

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 760 076**

51 Int. Cl.:

A61K 35/745 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016 PCT/EP2016/080454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17097987**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016 E 16820183 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3386523**

54 Título: **Bifidobacterium longum para el tratamiento de obesidad y trastornos metabólicos asociados**

30 Prioridad:

11.12.2015 EP 15199660

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

13.05.2020

73 Titular/es:

**PRECISIONBIOTICS GROUP LIMITED (100.0%)
Building 4400, Cork Airport Business Park,
Kinsale Road
Cork T12 N84F, IE**

72 Inventor/es:

**KIELY, BARRY;
MURPHY, EILEEN FRANCES y
HEALY, SELENA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 760 076 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

Bifidobacterium longum para el tratamiento de obesidad y trastornos metabólicos asociados

5 **Introducción**

La invención se refiere a una cepa de *Bifidobacterium longum*.

10 La obesidad es uno de los desafíos de salud pública más serios del siglo 21. A nivel mundial, aproximadamente el 13 % de los adultos son obesos con un 39 % adicional considerados con sobrepeso (OMS, 2015). La obesidad es un trastorno multifactorial resultado de un desequilibrio de larga duración entre ingesta y gasto de energía e influyen en ella factores genéticos y ambientales. La obesidad se caracteriza por la resistencia a la insulina y una inflamación de bajo grado crónica (Gregor y Hotamisligil, 2011, Kahn *et al.*, 2006). La interacción íntima entre el sistema inmunitario, el metabolismo y la microbiota intestinal puede jugar un papel importante en el control de la obesidad y de la homeostasis metabólica. La obesidad incrementa el riesgo de desarrollar y exacerbar un cúmulo de trastornos metabólicos crónicos tales como la diabetes tipo 2 (T2DM), enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), hipertensión, aterosclerosis, dislipidemia y enfermedad cardiovascular (Guh *et al.*, 2009) con la prevalencia de comorbilidades metabólicas que aumentan paralelamente con el aumento del IMC (Gupta *et al.*, 2015). La obesidad incrementa también el riesgo de desarrollar enfermedades serias y potencialmente mortales tales como alergia y asma, artrosis, enfermedad de la vesícula biliar y esteatohepatitis no alcohólica (NASH), un proceso en el que la grasa se acumula en el hígado y es la causa principal de cirrosis del hígado.

25 El síndrome metabólico, una afección cada vez más frecuente, se refiere a la combinación de obesidad, hiperlipidemia (triglicéridos altos), hipertensión (presión sanguínea elevada) e intolerancia a la glucosa (azúcar en sangre alta) y bajo colesterol HDL. Estos factores de riesgo ayudan a identificar sujetos en riesgo elevado de desarrollar diabetes tipo 2 (T2D) y enfermedad cardiovascular.

30 La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) es un trastorno muy frecuente y se refiere a un grupo de afecciones en las que hay acumulación por exceso de grasa en el hígado de gente que bebe poco o nada de alcohol.

35 La forma más severa de NAFLD es la llamada esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La NASH provoca la inflamación del hígado y hace que este resulte dañado. La NASH tiende a desarrollarse en gente que tiene sobrepeso o es obesa, o tiene diabetes, colesterol alto o triglicéridos altos.

40 Un gran volumen de datos clínicos y experimentales muestran que el incremento de flujo de ácidos grasos libres debido a un incremento de tejido adiposo visceral puede dar lugar a NAFLD relacionada con la resistencia a insulina. Por tanto, los individuos con obesidad, resistencia a insulina y dislipidemia están ante el mayor riesgo de desarrollar NAFLD.

