(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 752 798**

(21) Número de solicitud: 201830961

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A23L 33/135 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

05.10.2018

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

06.04.2020

(71) Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (50.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES;
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNANDEZ DE ELCHE (12.5%);
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED (CIBER) (12.5%) y
FUNDACIÓN DE LA C.V. PARA LA GESTIÓN DE INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE ALICANTE (25.0%)

(72) Inventor/es:

SANZ HERRANZ, Yolanda;
BENITEZ-PÁEZ, Alfonso;
GÓMEZ DEL PULGAR VILLANUEVA, Eva Mª;
FRANCÉS GUARINOS, Rubén;
GÓMEZ-HURTADO CUBILLANA, Isabel;
PIÑERO ROMERO, Paula y
JUANOLA JUÁREZ, Oriol

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

(54) Título: **Cepa de Bifidobacterium longum sub. infantis y uso de la misma**

(57) Resumen:

Cepa de Bifidobacterium longum sub. infantis y uso de la misma.

La presente invención se refiere a la cepa Bifidobacterium longum sub. infantis CECT 9720, a sus componentes celulares, metabolitos, y moléculas secretadas, y a composiciones que comprenden los productos anteriores, así como al uso de dicha cepa para la prevención y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales e inflamación de hígado, así como patologías derivadas, como por ejemplo la cirrosis de higado.

ES 2 752 798 A1

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Bifidobacterium longum sub. infantis* y uso de la misma

La presente invención se refiere a la cepa *Bifidobacterium longum sub. infantis* CECT 9720, a sus componentes celulares, metabolitos, y moléculas secretadas, y a composiciones que comprenden los productos anteriores, así como al uso de dicha cepa para la prevención y/o tratamiento de enfermedades que cursan con inflamación intestinal y/o hepática, así como patologías derivadas de las mismas, como, por ejemplo, la cirrosis hepática. La presente invención se encuadra dentro del campo de la actividad terapéutica de composiciones o preparaciones farmacéuticas, así como dentro del campo de la alimentación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El ser humano alberga cerca de 10 trillones de bacterias intestinales, y su genoma tiene una capacidad codificante muy superior a la del humano (unas 100-150 veces superior). El tracto gastrointestinal es el área de superficie más grande del cuerpo con una superficie epitelial de aproximadamente 400 m^2, en constante exposición a estos microorganismos vivos. La simbiosis existente, demostrada por la falta de respuesta pro-inflamatoria contra bacterias comensales (Littman D. R. *et al.* Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell host & microbe* 2011; 10(4): 311-23; Hooper L. V. et al J. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336(6086): 1268-73) implica la presencia de líneas de comunicación claramente definidas. La literatura reciente sugiere que los organismos del tracto gastrointestinal desempeñan un papel indispensable en el mantenimiento dela homeostasis del hospedador (Wu G. D. *et al.* Analysis of the human gut microbiome and association with disease. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 2013; 11(7): 774-7). Las alteraciones en la microbiota intestinal parecen tener un papel en la patogénesis y la progresión de varias enfermedades, incluyendo por ejemplo, las hepáticas y gastrointestinales.

Más concretamente, se ha demostrado que la microbiota intestinal tiene un papel directo en la progresión y desarrollo de complicaciones en enfermedad hepática (Bajaj.

J. S. *et al.* Linkage of gut microbiome with cognition in hepatic encephalopathy. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2012; 302(1): G168-75; Bajaj J. S. *et al.* Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2012; 303(6): G675-85; Chen Y. *et al.* Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis. Hepatology 2011; 54(2): 562-72).

La cirrosis es la etapa final común de diferentes enfermedades hepáticas caracterizada por una distorsión histológica del hígado con presencia de nódulos regenerativos que provocan hipertensión portal (Bosch J. et al Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterology clinics of North America* 1992; 21(1): 1-14). Este hecho, a su vez, altera la motilidad intestinal induciendo sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) (Morencos F. C.*et al.* Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Digestive diseases and sciences* 1995; 40(6): 1252-6; Pande C. Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2009; 29(12): 1273-81; Bauer T. M. *et al.* Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(10): 2962-67). En concreto, en pacientes con cirrosis existe un sobrecrecimiento de bacterias potencialmente patógenas (p.ej. especies Gram negativas), y un descenso en familias bacterianas autóctonas. La estrecha relación entre las complicaciones más frecuentes que surgen en los pacientes con cirrosis y la microbiota intestinal (edesma F. Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. *Digestive diseases and sciences* 1995; 40(6): 1252-6; Pande C. *et al.* Small-intestinal bacterial overgrowth in cirrhosis is related to the severity of liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2009; 29(12): 1273-81; Bauer T. M. *et al.* Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis: prevalence and relation with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(10): 2962-67; Chang C. S. *et al.* Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 1998; 28(5): 1187-90) se ha estudiado intensamente en los últimos años y ha resaltado la importancia de la constante comunicación entre el intestino y el hígado durante el manejo de pacientes con cirrosis (Garcia-Tsao G. *et al.* Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(2): 353-72). Las complicaciones

como la encefalopatía hepática (EH), peritonitis bacteriana espontánea (PBE) y la hemorragia por varices en los pacientes cirróticos están directamente causadas o agravadas por la translocación de microbiota entérica o sus productos a territorios extraintestinales.

Ahondando en lo anterior, la comunicación directa entre el hígado y el intestino a través de la circulación portal denominada “eje hígado-intestino”, juega un papel importante en la progresión de las complicaciones de la cirrosis, siendo la microbiota intestinal un regulador clave de la inflamación y la traslocación bacteriana en este contexto (Garcia-Tsao G. *et al.* Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18(2): 353-72).

Por otra parte y en relación a la enfermedad intestinal, es también ampliamente conocido que la microbiota intestinal tiene un papel directo en la progresión y desarrollo de complicaciones en esta patología. Así, por ejemplo, las endotoxinas son moléculas inmunogénicas derivadas de las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas presentes en la microbiota intestinal, que pueden sobre-activar el sistema inmune innato y romper la homeostasis inmunológica y la función barrera intestinal. (Rodes L. et al. Microencapsulated *Bifidobacterium longum subsp. infantis* ATCC 15697 Favorably Modulates Gut Microbiota and Reduces Circulating Endotoxins in F344 Rats. *BioMed Research International*. Volume 2014, Article ID 602832, 11 pages).

En la práctica médica habitual, de forma alternativa o complementaria a los tratamientos farmacológicos, se ha generalizado en los últimos años el uso de un amplio abanico de cepas probióticas, ya que hay evidencias de su contribución en la restauración de las alteraciones en la permeabilidad intestinal, la composición microbiana intestinal y la respuesta inflamatoria. En este sentido, han sido especialmente utilizadas cepas probióticas de especies pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* para el tratamiento y/o prevención de diversas patologías para que de forma natural, restablezcan una situación de homeostasis intestinal mejorando la interacción simbiótica entre la microbiota y el sistema inmunitario de los pacientes, al tiempo que evitan la erradicación no selectiva de microbiota asociada al uso de antibióticos y la aparición de resistencias, principales problemas que se dan con el uso de antibióticos.

Específicamente, se ha relacionado el uso de cepas de *Bifidobacterium longum subp. infantis* con el tratamiento de patologías intestinales, así por ejemplo:

- El documento WO2009134948A1 divulga el tratamiento de alteraciones inflamatorias intestinales que incluyen el síndrome del colon irritable, colitis linfocítica, colitis colágena, y colitis indeterminada, mediante la administración de una composición que comprende un agente activo antiinflamatorio y un probiótico tal como *Bifidobacterium infantis* enfermedades, como adyuvante,
- El documento WO2010105207A1 hace referencia a una composición útil para estimular el crecimiento de la microbiota beneficiosa, incluyendo las especies del género *Bifidobacterium,* con el fin de regular disbiosis bacterianas en un animal. La composición comprende galactooligosacaridos y una cepa *Bifidobacterium longum subps. infantis* y según se indica se puede usar para tratar, entre otras enfermedades, colitis, enfermedad de Crohn, síndrome del colon irritable y enfermedad inflamatoria intestinal,
- La publicación: Elian, S.D.A. *et al.* "Bifidobacterium longum subsp infantis BB-02 attenuates acute murine experimental model of inflammatory bowel disease" *Beneficial Microbes.* 2015, 6 (3), 277 – 286 hace referencia a la utilización de la bacteria *Bifidobacterium longum subsp infantis* BB-02 como probiótico que atenúa un modelo experimental murino agudo de enfermedad intestinal inflamatoria,
-Finalmente, la publicación: Rodes, L. *et al.* "*Microencapsulated Bifidobacterium longum subsp infantis ATCC 15697 Favorably Modulates Gut Microbiota and Reduces Circulating Endotoxins in F344 Rats*" *BioMed Research International* 2014; 2014:602832., describe la aplicación de la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* ATCC 15697 en forma microencapsulada, la cual modula la microbiota intestinal y reduce las endotoxinas circulantes en un modelo animal de ratón utilizado en envejecimiento, oncología y nutrición.

