yogures, cereales, bebidas y similares.

**Descripción detallada**

40 A continuación se describirán a modo de ejemplo no limitativo diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención.

45 La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, microbiología e inmunología, que forma parte de las capacidades del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican en la literatura.

Hemos identificado un exopolisacárido secretado por *Bifidobacterium* que tiene propiedades inmunomoduladoras.

50 Exopolisacárido

La presente invención se refiere a un exopolisacárido biosintetizado por *Bifidobacterium infantis*. Los polisacáridos son sintetizados por diversos microorganismos y son generalmente unidades repetitivas de azúcar que permanecen asociadas con la superficie celular o son secretadas, o las dos cosas. Desempeñan un papel en 55 ambas repuestas al estrés celular o pueden contribuir a la virulencia de un patógeno. Recientemente, se ha demostrado un papel inmunomodulador de polisacárido de *Bacteroides fragilis* (Mazmanian y col., 2005).

Tratamiento

60 Todas las referencias a tratamientos en la presente memoria incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico. Es especialmente preferido el tratamiento de mamíferos. Los tratamientos tanto humanos como veterinarios forman parte del ámbito de la presente invención.

65

Inflamación

La inflamación es una respuesta local a las lesiones celulares que se manifiesta por dilatación capilar, infiltración leucocitaria, rojez, calor, dolor, hinchazón y, frecuentemente, pérdida de función. El control de la respuesta inflamatoria se ejerce en numerosos niveles (a modo de revisión, ver, Henderson B., y Wilson M. 1998). Los factores de control incluyen citoquinas, hormonas (p. ej., hidrocortisona), prostaglandinas, intermedios de reacción y leucotrienos. Las citoquinas son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular que participan en la generación y control de respuestas inmunológicas e inflamatorias, regulando al mismo tiempo el desarrollo, reparación de tejidos y hematopoyesis. Proporcionan medios de comunicación entre los propios leucocitos así como con otros tipos de células. La mayor parte de las citoquinas son pleiotrópicas y expresan múltiples actividades biológicamente concomitantes.

Las cascadas y redes de citoquinas controlan la respuesta inflamatoria más que la acción de una citoquina específica en un tipo de célula específico (Arai KI, y col., 1990). La pérdida de la respuesta inflamatoria da lugar a concentraciones más bajas de las señales de activación apropiadas y otros mediadores inflamatorios que dan lugar al cese de la respuesta inflamatoria. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citoquina proinflamatoria primordial puesto que inicia una cascada de citoquinas y efectos biológicos que dan lugar al estado inflamatorio. Por lo tanto, los agentes que inhiben TNF $\alpha$  se utilizan en la actualidad para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, p. ej., int1iximab.

Se cree que las citoquinas proinflamatorias desempeñan un papel principal en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias, incluida la enfermedad inflamatoria del intestino (EII). Las terapias actuales para el tratamiento de la EII se dirigen a la reducción de los niveles de dichas citoquinas proinflamatorias. El exopolisacárido de la presente invención puede tener aplicación en el tratamiento de los trastornos inflamatorios, que puede lograrse, por ejemplo, aumentando la concentración de citoquinas no inflamatorias tales como, aunque no de forma limitativa, IL-10, y/o disminuyendo la concentración de citoquinas inflamatorias.

Enfermedad inflamatoria del intestino

La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) se caracteriza por una inflamación intestinal recidivante crónica. La EII se subdivide en los siguientes fenotipos: enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal, pero afecta con más frecuencia al íleon terminal y al colon. En aproximadamente el 10 % de los casos confinados al recto y al colon, no es posible establecer una clasificación definitiva de la enfermedad de Crohn o de la colitis ulcerosa y se utiliza la denominación "colitis intermedia". Ambas enfermedades incluyen inflamación extraintestinal de la piel, de los ojos o de las articulaciones.

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se clasifican habitualmente como enfermedades autoinmunes, ya que ambas enfermedades están marcadas por una respuesta anormal por parte del sistema inmunológico del cuerpo que da lugar a la inflamación crónica del revestimiento intestinal. La prevalencia de la enfermedad inflamatoria del intestino es mayor en individuos que padecen otras enfermedades autoinmunes, especialmente, espondilitis anquilosante, psoriasis, colangitis esclerosante, y esclerosis múltiple.

Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es un trastorno crónico que ocasiona la inflamación del tracto digestivo o tracto gastrointestinal en donde el sistema inmunológico ataca al intestino. Aunque la enfermedad de Crohn afecta con mayor frecuencia al extremo del íleon y al comienzo del colon, puede afectar a cualquier parte del tracto gastrointestinal. La inflamación del intestino es transmural y discontinua; puede contener granulomas o puede estar asociada a fistulas intestinales o perianales. Se cree que el gen CARD 15 y un alelo del gen ABCB1 están ligados a la susceptibilidad a padecer la enfermedad de Crohn.

Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa es una enfermedad que causa inflamación y úlceras en el revestimiento del intestino grueso. Es una enfermedad inflamatoria crónica no específica que afecta al intestino. Aparecen úlceras y sangrado en partes en las que la inflamación ha matado el revestimiento celular. A diferencia de la enfermedad de Crohn, la inflamación es continua y se limita a las capas de la mucosa rectal y colónica; no se observan fistulas ni granulomas.