45 Dada la observación de que los ratones libres de gérmenes son más magros que sus homólogos criados convencionalmente (Backhed *et al.*, 2004), la contribución de la microbiota intestinal al desarrollo de la obesidad se está investigando cada vez más (Backhed *et al.*, 2007, Cani *et al.*, 2008b, Ridaura *et al.*, 2013, Vrieze *et al.*, 2012). La contribución de la microbiota intestinal a la obesidad es multifactorial e implica aspectos tales como una mayor captación de energía y almacenamiento de grasa (Turnbaugh *et al.*, 2006), rutas metabólicas alteradas (Kotzampassi *et al.*, 2014, Turnbaugh *et al.*, 2009) y traslocación bacteriana conducente a inflamación crónica de bajo grado (Cani *et al.*, 2007, Cani *et al.*, 2008a). La manipulación de la microbiota intestinal mediante probióticos es por tanto una herramienta terapéutica potencial para ayudar a paliar la obesidad y mejorar la salud metabólica. Las cepas de *Lactobacillus* se utilizan comúnmente como probióticos y hay un conjunto de pruebas que sustentan los efectos beneficiosos en la salud *in vivo* en una forma específica de cada cepa (Aronsson *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2006, Naito *et al.*, 2011).

50 El mecanismo de acción de estas cepas no se ha caracterizado bien. Un grupo de moléculas que son de interés son los exopolisacáridos de bacterias (EPS). Los EPS son polímeros de peso molecular elevado que están compuestos de restos de azúcares y que se secretan por bacterias en el medio circundante. Se ha visto que las bacterias que producen exopolisacáridos (EPS) tienen efectos inmunomoduladores (Fanning *et al.*, 2012, Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2014, Vinderola *et al.*, 2006, Volman *et al.*, 2008, Jones *et al.*, 2014). Muchas bacterias de ácido láctico (BAL) tienen la capacidad de sintetizar EPS. Sin embargo, los EPS son moléculas heterogéneas y difieren en composición, carga y estructura molecular, lo que puede explicar la bioactividad específica de la cepa observada (Adams *et al.*, 2008, Bland *et al.*, 2004, Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2012, Kankainen *et al.*, 2009).

65 La inflamación crónica de bajo grado asociada a obesidad y trastornos metabólicos (Gregor and Hotamisligil, 2011) es un factor de riesgo que podría ser objetivo de manipulación mediante administración de probióticos para influir favorablemente en el desarrollo de la obesidad. Se ha mostrado previamente que otra bacteria de ácido láctico, *B. longum* NCIMB 41003, tiene efectos antiinflamatorios. Esta bacteria tiene una capa considerable de EPS. La materia de EPS tiene también un efecto antiinflamatorio como se describe en el documento WO2010055499A.

El documento WO2011/058535 describe la cepa de *Bifidobacterium longum* NCIMB 41676.

5 Di Gioia Diana et al: "Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants", Applied Microbiology and Biotechnology, Springer, DE, vol. 98, n.º 2, 28 de noviembre de 2013 (2013-11-28), págs. 563-577, XP035328401 es una revisión de Bifidobacterias.

10 Michele Malaguarnera et al: "Bifidobacterium longum with Fructo-Oligosaccharides in Patients with Non Alcoholic Steatohepatitis", Digestive Diseases and Sciences, Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, NE, vol. 57, n.º 2, 8 de septiembre de 2011 (2011-09-08), págs. 545-553, XP035005634 presenta un estudio de un *Bifidobacterium longum* junto con FOS que, según se ha notificado, reduce la actividad NASH y los niveles de ALT en suero.

15 El documento US2013/261071A1 describe un exopolisacárido aislado de la cepa de *Bifidobacterium* NCIMB 41003.

Declaraciones de la invención

20 La invención proporciona la cepa depositada NCIMB 41715. Una cepa de *Bifidobacterium longum* AH1362 depositada en la NCIMB con el número de entrada NCIMB 41715.

25 De acuerdo con un aspecto, la invención proporciona una composición para utilizar en la prevención o tratamiento de obesidad y síndrome metabólico relacionado con obesidad que comprende una cantidad eficaz de la cepa. La cepa produce un polisacárido e incrementa la eliminación de energía. La cepa se aísla de una muestra fecal de un voluntario sano adulto al que se le ha administrado placebo.