Se considera de interés la identificación de nuevas cepas bacterianas probióticas que tengan capacidad para el tratamiento y/o la prevención de patologías que cursan con inflamación, preferiblemente intestinales y hepáticas, así como patologías derivadas como por ejemplo, la cirrosis, y que preferiblemente sean efectivas simultáneamente contra más de una de ellas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la cepa *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 9720, a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de dicha cepa, y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a su uso para la prevención y/o tratamiento de la inflamación intestinal y/o hepática, y patologías derivadas como, por ejemplo, la cirrosis hepática. Preferiblemente la cepa de la invención presenta actividad simultáneamente en más de una de enfermedad de las indicadas.

La cepa CECT 9720, que pertenece a la especie *Bifidobacterium longum subsp. Infantis*, reduce los niveles periféricos *in vivo* de la citocina proinflamatoria TNF-α e IL-6 en un modelo de daño hepático y también reduce los niveles periféricos in vivo de la citocina proinflamatoria TNF-α, IL-6 y MCP-1 en un modelo de inflamación intestinal. Además, dicha cepa ejerce su efecto sin inducir una respuesta proinflamatoria *in vitro* en células de Kupfer aisladas del hígado ni en macrófagos aislados de pared intestinal, lo cual es indispensable en cualquier cepa con potencial uso como probiótico. Todo esto hace que la cepa de la presente invención sea una cepa bacteriana de potencial interés para uso probiótico al reducir la inflamación hepática e intestinal.

Por tanto, la presente invención aporta al estado de la técnica una cepa de la especie *Bifidobacterium longum subsp. infantis* para el tratamiento de inflamación intestinal, inflamación hepática y patologías derivadas como, por ejemplo, la cirrosis hepática.

Luego, un aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *Bifidobacterium longum subsp. infantis* con número de depósito CECT 9720. Dicha cepa ha sido depositada en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 18 de septiembre de 2018 y le correspondió el nº de depósito CECT 9720. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna (Valencia) España.

En el ámbito del presente documento, la referencia a la cepa de la invención se hará indistintamente como: cepa de *Bifidobacterium longum subsp. infantis* con número de depósito CECT 9720, cepa CECT 9720, cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 o 16p1.

La cepa CECT 9720 puede estar en la forma de células viables o en la forma de células no viables.

La presente invención también contempla una cepa derivada de la cepa CECT 9720, donde dicha cepa mantiene o mejora las capacidades descritas a lo largo de la presente invención. El microorganismo derivado puede producirse de forma natural o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo pero sin limitarse, el crecimiento del microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Según una realización preferida, la cepa derivada de la cepa CECT 9720 es un mutante genéticamente modificado. Los términos cepa mutante o cepa derivada pueden ser utilizados indistintamente.

En la presente invención también se contempla la combinación de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa CECT 9720.

Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como por ejemplo pero sin limitarse, peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana, u otros como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones, como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas. Los metabolitos incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, pero sin limitarse, procesos de elaboración de alimentos o fármacos), durante el almacenamiento del producto o durante el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse, los ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula exportada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo de elaboración de alimentos o fármacos), el almacenamiento del producto o el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse, ácidos orgánicos e inorgánicos,

proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la cepa de la invención y/o los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida, la composición tiene una concentración de la cepa de entre 10^5 y 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.

La composición puede también incluir al menos un componente bioactivo (sustancia activa, principio activo o agente terapéutico).

El término “componente bioactivo” hace referencia a un compuesto con actividad biológica en el ámbito de aplicación de la patente que pueda mejorar o complementar la actividad de la cepa CECT 9720, incluyendo ingredientes o componentes de los alimentos (por ejemplo y sin limitar: ácidos grasos poli-insaturados, ácido linoléico conjugado, prebióticos, fibra, goma Guar, glucomanano, quitosano, picolinato de cobre, calcio, etc.), otros probióticos, plantas, extractos o componentes de plantas y fármacos.

La composición puede ser una composición farmacéutica, en cuyo caso comprenderá preferiblemente al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica o medicamento se puede presentar bajo cualquier forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, puede estar en forma una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral, preferiblemente en una forma adaptada a la administración oral. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial

bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como, por ejemplo, el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes.

La “forma galénica” o “forma farmacéutica” es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de

presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

En la presente invención, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad de la cepa de la invención; de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, en cualquier forma de presentación; la cantidad terapéuticamente efectiva variará también según la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

La composición también puede ser una composición nutritiva tal como un alimento, un suplemento, un nutracéutico, un probiótico o un simbiótico.

El término “composición nutritiva” de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término “composición nutritiva” de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal.

El término “nutracéutico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a

sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto beneficioso sobre la salud.

El término “probiótico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo hospedador.

El término “simbiótico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a aquellos alimentos que contienen una mezcla de prebióticos y probióticos. Por regla general contienen un componente prebiótico que favorece el crecimiento y/o actividad metabólica y en definitiva el efecto del probiótico con el que se combina, como por ejemplo y sin limitar puede ser la asociación de la fructooligosacáridos o galactooligosacáridos a las bifidobacterias.

El término “suplemento”, sinónimo de cualquiera de los términos “suplemento dietético”, “suplementos nutricional”; o “suplemento alimenticio” es un “ingrediente alimenticio” destinado a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos son, pero sin limitarse, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia sino como complemento de la dieta.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una cepa *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 9720 para la fabricación de un medicamento de una composición nutritiva o de un alimento.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la cepa *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 9720 para su uso como medicamento.

El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar

las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa CECT 9720, o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, la inflamación hepática y/o patologías derivadas como, por ejemplo, la cirrosis hepática.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la cepa CECT 9720, o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones para su uso en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, la inflamación hepática y/o patologías derivadas como, por ejemplo, la cirrosis hepática.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la cepa CECT 9720, o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones para su uso en la prevención y/o tratamiento simultáneo de la enfermedad inflamatoria intestinal y la inflamación hepática.
En una realización preferida, la enfermedad inflamatoria intestinal o inflamación intestinal es seleccionada de la lista que comprende: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada, colitis colágena y colitis linfocítica.

El término “tratamiento” tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

(i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

En el ámbito de la invención, preferentemente el tratamiento y/o la prevención es efectivo contra más de una enfermedad, preferiblemente la enfermedad inflamatoria intestinal y cirrosis hepática.

El término “inflamación hepática” o “inflamación de hígado” se refiere a una respuesta inflamatoria del hígado que puede ser iniciada por lesiones físicas, infección o respuesta inmune local y puede incluir acumulación local de líquido, proteínas del plasma y glóbulos blancos, así como migración e infiltración de neutrófilos, linfocitos y otras células del sistema inmune en las regiones del hígado dañado.

El término “enfermedad inflamatoria intestinal” o “inflamación intestinal” se refiere a una respuesta inflamatoria del intestino que puede ser iniciada por lesiones físicas, infección o respuesta inmune local y puede incluir acumulación local de líquido, proteínas del plasma y glóbulos blancos, así como migración e infiltración de neutrófilos, linfocitos y otras células del sistema inmune en las regiones del intestino dañado.