En su etiología parecen desempeñar un papel importante factores tanto genéticos como ambientales. Fuss y col. examinaron células T de la lámina propia de pacientes con colitis ulcerosa y hallaron que producían cantidades significativamente mayores de IL13 y IL5 que las células de control o de la enfermedad de Crohn y poca cantidad de IPN-gamma. Concluyeron que la colitis ulcerosa está asociada a una respuesta atípica de Th2 mediada por células NKT no clásicas que producen IL13 y que tienen capacidad citotóxica para las células epiteliales.

Pouchitis

La inflamación crónica y/o aguda del reservorio ileal, conocida como reservoritis o “pouchitis”, es una complicación prolongada frecuentemente observada de la anastomosis del saco ileo-anal. En los pacientes con colitis ulcerosa, la prevalencia de la pouchitis varía desde un porcentaje inferior al 10 % a más del 40 %. La definición de “pouchitis” incluye síntomas clínicos, lesiones inflamatorias macroscópicas detectadas mediante endoscopia y pruebas histológicas de inflamación aguda intensa de la mucosa del reservorio.

Diarrea asociada a *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* es un bacilo gram-positivo anaeróbico formador de esporas aislado en primer lugar en 1935 de la flora fecal de neonatos sanos. Su asociación con colitis pseudomembranosa (CSM) inducida por antibióticos no se estableció hasta 1978. Casi todos los antibióticos se han asociado a la diarrea y la colitis producidas por *C. difficile*, incluidos la vancomicina y el metronidazol (que se usan para su tratamiento) y la quimioterapia utilizada contra el cáncer. La frecuencia de asociación se relaciona con la frecuencia de uso, la ruta de administración y el impacto de dicho antibiótico en la microflora colónica.

Síndrome del intestino irritable

El síndrome del intestino irritable (SII) es un trastorno crónico que interfiere en las funciones normales del intestino grueso (colon). Se caracteriza por un conjunto de síntomas, a saber, dolor abdominal en forma de calambres, hinchazón, estreñimiento y diarrea.

El SII ocasiona mucha incomodidad y sufrimiento, pero no daña los intestinos de forma permanente ni produce sangrado intestinal ni otras enfermedades graves tales como el cáncer. Los signos y síntomas del SII varían en gran medida de una persona a otra y concurren a menudo con muchas otras enfermedades.

Otros ingredientes activos

Se comprenderá que el exopolisacárido de la presente invención se puede administrar de forma profiláctica o como un método de tratamiento por sí solo o con otro u otros materiales probióticos y/o prebióticos. Además, las bacterias se pueden usar como parte de un régimen profiláctico o de tratamiento que usa otros materiales activos tales como los utilizados para tratar la inflamación u otros trastornos, especialmente los del tracto gastrointestinal. Dichas combinaciones se pueden administrar en una sola formulación o como formulaciones aparte administradas al mismo tiempo o en diferentes momentos y utilizando la misma o diferentes rutas de administración.

Composiciones farmacéuticas

Una composición farmacéutica es una composición que comprende o consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente farmacéuticamente activo. Incluye preferiblemente un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipientes (incluidas combinaciones de los mismos). Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences de Remington. La elección de vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticos se puede realizar atendiendo a la ruta prevista de administración y a la práctica farmacéutica habitual. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como vehículo excipiente o diluyente, o de forma adicional, cualquier aglutinante o aglutinantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento, agente o agentes solubilizantes.

Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones de sal, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácido graso, ésteres de ácidos grasos petroetiales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y similares.

Cuando resulte adecuado, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por cualquiera o cualesquiera de: inhalación, en forma de supositorio o pesario, de forma tópica en forma de loción, solución, crema, ungüento o polvo absorbente, mediante el uso de un parche para la piel, oralmente en forma de pastillas que contienen excipientes tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o se pueden inyectar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones se pueden utilizar mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o monosacáridos en cantidad suficiente para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones se pueden administrar en forma de comprimidos o pastillas que se pueden formular de un modo convencional.

Las exigencias de composición/formulación pueden ser diferentes dependiendo de los diferentes sistemas de suministro. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular para suministrarla utilizando una minibomba o mediante vía mucosal, por ejemplo, como spray o aerosol nasal para inhalar o como solución ingerible, o por vía parenteral, en la que la composición se formula de forma inyectable, para suministrarla, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. De forma alternativa, la formulación se puede diseñar para su administración por ambas vías.

A continuación se describirán a modo de ejemplo no limitativo y con referencia a las figuras adjuntas otras características y realizaciones preferidas de la presente invención.

La Figura 1 muestra el esquema de purificación de exopolisacárido CPS 1) a partir de los medios acondicionados producidos por *Bifidobacterium* 35624 (NCIMB 41003).

La Figura 2 muestra la estructura del exopolisacárido (PS 1) producido por *Bifidobacterium* 35624 (NCIMB 41003).

La Figura 3 ilustra que el exopolisacárido (PS 1) purificado de *Bifidobacterium* 35624 [NCIMB 41003] presenta actividad inmunomoduladora cuando se incubaba *in vitro* junto con células mononucleares de sangre periférica humana.

La Figura 4 muestra que el PSI limita la liberación de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la estimulación por el receptor de tipo Toll 4 (TLR-4) *in vitro*.

La Figura 5 muestra que el PS 1 limita la liberación de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la estimulación por el receptor de tipo Toll 4 (TLR-4) *in vivo*.

La Figura 6 muestra que el PS 1 limita la liberación de citoquinas proinflamatorias en respuesta a la restimulación por el receptor de tipo Toll 4 (TLR-4) *in vitro*.

La cepa *Bifidobacterium* 35624 (NCIMB 41003) cepa se describe en WO 00/42 168. La cepa se depositó en el NCIMB el 13 de enero de 1999.