La cepa aislada de la invención puede utilizarse para reducir la acumulación de grasa corporal en un sujeto. La cepa puede utilizarse para bloquear la ganancia de peso o reducir peso. La cepa puede utilizarse para el tratamiento, prevención o atenuación de una afección que resulta de la acumulación excesiva de grasa corporal.

30 La invención también proporciona un método para prevenir o tratar la obesidad, que comprende administrar una composición que comprende una cepa depositada en la NCIMB con el número de entrada NCIMB 41715 a un sujeto que necesita prevenir o tratar la obesidad.

35 La invención proporciona adicionalmente un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico relacionado con obesidad, que comprende administrar una composición que comprende una cepa depositada en la NCIMB con el número de entrada NCIMB 41715 a un sujeto que necesita prevenir o tratar el síndrome metabólico relacionado con obesidad.

40 La invención también proporciona un método para prevenir o tratar la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), que comprende administrar una composición que comprende una cepa de *Bifidobacterium longum* AH 1362 depositada en la NCIMB con el número de entrada NCIMB 41715 a un sujeto que necesita prevenir o tratar la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD).

45 La cepa puede estar en forma de células viables. La cepa puede estar en forma de células no viables. El uso general de bacterias probióticas es en la forma de células viables. Sin embargo, el uso se puede extender a células no viables tales como los cultivos muertos, mezclas de cultivos viables y no viables o composiciones que contienen factores beneficiosos expresados por las bacterias probióticas. Esto puede incluir microorganismos matados térmicamente o microorganismos matados por exposición a pH alterado o sometimiento a presión o radiación gamma. La preparación del producto con células no viables es más sencilla, las células se pueden incorporar sencillamente a productos farmacéuticos y las necesidades de almacenamiento son mucho menos limitadas que las de las células viables. *Lactobacillus casei* YIT 9018 ofrece un ejemplo del uso eficaz de células matadas por calor como un método para el tratamiento y/o la prevención del crecimiento tumoral tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º US4347240.

55 La invención también proporciona una formulación que comprende una cepa tal como se describe en el presente documento. La formulación puede comprender adicionalmente un material probiótico. La formulación puede comprender adicionalmente un vehículo. El vehículo puede ser un vehículo ingerible o un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo. El vehículo ingerible puede ser un producto alimentario tal como leche acidificada, yogur, yogur helado, leche en polvo, concentrado de leche, queso untado, aderezos o bebidas. Entre los ejemplos se incluyen un producto alimentario fermentado tal como un producto de leche fermentada. La formulación puede comprender adicionalmente una proteína y/o péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, mineral y/u oligoelemento. La cepa de *Bifidobacterium* puede estar presente en una cantidad de más de 10⁶ ufc por gramo de formulación. La formulación puede comprender adicionalmente un adyuvante. La formulación puede comprender adicionalmente un componente bacteriano. La formulación puede comprender adicionalmente un fármaco. La formulación puede comprender adicionalmente un compuesto biológico.

En todos los casos, la formulación comprende una cepa como se describe en el presente documento y puede incluir un vehículo u otro agente. Tal vehículo u otro agente en algunos casos no están presentes en la naturaleza. En algunos casos, la formulación puede utilizarse para protocolos de inmunización y de vacunación.

5 La invención también proporciona una composición liofilizada que comprende una cepa de la invención o una formulación de la invención.

La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para utilizar en productos alimentarios.

10 La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para utilizar como un medicamento.

15 La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para utilizar en la profilaxis y/o tratamiento de obesidad y enfermedades relacionadas.

La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para utilizar en la profilaxis y/o tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD).

20 Las cepas tal como se describen en el presente documento pueden utilizarse en la preparación de un grupo de agentes bioterapéuticos para modificar los niveles de IL-10.

La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para utilizar en la profilaxis y/o tratamiento de la inflamación relacionada con la obesidad.

25 La invención también proporciona una cepa o una formulación como se describe en el presente documento para utilizar en la profilaxis y/o tratamiento de la desregulación metabólica relacionada con la obesidad.