El término "cirrosis hepática", ”cirrosis de hígado” o simplemente “cirrosis” es el estadio final la enfermedad inflamatoria hepática y se refiere a una afección en la que el hígado se deteriora lentamente y funciona mal debido a que el tejido hepático se cambia por tejido cicatricial fibroso y nódulos regenerativos. Esto produce un bloqueo parcial en el flujo de sangre a través del hígado así como un deterioro de la capacidad del hígado de controlar infecciones, eliminar bacterias y toxinas de la sangre, procesar nutrientes, hormonas y fármacos, hacer proteínas que regulan la coagulación de la

sangre y producir bilis para ayudar a absorber las grasas, incluyendo colesterol, y vitaminas liposolubles. La cepa de la presente invención es adecuada para el tratamiento de cirrosis de diferentes causas, incluyendo cirrosis relacionada con alcohol, hepatitis B, C o D crónica, esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria o secundaria, colangitis esclerosante primaria, enfermedades heredadas tal como fibrosis quística, deficiencia en alfa-1 antitripsina, hemocromatosis, enfermedad de Wilson, galactosemia y enfermedades del almacenamiento de glucógeno. La presente invención puede utilizarse para prevenir o tratar cirrosis hepática independientemente de su etiología.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: Niveles séricos de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α) en los animales con cirrosis inducida mediante BDL, distribuidos por grupos de estudio: Sin tratar (0), *Bifidobacterium bifidum* MT7 (MT7), *Bifidobacterium bifidum* G1 (G1), *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 de acuerdo con el ejemplo de la invención.

FIG. 2: Niveles secretados de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α) en los cultivos de macrófagos de hígado de animales con cirrosis inducida mediante BDL: Macrófagos sin tratar (MCF), Macrófagos con *Bifidobacterium bifidum* MT7 (MCF+MT7), Macrófagos con *Bifidobacterium bifidum* G1 (MCF+G1), Macrófagos con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1, (MCF+16p1) de acuerdo al ejemplo de la invención.

FIG. 3: Muestra la comparación directa del uso de la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 en células de Kupffer de animales con cirrosis inducida mediante BDL, frente a lipopolisacárido (LPS) y células sin estimular en la producción de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α) en los sobrenadantes de cultivo, descartando las

cepas *MT7 y G1,* de acuerdo al ejemplo de la invención.

FIG. 4: Niveles secretados de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α) en los cultivos de macrófagos de pared intestinal de animales tratados con DSS: Macrófagos sin tratar (MCF), Macrófagos con *Bifidobacterium bifidum* MT7 (MCF+MT7), Macrófagos con *Bifidobacterium bifidum* G1 (MCF+G1), Macrófagos con *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* 16p1, (MCF+16p1) de acuerdo al ejemplo de la invención

FIG. 5: Muestra la comparación directa del uso de la cepa *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* 16p1 en macrófagos de pared intestinal de animales tratados con DSS, frente a lipopolisacárido (LPS) y células sin estimular en la producción de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α) en los sobrenadantes de cultivo, descartando las cepas MT7 y G1, de acuerdo al ejemplo de la invención**.**

FIG. 6: Niveles séricos de citocinas (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α) en los animales con inflamación intestinal inducida mediante el tratamiento con DSS, distribuidos por grupos de estudio: Sin tratar (0), *Bifidobacterium bifidum* MT7 (MT7), *Bifidobacterium bifidum* G1 (G1), *Bifidobacterium longum* subsp *infantis* 16p1, (16p1) de acuerdo con el ejemplo de la invención.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: Tratamiento de ratones con cirrosis

Aislamiento e identificación de las cepas:

Se procedió al aislamiento de cepas del género *Bifidobacterium* a partir de heces de lactantes sanos que no hubieran ingerido alimentos que contuvieran bifidobacterias durante al menos el mes anterior al análisis y que no hubieran sido sometidos a tratamientos con antibióticos. Las muestras se mantuvieron a 4ºC y se analizaron sin que transcurrieran más de dos horas desde su recogida. Se diluyeron dos gramos de cada una de ellas en tampón fosfato 10 mM con un contenido de NaCl con una concentración de 130 mM (PBS) y se homogeneizaron en un digestor Lab-Blender 400

(Seward Medical, Londres, Reino Unido), durante 3 min y después se diluyeron en agua de peptona. Se inocularon alícuotas de 0,1 ml de diversas diluciones decimales en MRS agar (de Man Rogosa and Sharpe; Scharlau, Barcelona) con un contenido de un 0,05% de cisteína (Sigma, St. Louis, MO; MRS-C), y 80 µg/ml de mupirocina. Tras una incubación de 48 h a 37ºC en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen, Oxoid, Reino Unido), se seleccionaron colonias aisladas y su identidad se confirmó mediante un estudio de su morfología bajo tinción de Gram. La identidad de los aislados se confirmó mediante PCR específica de género, de acuerdo con la metodología descrita por Kaufman y col. (1997, Identification and quantification of Bifidobacterium species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1268-1273), utilizando los cebadores (LM26 y LM3) que amplifican un fragmento de 1,35 kb del gen del ARN ribosómico 16S. Su identificación a nivel de especie se realizó mediante secuenciación del gen del 16S rRNA (1.26 Kb) empleando los cebadores 27f (5'–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 1) y 1401r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3' (SEQ ID NO: 2) por la tecnología Sanger en un secuenciador ABI 3730XL. Mediante comparación de las secuencias obtenidas con las de la base de datos de NCBI y el algoritmo BLASTn se obtuvo la identificación de la cepas aisladas y en particular de la que constituye objeto de la presente patente, obteniéndose un grado de identidad del 100% con *Bifidobacterium longum* subsp *infantis.*

Secuencia del 16S rRNA de la *Bifidobacterium longum subsp infantis* CECT9720 (SEQ ID NO: 3):

```
TAGCGACTCCGCCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGACCGGTTTT
CAGGGATCCGCTCCGCGTCGCCGCGTCGCATCCCGTTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGT
GAAGCCCTGGACGTAAGGGGCATGATGATCTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTAA
CCCCGGCGGTCCCCCGTGAGTTCCCGGCATAATCCGCTGGCAACACGGGGCGAGGGTTGC
GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCAC
CTGTGAACCCGCCCCGAAGGGAAGCCGTATCTCTACGACCGTCGGGAACATGTCAAGCCC
AGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCC
CCGTCAATTTCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGGATGCTTAACGC
GTTAGCTCCGACACGGAACCCGTGGAACGGGCCCCACATCCAGCATCCACCGTTTACGGC
GTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGT
AACGGCCCAGAGACCTGCCTTCGCCATTGGTGTTCTTCCCGATATCTACACATTCCACCG
TTACACCGGGAATTCCAGTCTCCCCTACCGCACTCAAGCCCGCCCGTACCCGGCGCGGAT
CCACCGTTAAGCGATGGACTTTCACACCGGACGCGACGAACCGCCTACGAGCCCTTTACG
CCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTT
AGCCGGTGCTTATTCAACGGGTAAACTCACTCACGCTTGCTCCCCGATAAAAGAGGTTTA
CAACCCGAAGGCCTCCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGC
AATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTATCTCAGTCCCAATGTGGCC
```

GGTCGCCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGAAGCCACGGTGGGCCGTTACCCCGCCGTCAA
GCTGATAGGACGCGACCCCATCCCATACCGCGAAAGCTTTCCCAGCAAACCATGCGGAAA
GTTGGAGCATCCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCCGGTGTATGGGGCAGGTC
GGTCACGCATTACTCACCCGTTCGCCACTCTCACCACCAAGCAAAGCC

Animales y Métodos:

Diseño del estudio:

En este estudio se incluyeron ratas macho Sprague-Dawley (Harlan, Barcelona, España) con un peso de 100-150 g. Las ratas se alojaron individualmente a una temperatura ambiente constante de 21°C y se expusieron a un ciclo de luz/oscuridad de 12:12. Los animales fueron alimentados con comida estándar a lo largo del protocolo de estudio. El protocolo abarco un total de 6 semanas. Tras una semana de cuarentena, los animales fueron sometidos a inducción de cirrosis experimental mediante doble ligadura del conducto colédoco (Bile Duct Ligation, BDL). Brevemente, las ratas fueron anestesiadas con ketamina y xilazina. Después de una laparotomía a través de la línea media, se ligó el conducto biliar común en dos niveles diferentes con suturas de seda 5-0 y se seccionó el conducto entre las ligaduras. La pared abdominal se cerró con suturas de seda 5-0. Un subgrupo de animales actuó como controles y fue operado de manera simulada.

a) Estudio *in vivo:*

Una semana previa a la laparotomía, los animales fueron distribuidos en 4 grupos de forma aleatoria:

- Sin tratar
- Tratados con *Bifidobacterium bifidum* MT7
- Tratados con *Bifidobacterium bifidum* G1
- Tratados con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1

Cada animal incluido en los diferentes grupos recibió diariamente una cantidad establecida (10^9 CFU) de las cepas incluidas en el estudio. La administración se realizó mediante sondaje intragástrico y se prolongó durante 7 días.