**Ejemplo 1 - Purificación y determinación de la estructura del exopolisacárido (PS<sub>t</sub>) del medio acondicionado producido por *Bifidobacterium* 35624.**

**Purificación.** Se colocaron 100 ml de medio MRS estéril (CM359 MRS Broth, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) suplementado con cisteína al 0,05 % (peso/volumen) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml estéril inoculado con *Bifidobacterium* 35624. Se incubó el medio inoculado en condiciones anaeróbicas (10-01 Pack-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Company-America, New York, NY) a 37 °C sin agitación. Se utilizó una muestra de medio MRS no inoculado como Control de Medios y se procesó de la misma forma que la muestra inoculada para todos los procedimientos abajo detallados.

Tras 48 h de crecimiento, el cultivo de *Bifidobacterium* 35624 había alcanzado la fase estacionaria y presentaba una OD 600 nm de aproximadamente 3 (2-3 X 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias/ml). Se transfirieron los cultivos a tubos de centrifuga de policarbonato y se centrifugaron a 40.000 X g durante 30 mm (rotor JA-20, centrifuga Beclanan J2-21, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA), dando lugar a un sobrenadante transparente y a un microgránulo celular denso. El sobrenadante (medio acondicionado) se retiró cuidadosamente y se utilizó en la purificación del exopolisacárido (EPS). Se desechó el microgránulo celular.

El procedimiento de purificación para el EPS a partir del medio acondicionado producido por *Bifidobacterium* 35624 se muestra en la Figura 1. Salvo que se indique lo contrario, todas las etapas se efectuaron sobre hielo o a 4 °C. Se introdujeron 80 ml del sobrenadante de cultivo en un dispositivo de ultrafiltración que tenía un umbral de peso molecular (PM) de 100.000 Daltons (concentrador VC1042 Vivacell de 100 ml, Vivascience, Hanóver, Alemania). Se concentraron las muestras mediante centrifugación a 2000 X g en una centrifuga de uso clínico. Cuando el volumen alcanzó aproximadamente 0,5 ml, se sometió una vez la fracción retenida (fracción de HiMW) a diafiltración utilizando tampón fosfato salino (PBS) y se volvió a concentrar a aproximadamente 0,5 ml. Se transfirió la fracción retenida a un tubo de centrifuga de 15 ml estándar. El dispositivo de ultrafiltración se aclaró con 4 ml de PBS, y este lavado se juntó con la fracción retenida para obtener la fracción retenida de HiMW.

Se añadió una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 100 % a la fracción retenida de alto peso molecular hasta llegar a una concentración final del 20 % (volumen/volumen) de TCA. Se incubaron las muestras durante 2 h sobre hielo y a continuación se centrifugó a 8000 X g durante 20 min (rotor JA-20). El sobrenadante que contenía el EPS se transfirió a un tubo Corex de 30 ml. Se desechó el microgránulo que contenía proteínas. El sobrenadante que contenía el EPS se trató con 3 volúmenes de etanol al 95 % enfriado en hielo y se incubó durante la noche a -20 °C. A continuación se centrifugaron los tubos a 8000 X g durante 20 min (rotor JA-20). Se desechó el sobrenadante. El microgránulo que contenía el EPS se volvió a suspender en 5 ml de PBS y a continuación volvió a precipitarse con 3

volúmenes de etanol, del modo arriba indicado. El microgránulo se secó al aire sobre hielo durante 60 min y a continuación se volvió a suspender en 9 ml de  $MgCl_2$  10 mM: Tris-HCl 50 mM (pH 7,4).

Para retirar ácidos nucleicos, se añadieron desoxirribonucleasa I (LS006331, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) y ribonucleasa A (R5250, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) a concentraciones finales de 0,1 mg/ml y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Se retiraron las proteínas residuales añadiendo proteinasa K (P2308, Sigma-Aldrich) hasta una concentración final de 0,02 mg/ml y se incubó la mezcla durante 2 h a 37 °C. La proteinasa K se desactivó mediante incubación durante 15 min a 570 °C, seguida de la adición de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (P7626, SigmaAldrich) a una concentración final de 0,2 mM durante 15 min a temperatura ambiente. El EPS purificado se precipitó desde la solución mediante adición de 3 volúmenes de etanol, del modo arriba indicado. Se volvió a suspender el microgránulo en 9 ml de solución salina tamponada con fosfato. La muestra resuspendida se introdujo en tubos de diálisis SnakeSkin (68035, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) con un umbral de peso molecular de 3500 y se dializó frente a 7 litros de agua (2 cambios) durante 48 h a 4 °C.

Se retiró una pequeña alícuota de la muestra dializada para la cuantificación de la cantidad de polisacárido presente utilizando el método estándar del fenol/ácido sulfúrico de Dubois y col. (Anal. Chem. 28, 350-356 (1956)). Una vez determinada la concentración del EPS, se realizaron alícuotas adecuadas, se congelaron sobre hielo seco, y se liofilizaron a sequedad. El material liofilizado se almacenó a - 80 °C.