30 Se apreciará que la cepa específica de la invención puede administrarse a animales (seres humanos incluidos) en una forma ingerible por vía oral en una preparación convencional tal como cápsulas, microcápsulas, comprimidos, granulados, polvo, pastillas para chupar, píldoras, supositorios, suspensiones y jarabes. Las formulaciones adecuadas pueden prepararse por métodos comúnmente empleados usando aditivos orgánicos e inorgánicos convencionales. La cantidad de ingrediente activo en la composición médica puede estar a un nivel que ejercerá el efecto terapéutico deseado.

35 La formulación puede incluir también un componente bacteriano, un fármaco o un compuesto biológico.

Además, se puede preparar una vacuna que comprende las cepas de la invención utilizando cualquier método conocido adecuado y puede incluir un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

40 La invención también incluye mutantes y variantes derivados de la cepa de la invención, conservando al mismo tiempo la actividad de la cepa depositada. Los mutantes y variantes incluyen una cepa cuyas propiedades genéticas y/o fenotípicas están alteradas en comparación con la cepa parental. Una variante presente en la naturaleza incluye las alteraciones espontáneas de las propiedades objetivo aisladas selectivamente. La alteración deliberada de las propiedades de la cepa parental se consigue mediante tecnologías de manipulación genética (*in vitro*) convencionales, tales como la disrupción génica, transferencia conjugada, etc. La modificación genética incluye la introducción de secuencias de ADN exógeno y/o endógeno en el genoma de una cepa, por ejemplo mediante la inserción en el genoma de la cepa bacteriana mediante vectores, que incluyen ADN de plásmido o bacteriófagos.

50 Las mutaciones naturales o inducidas incluyen alteraciones de al menos una sola base tales como deleción, inserción, transversión u otras modificaciones de ADN que pueden dar como resultado la alteración de la secuencia de aminoácido codificada por la secuencia de ADN.

55 Los términos mutante, variante y mutante modificado genéticamente también incluyen una cepa que ha sufrido alteraciones genéticas que se acumulan en un genoma a una tasa que es compatible en la naturaleza para todos los microorganismos y/o alteraciones genéticas que suceden mediante mutación espontánea y/o adquisición de genes y/o pérdida de genes que no se ha conseguido mediante manipulación deliberada (*in vitro*) del genoma pero que se consigue mediante selección natural de variantes y/o mutantes que proporcionan una ventaja selectiva para permitir la supervivencia de la bacteria cuando se expone a presiones ambientales tales como antibióticos. Un mutante puede crearse mediante inserción deliberada (*in vitro*) de genes específicos en el genoma que no alteran fundamentalmente la funcionalidad bioquímica del organismo pero cuyos productos pueden utilizarse para la identificación o selección de la bacteria, por ejemplo la resistencia a antibióticos.

65 Un experto en la materia puede apreciar que las cepas mutantes o variantes pueden identificarse mediante análisis de homología de la secuencia de ADN con la cepa parental. Las cepas que tienen una identidad de secuencia cercana con la cepa parental sin diferencias fenotípicas demostrables o funcionales cuantificables se consideran

cepas mutantes o variantes. Una cepa con una identidad de secuencia (homología) del 99,5 % o más con la secuencia de ADN parental se puede considerar un mutante o variante. La homología de secuencias puede determinarse usando el programa "BLAST" de algoritmo de homología en línea, disponible públicamente en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

5 Los mutantes de la cepa parental también incluyen cepas derivadas que tienen al menos el 95,5 % de homología de secuencia con la secuencia polinucleotídica espaciadora intergénica 16s - 23s. Estos mutantes pueden comprender adicionalmente mutaciones de ADN en otras secuencias de ADN en el genoma bacteriano.