Tras finalizar el tratamiento, todos los animales fueron sacrificados y se recogieron muestras de sangre procedente de la cava inferior en tubos de heparina. La sangre se centrifugó (10min a 3500 FCR (fuerza centrífuga relativa)) para obtener el suero, que fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso.

b) Estudio *in vitro*:

Los animales sometidos a inducción de cirrosis experimental mediante doble ligadura del conducto colédoco (Bile Duct Ligation, BDL) fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (75mg/kg) y xilacina (10mg/kg) para el desarrollo de las laparotomías. Una vez localizado el hígado, se procedió a su perfusión *in situ* con 50 mL de buffer de perfusión (HBSS 10% FBS, 1mg/mL de colagenasa I, 0,2mg/mL de colagenasa IV, 20 µg/mL de DNasa I y 5 mM de $MgCl_2$) previamente atemperado a 37°C. A continuación se extrajo el hígado y se introdujo en un tubo con RPMI 1640 al 10% FBS, se cortó en trozos pequeños y se centrifugó a 1300 rpm durante 10min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante con cuidado, se resuspendió el tejido en 50 mL de buffer de digestión (RPMI 1640, 1mg/mL de colagenasa I, 0,2 mg/mL de colagenasa IV, 20 µg/mL de DNasa I y 5 mM de $MgCl_2$) y se incubó durante 1 h a 37 °C en agitación (400 rpms).

La mezcla resultante de la digestión se hizo pasar a través de una columna de tamices tras ser completamente disgregado de forma mecánica, lavándose todo con RPMI 1640 para recuperar el mayor número de células posible. A continuación se llevó a cabo una centrifugación muy suave (3min a 30 FCR (fuerza centrífuga relativa) y 4 °C) para eliminar los hepatocitos. Se descartó el pellet y el sobrenadante recogido se centrifugo 10min a 1300 rpms y 4 °C. El pellet resultante se separó mediante un gradiente de Percoll, que se centrifugó durante 10min a 1500 rpms y sin frenos. Tras recoger las células del percoll se resuspendieron en Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma Aldrich) y se dejaron lisar durante 10min a 4 °C para eliminar el resto de eritrocitos que quedan. Transcurrido el tiempo de lisado, se lavaron las células con RPMI 1640 y se contaron las células totales.

El aislamiento de las células de kupffer se llevó a cabo mediante separación magnética, según su expresión del marcador de diferenciación de monocitos CD68. En primer lugar se realizó un marcaje (20min a 4°C) con anticuerpo CD68 unido a PE (Miltenyi Biotec) usando 5 µL por cada millón de células, seguido un lavado de 5min a 300gx para eliminar el resto de anticuerpo no unido a las células. A continuación se llevó a cabo un segundo marcaje (15min a 4°C) con anti- PE beads (Miltenyi Biotec) a razón de 2 µL por cada millón de células. Tras el consiguiente lavado para eliminar las bolas magnéticas sobrantes, se realizó una selección positiva de la muestra, haciendo pasar la suspensión de células marcadas por una columna LS (Miltenyi Biotec) para

obtener una población pura de células de kupffer. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino FBS. Se comprobó la viabilidad de las células mediante una tinción con “trypan blue” y se procedió a su recuento. Las células viables fueron plaqueadas a razón de (10^6 cel/mL) en 5 pocillos bajo las siguientes condiciones:

- Sin estimular
- Estimuladas con LPS
- En co-cultivo con *Bifidobacterium bifidum* MT7 ($5x10^5$ UFCs/pocillo)
- En co-cultivo con *Bifidobacterium bifidum* G1 ($5x10^5$ UFCs/pocillo)
- En co-cultivo con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 ($5x10^5$ UFCs/pocillo)

Tras 48 horas de cultivo se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C para el posterior análisis de la respuesta inflamatoria. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación Animal de la Universidad Miguel Hernández (Alicante, España) con el código HA-RFG-001-15.

Condiciones de cultivo de las cepas.

Las cepas se cultivaron en caldo MRS (Scharlau, Barcelona, Espana) complementado con cisteína al 0,05% (p / v) (MRS-C Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y se incubaron a 37° C durante 22 h (en fase de crecimiento estacionaria) en condiciones anaeróbicas (AnaeroGen, Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las células se recogieron por centrifugación (6.000 g durante 15 min), se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS, cloruro de sodio 130 mM, fosfato de sodio 10 mM, pH 7,4) y se resuspendieron en leche desnatada al 10% para su administración oral a ratas. Se congelaron alícuotas de estas suspensiones en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C hasta su uso. El número de células vivas se determinó mediante la unidad de formación de colonias (UFC) que cuenta con agar MRS-C (Biomerieux) después de una incubación de 48 h a 37° C. Para las cepas probadas, más del 90% de las células estaban vivas al descongelarse y no se encontraron diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento (2 meses). Se descongeló una alícuota fresca por cada nuevo experimento para evitar la variabilidad en la viabilidad de los cultivos.

ELISAs

Las respuesta inflamatoria en suero y sobrenadantes de los cultivos se llevaron a cabo mediante kits tipo ELISA según las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN). Todas las muestras fueron medidas por triplicado en un lector de placas Sunrise Microplate Reader (Tecan) y se generaron curvas estándar para cada una de las placas, estableciéndose a su vez un valor cero estándar que se restó a los resultados de los estándares así como las muestras para obtener valores corregidos.

Análisis Estadístico

EL test de U-Mann-Whitney se utilizó para comparaciones pareadas entre los grupos de tratamiento, con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. El nivel de significación fue 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS (versión 22.0).

Resultados:

Se incluyeron inicialmente un total de 28 animales en el estudio. La mortalidad en el grupo BDL fue del 23,1% (6 de los 24 animales operados inicialmente). Ninguna de las ratas control (n=4) falleció durante el protocolo de estudio. Las ratas sometidas a cirugía BDL fueron distribuidas aleatoriamente para el estudio *in vivo* (n=12) o *in vitro* (n=6). Dentro del estudio *in vivo*, se distribuyeron también de forma aleatoria para pertenecer a cualquiera de los grupos de tratamiento con las diferentes cepas de bifidobacteria (n=4/grupo) la semana previa a la laparotomía. Se cuantifico la expresión de mediadores inflamatorios solubles tales como la IL-6, IL-10, MCP-1 y el TNF-α en el suero y el sobrenadante de los cultivos realizados.

a) *In vivo*:

Los resultados de las mediciones realizadas en suero (Figura 1) reflejaron un claro descenso en la respuesta pro-inflamatoria. Cabe destacar que los niveles de TNF-α fueron diez veces menores en el grupo de animales tratados oralmente con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 con respecto a los animales no tratados. Así mismo, se observó un descenso significativo tanto en los niveles de IL-6 como de MCP-1.