**Análisis RMN.** Se llevaron a cabo análisis de resonancia magnética nuclear de protones ( $^1H$ -NMR) con un espectrómetro Varian Inova 600-MHz (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA). Las muestras liofilizadas se disolvieron en  $D_2O$ , y tras dejar que se produjera un intercambio extensivo de deuterio, se obtuvieron los espectros a 25 °C. Los desplazamientos químicos se compararon con una referencia interna de TSP. Se recogieron datos de espectroscopía de correlación de  $^1H$ - $^1H$  (COSY), espectroscopía de correlación total (TOCSY), espectroscopía de efecto nuclear Overhauser (NOESY) y espectroscopía de correlación heteronuclear de cuantos simples protón-carbono (HSQC) en modos sensibles a la fase utilizando cuadratura de States-Haberhorn-Ruben. Todas las secuencias de pulso fueron proporcionadas por el proveedor del espectrómetro y se utilizaron sin modificaciones. Se aplicó una presaturación de baja potencia a la señal de H<sub>2</sub>O residual. De forma típica, se recogieron series de datos con 512 puntos de tiempo 2048 puntos de datos complejos, y 16-32 barridos/incremento. El programa de pulso TOCSY contenía una secuencia de mezclado de MLEV-17 de 60 ms, y el tiempo de mezclado de NOESY fue de 150 ms.

**Análisis de carbohidratos.** Se llevaron a cabo análisis de composición glicosídica mediante cromatografía de gas/espectroscopía de masas combinada (GC/MS) de los derivados de per-O-trimetilsililo (TMS) de los metilglucósidos de monosacárido producidos a partir de EPS de *Bifidobacterium* 35624 mediante metanólisis ácida (York y col., (1986); Merkle, R. K. y Poppe, I. 1994). Para el análisis de enlaces glucosídicos, la muestra de EPS se permetiló, se despolimerizó, se redujo y se acetiló. Los acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA) resultantes se analizaron mediante GC-MS como se ha descrito previamente (York y col., (1986); Merkle y Poppe (1994)).

#### Determinación de la estructura del EPS.

El EPS purificado se analizó utilizando  $^1H$ -NMR. Los espectros mostraron que este material estaba compuesto exclusivamente de carbohidrato; no había indicación de ácido nucleico, proteína, lípido, o pequeños contaminantes orgánicos. Análisis mediante RMN bidimensional (RMN-2D) utilizando experimentos conocidos en la técnica y anteriormente descritos pusieron de manifiesto que la mayoría del carbohidrato presente comprendía un polisacárido lineal que consistía en repeticiones de disacárido. En combinación con datos obtenidos a partir del análisis de la composición de los enlaces, la estructura de este polisacárido (denominado PSI) es  $[-\beta(1,3)\text{-D-N-acetilgalactosamino piranosil} - \beta(1,4)\text{-D-glucopiranosil-}]_n$ , donde n indica que esta unidad disacárida se repite n veces, dando lugar a un polisacárido que tiene un peso molecular superior a 100.000 Daltons. La estructura de PSI se puede abreviar como  $[-\beta](1,3)\text{-D-GalpNAc-}\beta(1,4)\text{-D-Glcp-}]_n$  y se muestra en la Figura 2. No se detectó PSI en la muestra de Medio de Control.

#### Ejemplo 2 - El exopolisacárido de *B. infantis* 35624 (PSI) tiene actividad inmunomoduladora cuando se incuba conjuntamente con células del sistema inmunológico humano *in vitro*.

Se sometieron a ensayo fracciones de EPS utilizando ensayo de inducción de citoquinas de PBMC (célula mononuclear de sangre periférica). En este ensayo, se aislaron PBMC de la sangre mediante separación por gradiente de densidades y se incubaron durante 72 horas a 37 °C (en presencia de penicilina y estreptomycin) con medios de control, o con concentraciones crecientes de PS 1 purificado de *B. infantis* 35624. Los sobrenadantes se sometieron a ensayo para determinar los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  y FN- $\gamma$  utilizando kits de Mesoscale Discovery (MSD) y se analizaron utilizando un lector de placas MSD.

La Figura 3 ilustra los resultados de este ensayo. PS1 estimulaba la secreción de todas las citoquinas sometidas a ensayo cuando se estimuló las PBMC con 1 – 5 µg/ml de PS1. La actividad estimuladora de citoquinas se redujo con niveles de fondo en el caso de muchas citoquinas cuando se utilizó 10 µg/ml de PS1.

5 Además de someter a ensayo el resto de PBMC, se utilizó el ligando de TLR-4 lipopolisacárido (LPS) para activar PBMC con o sin estimulación de PSI. Puesto que se observó que 5 µg/ml de PS1 era una dosis óptima en experimentos preliminares, se utilizó esta dosis en ensayos posteriores. Estos resultados se ilustran en la Figura 4 como el valor de citoquina medio para células estimuladas con LPS + PS1 menos el valor de citoquinas para las células estimuladas con LPS solo. Cuando se incubaron conjuntamente con PS1, las PBMC estimuladas con LPS secretan una cantidad sustancialmente inferior de IL-6 y una cantidad significativamente inferior de IL-8, TNF-α y IFN-γ.

**Ejemplo 3 - El exopolisacárido (PSI) de *B. infantis* 35624 tiene actividad antiinflamatoria cuando se inyecta en un modelo murino de sepsis.**

15 Se inyectó PS1 por vía i.p. en ratones sanos y se hizo un seguimiento de estos ratones durante 24 horas. No se observaron signos de sufrimiento, lo que indicaba que este polisacárido era bien tolerado por los animales y el PS1 no indujo sepsis ni respuesta proinflamatoria.