Por el contrario, los niveles de IL-10, citocina reguladora de la respuesta inmune e inhibidora de moléculas pro-inflamatorias (entre ellas el TNF-α) se mantuvieron

elevados con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 tal como ocurría en la situación basal.

b) *In vitro*:

En la figura 2 se puede observar la producción *in vitro* de citocinas medidas en el sobrenadante de los cultivos. Al evaluar la respuesta directa de las células de kupffer frente a cada una de las cepas estudiadas observamos que la expresión de los mediadores MCP-1, e IL-6 se encontraba incrementada en todos los casos con respecto a las células que no fueron estimuladas, sin embargo, este incremento únicamente era similar al de los macrófagos estimuladas con LPS en los cultivos tratados con las cepas MT7 y G1. Las células tratadas con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 apenas incrementaron la producción de IL-6, a diferencia de lo que ocurría con el LPS o el resto de cepas estudiadas. Del mismo modo, en presencia de esta cepa, tampoco se vieron incrementados los niveles de TNF-α con respecto a las condiciones basales. Además, a estos resultados se sumó un descenso en la producción de la proteína quimiotactica MCP-1, implicada en el reclutamiento de monocitos y basófilos hacia zonas de inflamación.

La Figura 3 muestra la comparación directa del uso de la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 en células de Kupffer frente a LPS y células sin estimular en la producción de citocinas en los sobrenadantes de cultivo, descartando las cepas MT7 y G1. Como se puede apreciar claramente, el uso de la cepa de la invención mantuvo los niveles de citocinas a concentraciones similares a las de las células no estimuladas. Es decir, la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 no induce la secreción de mediadores inflamatorios en células de Kupffer.

Conclusión:

Con estos resultados se puede concluir que la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 reduce los niveles periféricos *in vivo* de la citocina proinflamatoria TNF-α e IL-6 en un modelo de daño hepático. Además, dicha cepa ejerce su efecto sin inducir una respuesta proinflamatoria *in vitro* en células de Kupfer aisladas del hígado, lo cual es indispensable en cualquier cepa con potencial uso como probiótico. Todo esto hace que la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 sea una cepa bacteriana de potencial interés para uso probiótico al reducir la inflamación inducida en un modelo experimental de daño hepático por colestasis.

Ejemplo 2: Tratamiento de ratones con inflamación intestinal Animales y Métodos:

Diseño del estudio:

Se incluyeron ratas macho Sprague-Dawley (Harlan, Barcelona, España) con un peso de 100-150 g. Las ratas se alojaron individualmente a una temperatura ambiente constante de 21°C y se expusieron a un ciclo de luz/oscuridad de 12:12. Los animales fueron alimentados con comida estándar a lo largo del protocolo de estudio. El protocolo abarcó un total de 6 semanas. Tras una semana de cuarentena, los animales fueron sometidos a enfermedad inflamatoria intestinal mediante el tratamiento con DSS al 3 % en el agua de bebida. La laparotomía y toma de muestras se realizó bajo anestesia con Isofluorano una semana tras el comienzo del tratamiento

A) Estudio *in vitro*: Se aisló el intestino y se cortó en piezas de 1,5cm, que se introdujeron en un tubo de 50mL precalentado con HBSS/FBS y EDTA 2mM, y se agitó dos veces a 250rpm durante 20 minutos a 37ºC. Las piezas intestinales se pasaron entonces a una solución con colagenasa (1,5mg/mL de colagenasa VIII en HBSS/FBS con 40µg/mL de DNAsa I), y se agitaron a 200rpm durante 15 minutos a 37ºC. Los restos de tejido se filtraron (100µm) a otro tubo de 50mL. La solución resultante se centrifugó de nuevo a 1500rpm durante 5 minutos a 4ºC hasta obtener un pellet celular y eliminar el sobrenadante.

El aislamiento de los macrófagos intestinales se llevó a cabo mediante separación magnética, según su expresión del marcador de diferenciación de macrófagos CD45, F4/80+ y CD11c.

Los macrófagos extraídos se pusieron en cultivo durante 48 horas solos (10^6 cél/mL RPMI), con LPS, o con cada una de las tres cepas a analizar:

+ *Bifidobacterium bifidum* MT7 ($5x10^5$ UFCs/pocillo),

+ *Bifidobacterium bifidum* G1 ($5·10^5$ UFCs/pocillo)

+ *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 ($5·10^5$ UFCs/pocillo).

Tras 48 horas de cultivo, se guardaron los sobrenadantes a -20 ºC hasta evaluar la respuesta inflamatoria mediante kits ELISA (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α).

B) Estudio *in vivo*: Una semana previa a la laparotomía, coincidiendo con el tratamiento con DSS, los animales se distribuyeron en grupos y recibieron de forma aleatoria una de las cepas incluidas en el estudio (10^9 CFU/oral/día/7 días).

Los animales fueron distribuidas en 4 grupos: 1) sin tratar, 2) *B. bifidum* MT7, 3) *B. bifidum* G1 y 4) *B. longum subsp infantis*16p1. Todos los animales fueron sacrificados al finalizar el tratamiento y se tomaron
muestras de suero que fueron conservadas a -20 ºC hasta realizar las mediciones para evaluar la respuesta inflamatoria mediante Kits ELISA (IL-6, IL-10, MCP-1, TNF-α).

Las condiciones de cultivo de las cepas, la realización de los diferentes kits ELISA y el análisis estadístico se realizó de la misma manera que en el ejemplo 1.

Resultados:

Se incluyeron inicialmente un total de 22 animales en el estudio. Ninguna de las ratas tratadas con DSS (n=18) ni ninguna de las ratas control (n=4) falleció durante el protocolo de estudio. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente para el estudio *in vivo* (n=12) o *in vitro* (n=6). Dentro del estudio *in vivo*, se distribuyeron también de forma aleatoria para pertenecer a cualquiera de los grupos de tratamiento con las diferentes cepas de bifidobacteria (n=4/grupo) la semana previa a la laparotomía. Se cuantifico la expresión de mediadores inflamatorios solubles tales como la IL-6, IL-10, MCP-1 y el TNF-α en el suero y el sobrenadante de los cultivos realizados.

a) *In vitro*:

En la figura 4 se puede observar la producción *in vitro* de citocinas medidas en el sobrenadante de los cultivos. Al evaluar la respuesta directa de los macrófagos intestinales frente a cada una de las cepas estudiadas observamos que la expresión de los mediadores MCP-1, IL-6 y TNF-α se encontraba incrementada en todos los casos con respecto a las células que no fueron estimuladas, sin embargo, este incremento únicamente era similar al de los macrófagos estimuladas con LPS en los cultivos tratados con las cepas MT7 y G1. Las células tratadas con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 apenas incrementaron la producción de IL-6, a diferencia de lo que ocurría con el LPS o el resto de cepas estudiadas. Del mismo modo, en

presencia de esta cepa, tampoco se vieron incrementados los niveles de TNF-α con respecto a las condiciones basales.

La Figura 5 muestra la comparación directa del uso de la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 en células de Kupffer frente a LPS y células sin estimular en la producción de citocinas en los sobrenadantes de cultivo, descartando las cepas MT7 y G1. El uso de la cepa de la invención mantuvo los niveles de citocinas a concentraciones similares a las de las células no estimuladas. Es decir, la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 no induce la secreción de mediadores inflamatorios en macrófagos intestinales.

b) *In vivo*:

Los resultados de las mediciones realizadas en suero (Figura 6) reflejaron un claro descenso en la respuesta pro-inflamatoria. Tanto los niveles de TNF-α, como los niveles de Il-6 y MCP-1 fueron menores en el grupo de animales tratados oralmente con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 con respecto a los animales no tratados.
Por el contrario, los niveles de IL-10, se mantuvieron elevados con *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 tal como ocurría en la situación basal.

Conclusión:
Con estos resultados se puede concluir que la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 reduce los niveles periféricos in vivo de la citocina proinflamatoria TNF-α, IL-6 y MCP-1 en un modelo de inflamación intestinal. Además, dicha cepa ejerce su efecto sin inducir una respuesta proinflamatoria *in vitro* en macrófagos aislados de pared intestinal, lo cual es indispensable en cualquier cepa con potencial uso como probiótico. Todo esto hace que la cepa *Bifidobacterium longum subsp infantis* 16p1 sea una cepa bacteriana de potencial interés para uso probiótico al reducir la inflamación inducida en un modelo experimental de inflamación intestinal.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de *Bifidobacterium longum sub. infantis* con número de depósito CECT 9720.

2. Cepa según la reivindicación 1, donde dicha cepa está en la forma de células viables o en la forma de células no viables.

3. Componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones obtenidos a partir de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

4. Composición que comprende a la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 o los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones, según la reivindicación 3.

5. Composición según la reivindicación 4, que adicionalmente comprende al menos un componente bioactivo.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, donde dicha composición es una composición farmacéutica.

7. Composición según la reivindicación 6, que adicionalmente comprende al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, donde dicha composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.

9. Composición según la reivindicación 8, donde dicha composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, donde dicha composición es una composición nutritiva.

11. Composición según la reivindicación 10, donde la composición se selecciona de entre un alimento, un suplemento, un nutraceutico, un probiotico o un simbiótico.

12. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, para su uso como medicamento.

13. Cepa o composición para su uso según reivindicación 12 para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación hepática.

14. Cepa o composición para su uso según reivindicación 12 para prevención y/o el tratamiento de la cirrosis hepática.

15. Cepa o composición para su uso según reivindicación 12 para la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.

16. Cepa o composición para su uso según reivindicación 12 para la prevención y/o el tratamiento simultáneo de la enfermedad inflamatoria intestinal y la inflamación hepática.

17. Cepa o composición para su uso según la reivindicación 12 para la prevención y/o el tratamiento simultáneo de la enfermedad inflamatoria intestinal y la cirrosis hepática.

18. Cepa o composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 donde la enfermedad inflamatoria intestinal se selecciona de la lista que comprende: enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada, colitis colágena, colitis linfocítica.

19. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 para la elaboración de un alimento.

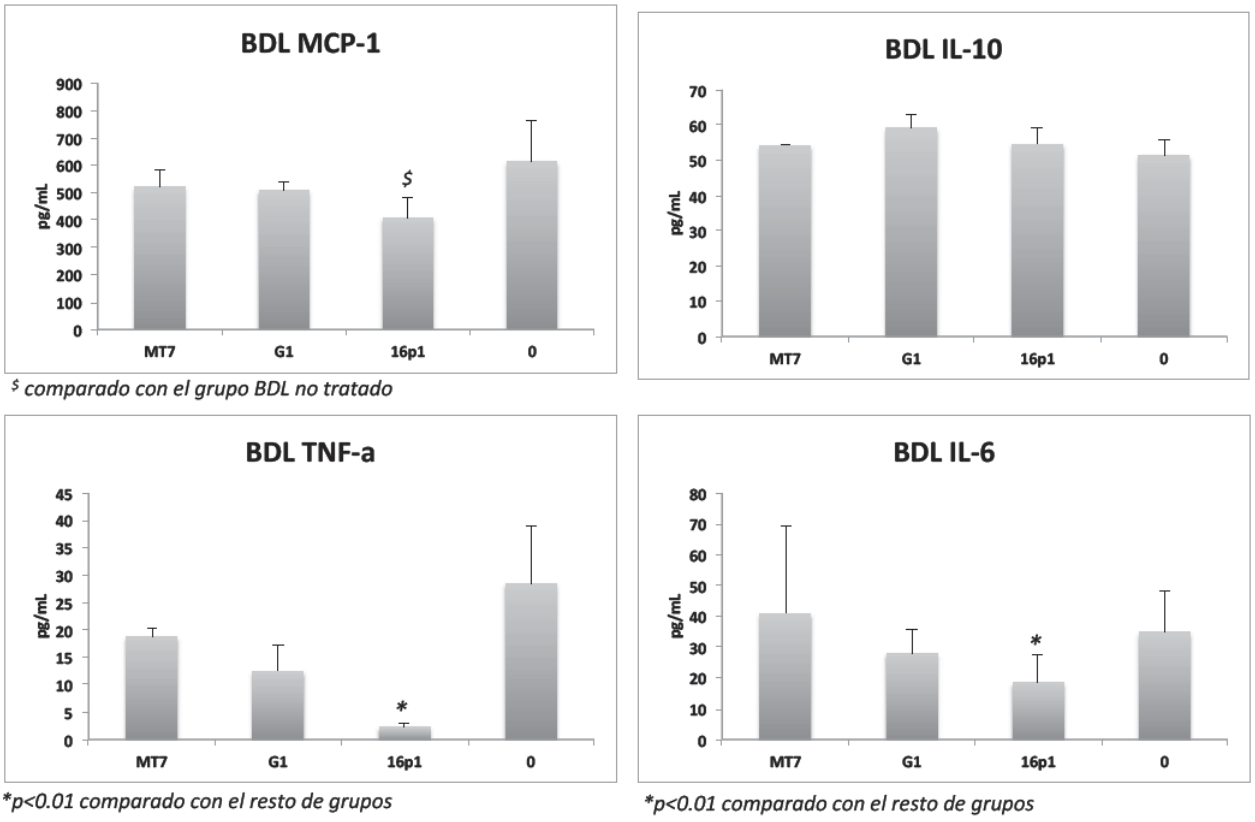
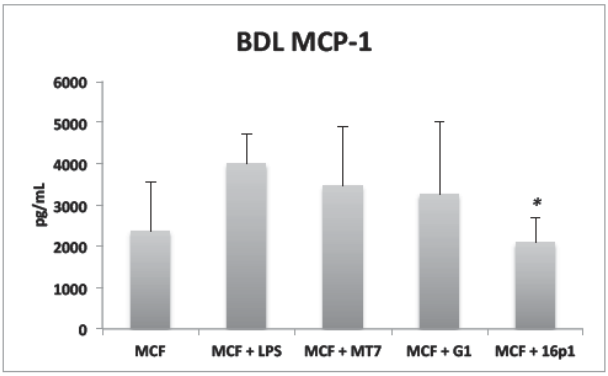
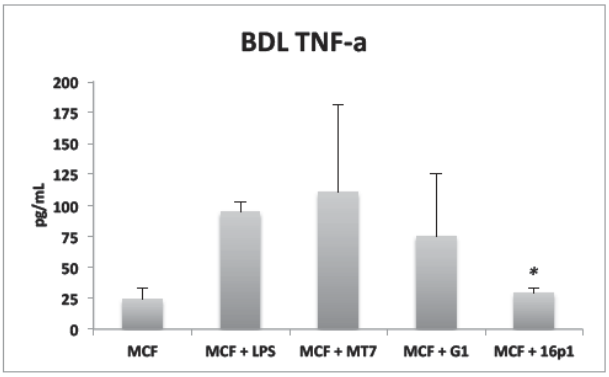

BDL MCP-1
pg/mL
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
$
MT7
G1
16p1
0
$ comparado con el grupo BDL no tratado
BDL IL-10
pg/mL
70
60
50
40
30
20
10
0
MT7
G1
16p1
0
BDL TNF-a
pg/mL
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
*
MT7
G1
16p1
0
*p<0.01 comparado con el resto de grupos
BDL IL-6
pg/mL
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
MT7
G1
16p1
0
*p<0.01 comparado con el resto de grupos

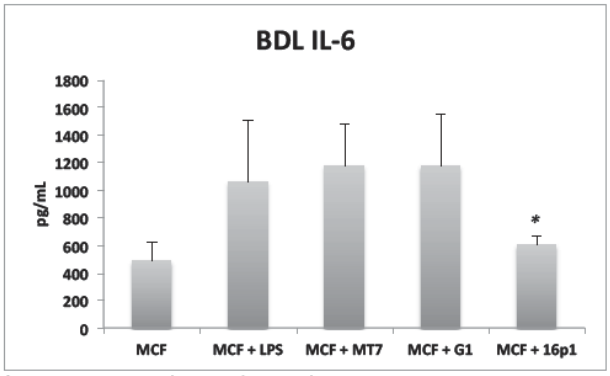
FIG. 1



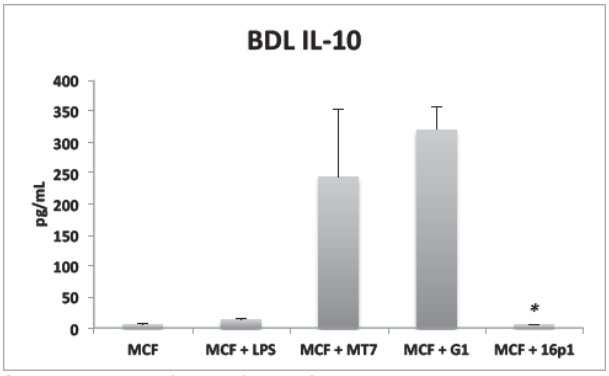
*p<0.01 comparado con el resto de grupos, excepto MCF