20 Después del período de observación de 24 horas, se inyectó a los animales por vía i.p. lipopolisacárido (LPS) para inducir una respuesta de tipo sepsis. Al cabo de 2 horas se sacrificaron todos los animales y se midió *in vitro* la secreción de citoquina de esplenocito. Los esplenocitos aislados de ratones tratados con PS1 + LPS liberaban una cantidad de INF-a significativamente inferior en comparación con los ratones que recibieron solamente LPS (Figura 5). Además, los esplenocitos de dichos animales se volvieron a estimular con LPS *in vitro* y de nuevo se observó una respuesta de citoquina proinflamatoria menos aguda en esplenocitos obtenidos de animales previamente expuestos a PS1 (Figura 6).

Tomados conjuntamente, estos datos muestran que EPS1, derivado de *Bifidobacterium infantis* 35624 tiene actividad inmunomoduladora árida protege frente a respuestas inflamatorias mediadas por LPS o TLR-4.

30 Aunque la experimentación anterior describe el exopolisacárido (PS 1) secretado, se prevé que una forma no secretada del exopolisacárido, por ejemplo, una célula asociada o membrana asociada/unida o forma capsular del exopolisacárido, se comportaría de un modo similar al EPS secretado. Los experimentos descritos en la presente memoria se diseñaron para examinar el EPS secretado, pero al experto en la técnica le resultará evidente que una parte del EPS secretado se puede unir a la célula (por ejemplo, asociado a la célula o capsular) durante la preparación del EPS y antes del transporte o liberación del EPS desde la célula.

La invención no se limita a las realizaciones arriba descritas, cuyos detalles se pueden modificar.

40 Referencias bibliográficas

Arai KI, y col., Annu Rev Biochem 59: 783-836, 1990  
 Fuss y col., "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis." Inflamm Bowel Dis. 2005 Jan; 11(1):74-5  
 45 Henderson B., y Wilson M. In "Bacteria-Cytokine interactions in health and disease",  
 Isolauri y col., Clin Exp Allergy 30: 1605-1 0, 2000  
 Isolauri y col. Pediatr Res. 33: 548-53, 1993  
 Madsen y col., Gastroenterology 112:A1030, 1997  
 Majamaa y col., J Allergy Clin Immunol 99: 179-86, 1997  
 50 Malin y col., Br J Rheumatol 35:689-94, 1996  
 McCarthy y col., Gut 53:694-700, 2004  
 Mazmanian y col., Cell 122:107-118, 2005  
 Merkle y Poppe Methods Enzymol. 230: 1-15, 1994  
 O'Mahony y col., Aliment Pharmacol Ther 15:1219-25, 2001  
 55 O'Mahony y col., Gastroenterology 128:541-51, 2005  
 Portland Press, 79-130, 1998  
 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. 1985 (Editor: A.R. Gennaro)  
 Salminen, Int J Food Microbiol 20:93-106, 1998  
 Sanderson y col., Gastroenterology 104:622-39, 1993  
 60 Whorwell y col., Am J Gastroenterol 101:1581-90, 2006  
 York y col., Methods Enzymol. 118:3-40, 1986

**REIVINDICACIONES**

1. Un polisacárido aislado de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) que comprende la estructura **[- $\beta$ (1,3)-D-GalpNAc- $\beta$ (1,4)-D-Glcp-]<sub>n</sub>.**
2. El polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según la reivindicación 1 en donde n es tal que el peso molecular del polisacárido es superior a 100.000 Daltons.
3. El polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para usar en terapia.
4. El polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para usar en el tratamiento o prevención de la actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable.
5. El polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) para el uso de la reivindicación 4, en donde la actividad inflamatoria gastrointestinal es la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome del intestino irritable, la pouchitis, la colitis postinfecciosa, la diarrea asociada a *Clostridium difficile*, la diarrea asociada a Rotavirus o la diarrea postinfecciosa.
6. Uso de un polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir la actividad inflamatoria no deseable.
7. Uso según la reivindicación 6, en donde la actividad inflamatoria no deseable es actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable.
8. Uso según la reivindicación 7 en donde la actividad inflamatoria gastrointestinal es la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el síndrome del intestino irritable, la pouchitis, la colitis postinfecciosa, la diarrea asociada a *Clostridium difficile*, la diarrea asociada a Rotavirus o la diarrea postinfecciosa.
9. Uso según la reivindicación 6, en donde la actividad inflamatoria no deseable es artritis reumatoide.
10. Uso de un polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en la preparación de un medicamento para tratar o prevenir trastornos autoinmunes.
11. Una composición farmacéutica que comprende un polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según las reivindicaciones 1 a 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un producto alimenticio que comprende un polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
13. Un producto alimenticio que comprende un polisacárido de *Bifidobacterium infantis* 35624 (NCIMB 41003) según la reivindicación 12 en donde el producto alimenticio es uno o más seleccionados del grupo que comprende: yogures, cereales, bebidas.