*p<0.01 comparado con el resto de grupos, excepto MCF



*p<0.01 comparado con el resto de grupos, excepto MCF



*p<0.01 comparado con el resto de grupos, excepto MCF

FIG. 2

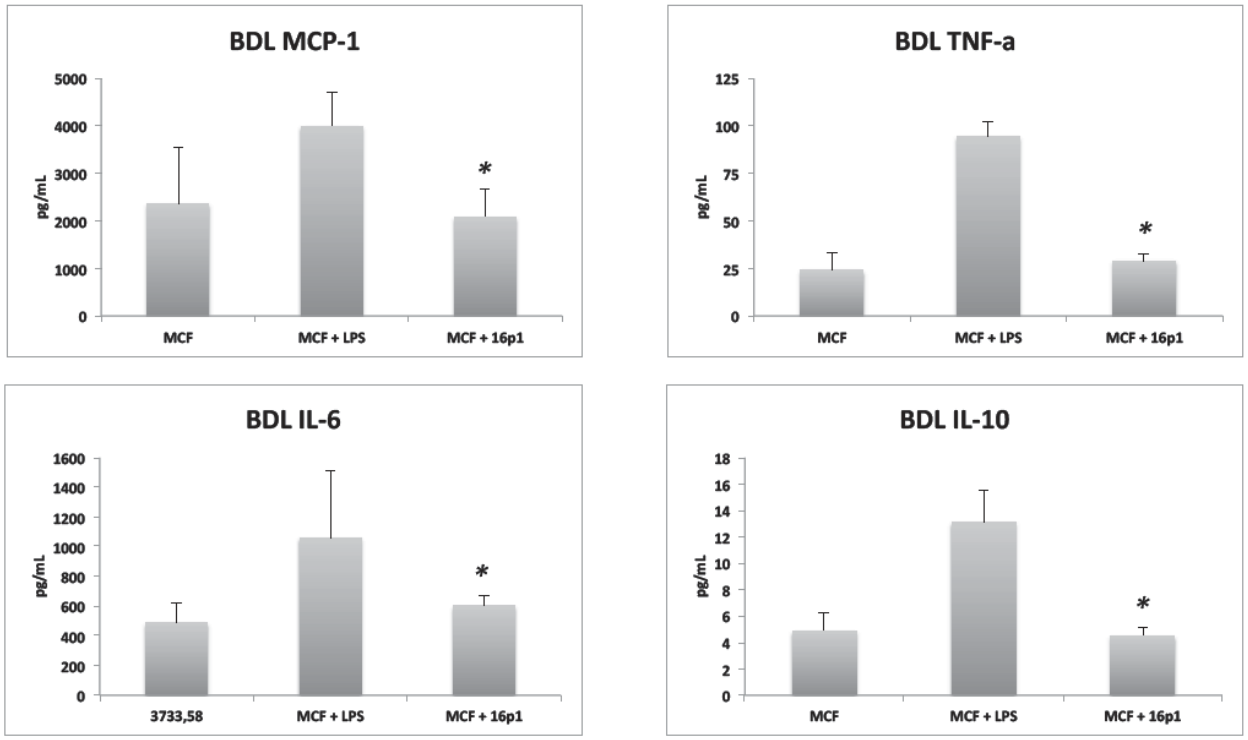

BDL MCP-1
pg/mL
5000
4000
3000
2000
1000
0
MCF
MCF + LPS
MCF + 16p1
*
BDL TNF-a
pg/mL
125
100
75
50
25
0
MCF
MCF + LPS
MCF + 16p1
*
BDL IL-6
pg/mL
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
3733,58
MCF + LPS
MCF + 16p1
*
BDL IL-10
pg/mL
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
MCF
MCF + LPS
MCF + 16p1
*

FIG. 3

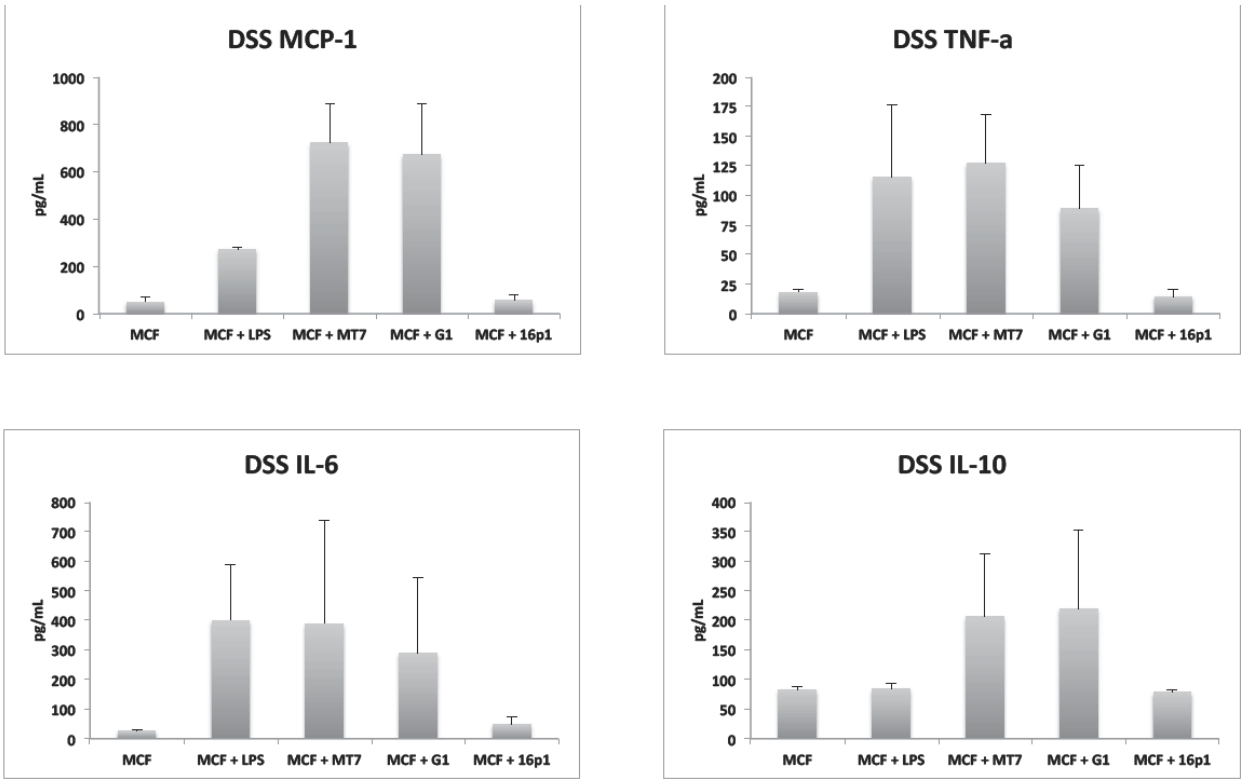

DSS MCP-1
pg/mL
1000
800
600
400
200
0
MCF
MCF + LPS
MCF + MT7
MCF + G1
MCF + 16p1
DSS TNF-a
pg/mL
200
175
150
125
100
75
50
25
0
MCF
MCF + LPS
MCF + MT7
MCF + G1
MCF + 16p1
DSS IL-6
pg/mL
800
700
600
500
400
300
200
100
0
MCF
MCF + LPS
MCF + MT7
MCF + G1
MCF + 16p1
DSS IL-10
pg/mL
400
350
300
250
200
150
100
50
0
MCF
MCF + LPS
MCF + MT7
MCF + G1
MCF + 16p1

FIG. 4

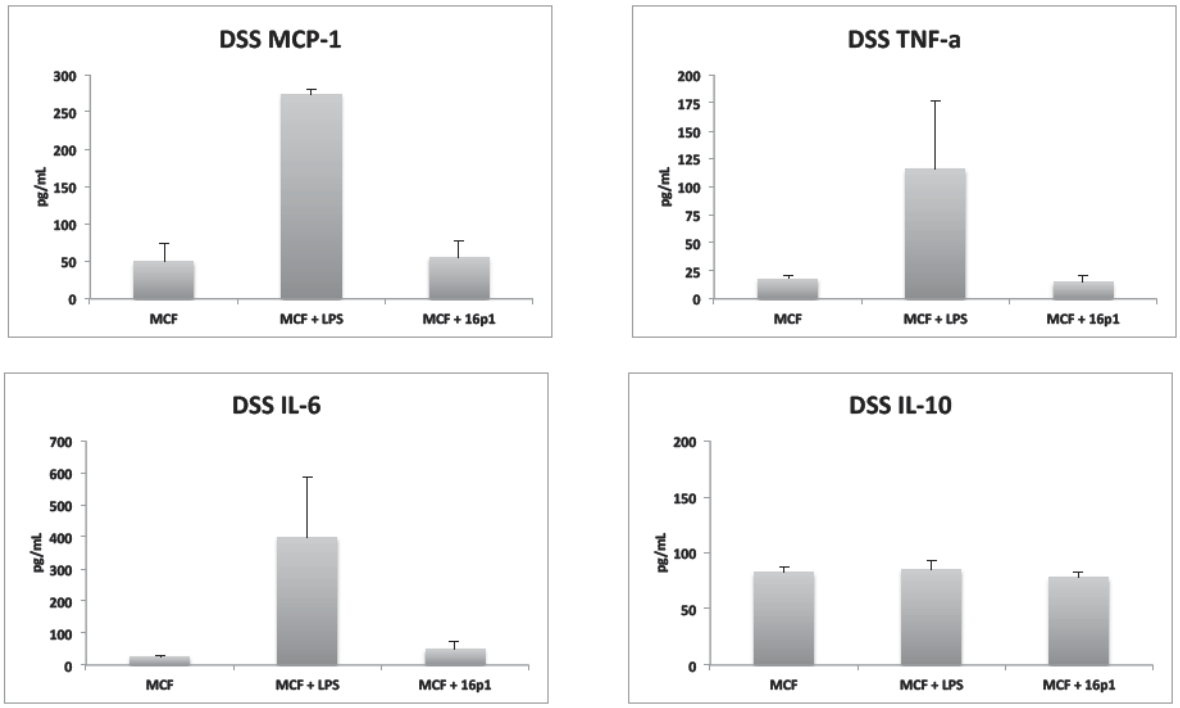

DSS MCP-1
pg/mL
300
250
200
150
100
50
0
MCF
MCF + LPS
MCF + 16p1
DSS TNF-a
pg/mL
200
175
150
125
100
75
50
25
0
MCF
MCF + LPS
MCF + 16p1
DSS IL-6
pg/mL
700
600
500
400
300
200
100
0
MCF
MCF + LPS
MCF + 16p1
DSS IL-10
pg/mL
200
150
100
50
0
MCF
MCF + LPS
MCF + 16p1

FIG. 5

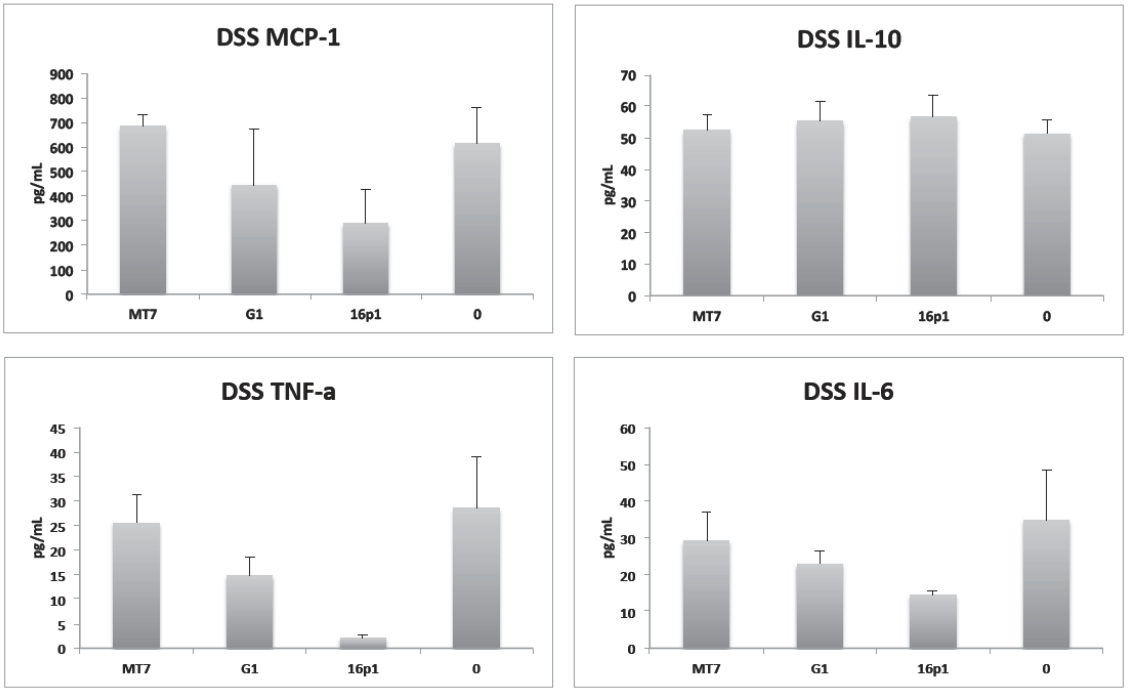

DSS MCP-1
pg/mL
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
MT7
G1
16p1
0
DSS IL-10
pg/mL
70
60
50
40
30
20
10
0
MT7
G1
16p1
0
DSS TNF-a
pg/mL
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
MT7
G1
16p1
0
DSS IL-6
pg/mL
60
50
40
30
20
10
0
MT7
G1
16p1
0

FIG. 6

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201830961

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 05.10.2018

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2018180728 A1 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD) 04/10/2018, Párrafos 11-15, 60, 61, ejemplos, reivindicaciones.	1,2, 4-19
A	WO 0042429 A2 (IRELAND ENTERPRISE et al.) 20/07/2000, Ejemplos 2 y 3.	1,2, 4-19
A	WO 2009134948 A1 (PROCTER & GAMBLE et al.) 05/11/2009, Ejemplos V, VI, IX, X.	1,2, 4-19
A	XIA XIAOXUE et al. Role of probiotics in the treatment of minimal hepatic encephalopathy in patients with HBV-induced liver cirrhosis. Journal of International Medical Research, SEP 2018, vol. 46, Páginas 3596-3604, ISSN 0300-0605 (print) ISSN 1473-2300 (electronic), DOI: doi:10.1177/0300060518776064	1,2, 4-19
A	POZO-RUBIO T et al. Immunostimulatory effect of faecal *Bifidobacterium* species of breast-fed and formula-fed infants in a peripheral blood mononuclear cell/Caco-2 co-culture system. British Journal of Nutrition, 2011, Vol. 106, Páginas 1216 - 1223, ISSN 0007-1145, DOI: doi:10.1017/S0007114511001656	1,2, 4-19
A	GOMEZ-HURTADO I et al. Oral administration of *B. infantis* favours a reduction in mesenteric lymph node bacterial DNA translocation episodes in mice with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. Journal of Hepatology, 2012, vol. 56, Páginas S229, ISSN 0168-8278	1,2, 4-19
A	WO 2004069156 A2 (UNIV CALIFORNIA et al.) 19/08/2004, ejemplos.	1,2, 4-19
A	WO 2005077391 A1 (SYNBIOTICS AB et al.) 25/08/2005, ejemplo 6.	1,2, 4-19
A	Probiotics and prebiotics. World Gastroenterology Organization Global Guidelines. 2017. Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 12/02/2019] http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-english-2017.pdf	1,2, 4-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
12.02.2019	A. I. Polo Diez	1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/20 (2006.01)
A61K35/745 (2015.01)
A23L33/135 (2016.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A61K, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, CAPLUS, INTERNET, BD-TXTE, EMBASE, MEDLINE, NPL