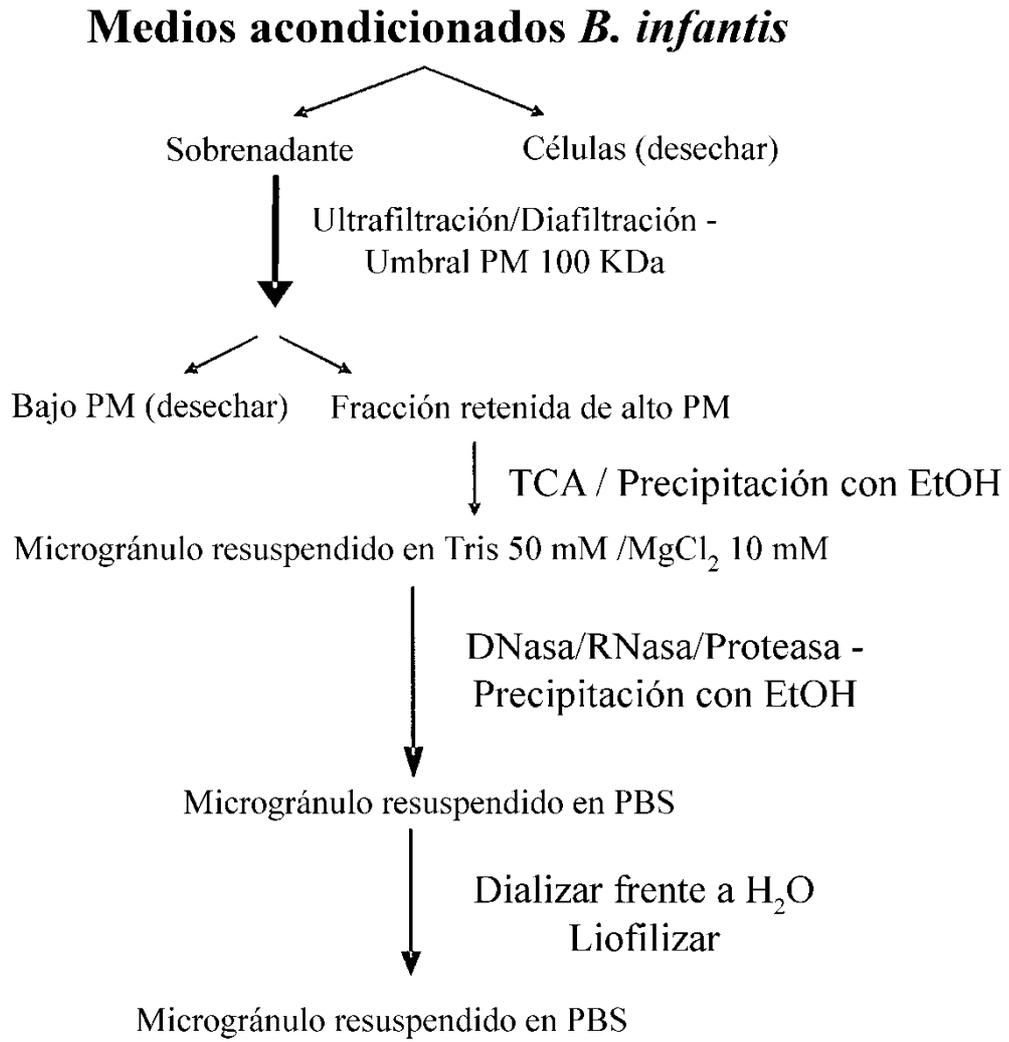


Fig. 1

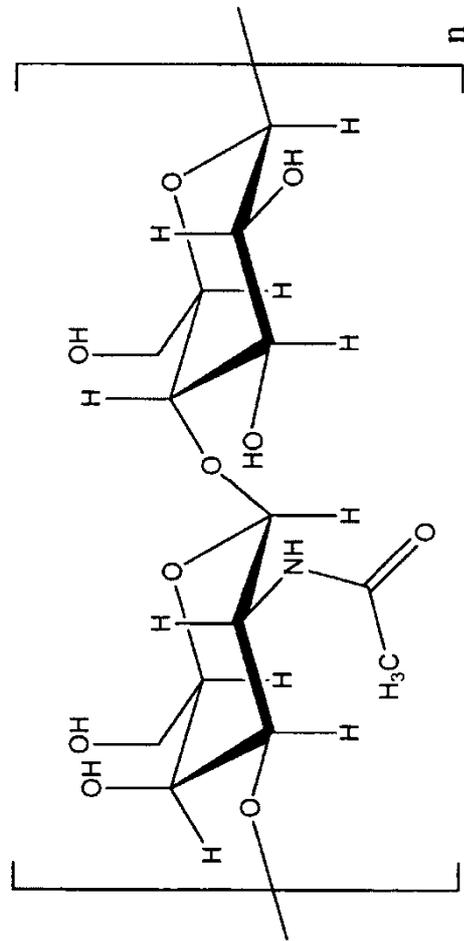


Fig. 2

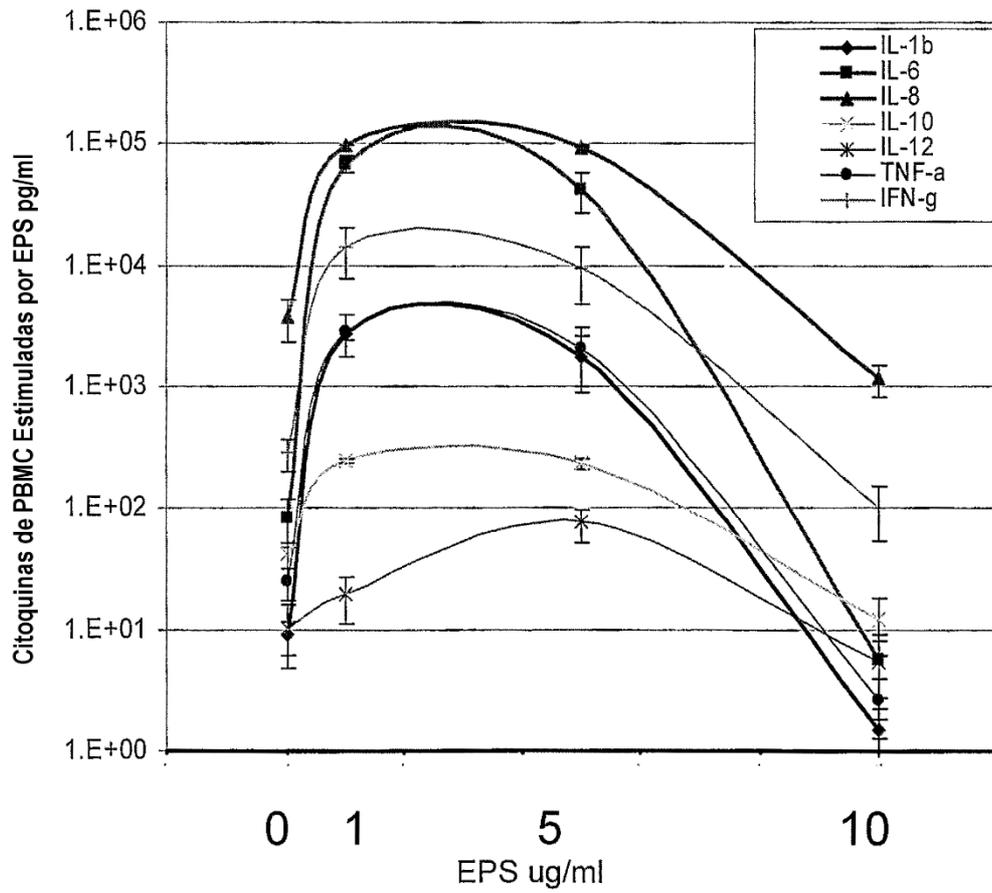
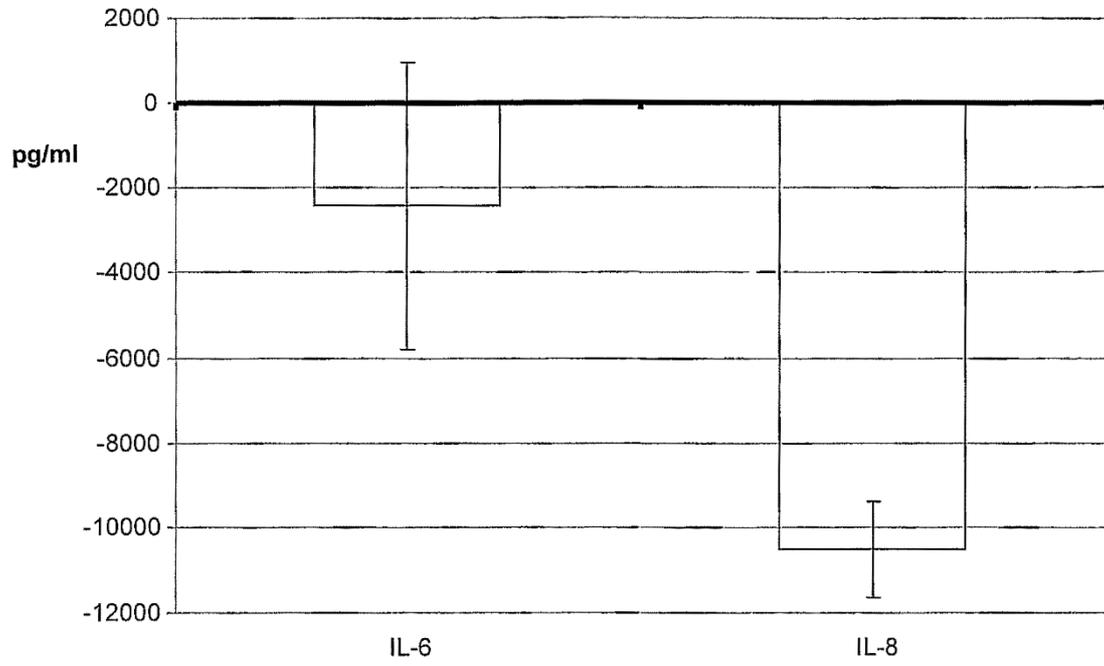


Fig. 3

(a)



(b)

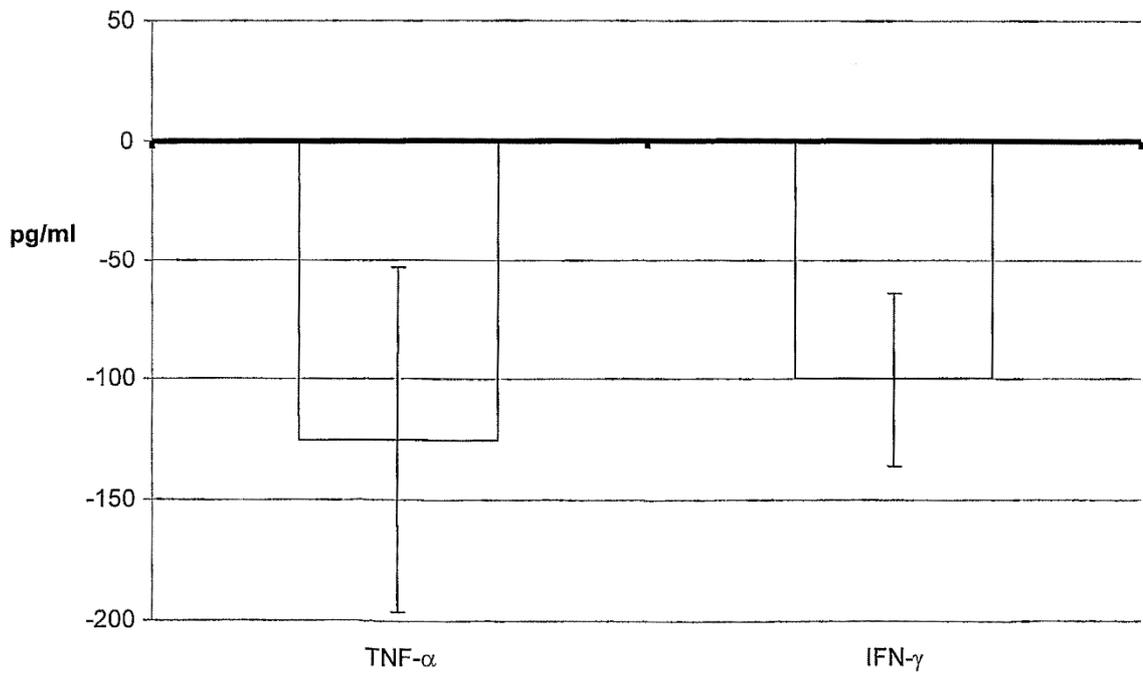


Fig. 4

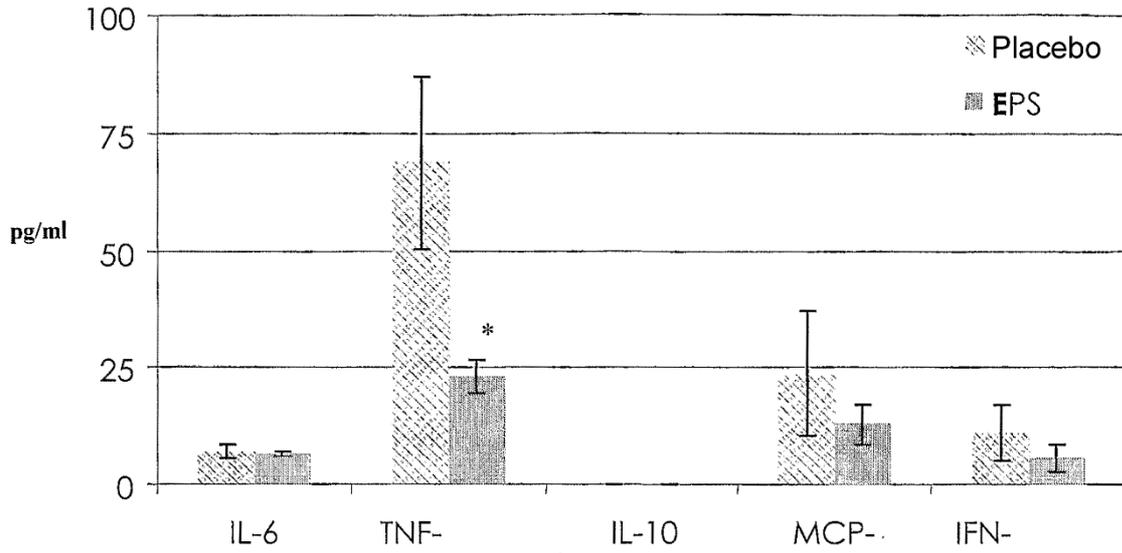


Fig. 5

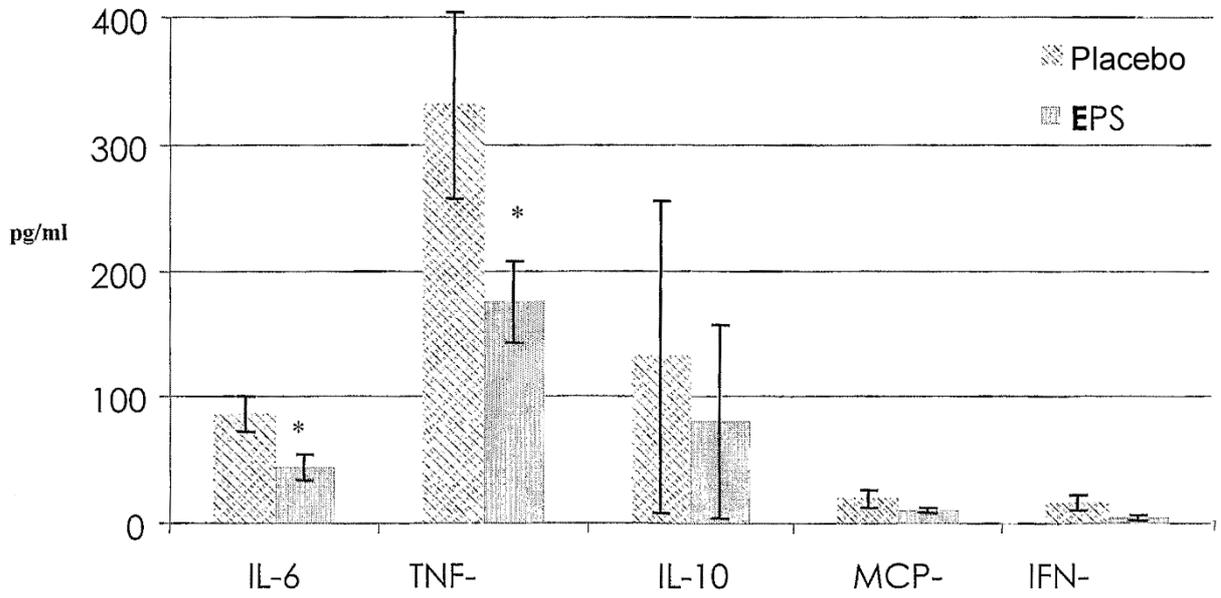


Fig. 6