10 Breve descripción de las figuras

La invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción de algunas de sus realizaciones, proporcionadas solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

15 la Fig. 1 muestra la voluminosidad de la cepa de *B. longum* NCIMB 41715 y de *B. longum* NCIMB 41003 tal como se midió mediante la altura del sedimento esponjoso de EPS;

20 la Fig. 2 es un gráfico de barras del % de adherencia a hexadecano de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003;

la Fig. 3 es un gráfico de inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocinas de PBMC después de 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 positiva para EPS y una cepa de *Lactobacillus* que produce escasos EPS. Hay una mayor inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 tras la estimulación con el EPS +ve de *B. longum* NCIMB 41003 con respecto a la cepa *Lactobacillus* de escasos EPS;

25 la Fig. 4 es un gráfico de inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas de PBMC después de 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* que produce escasos EPS. Hay una menor inducción de la citocina proinflamatoria TNF- α tras la estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 positiva para EPS con respecto a la cepa *Lactobacillus* de escasos EPS;

30 la Fig. 5 es un gráfico de la inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocinas de PBMC tras 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y *B. longum* NCIMB 41715. Ambas cepas inducen, de una manera sensible a la dosis, niveles similares de la citocina antiinflamatoria IL-10;

35 la Fig. 6 es un gráfico de la inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas de PBMC tras 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y *B. longum* NCIMB 41715. *B. longum* NCIMB 41715 induce niveles similares de TNF- α con respecto a *B. longum* NCIMB 41003;

40 la Fig. 7 muestra que cuando se comparó con el grupo de control de dieta alta en grasa (HFD), *B. longum* NCIMB 41715 mostró una reducción significativa de ganancia de masa grasa en la semana 16, mientras que *B. longum* NCIMB 41003 no tuvo un efecto significativo;

45 la Fig. 8 ilustra el efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el peso de almohadilla de grasa. *B. longum* NCIMB 41715 tuvo una reducción significativa en los pesos de almohadillas de grasa (grasa subcutánea y grasa epididimal) mientras que *B. longum* NCIMB 41003 no tuvo un efecto significativo;

50 la Fig. 9 ilustra el efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol total y los triglicéridos hepáticos. *B. longum* NCIMB 41715, pero no *B. longum* NCIMB 41003, redujo el colesterol total y los triglicéridos hepáticos en ratones DIO;

la Fig. 10 ilustra el efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol plasmático total;

55 la Fig. 11 ilustra el efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol plasmático LDL;

la Fig. 12 ilustra el efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol plasmático VLDL;

60 la Fig. 13 ilustra el efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en la glucosa sanguínea final;

la Fig. 14 muestra la ingesta de alimento acumulada por ratón tras la administración de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 con respecto al grupo de control de dieta alta en grasa (HFD) en el modelo de ratón DIO; y

65 la Fig. 15 presenta la estimación del % de eliminación de energía acumulada tras la administración de *B. longum*

NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 con respecto al grupo de control de dieta alta en grasa (HFD) en el modelo de ratón DIO.

Descripción detallada de la invención

Se realizó un depósito de *Bifidobacterium longum* AH1362 en la Colección nacional de bacterias industriales y marinas (NCIMB, del inglés, National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited), Edificio Ferguson, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido, el 6 de mayo de 2010 y se le asignó el número de entrada NCIMB 41715.

Esta memoria descriptiva también hace referencia a modo de comparación a la cepa 35624 de *Bifidobacterium longum* que está depositada en la Colección nacional de bacterias industriales y marinas (NCIMB), Edificio Ferguson, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA, Escocia, Reino Unido, el 13 de enero de 1999 con el número de entrada NCIMB 41003.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen adicionalmente y demuestran realizaciones dentro del ámbito de la invención. Los ejemplos se proporcionan solamente con el propósito de ilustrar y no deben ser interpretados como limitaciones de la presente invención, ya que son posibles muchas variaciones de los mismos sin salirse del espíritu y del ámbito de la invención.

Se ha encontrado que una nueva cepa de *Bifidobacterium* que produce EPS (*B. longum* AH1362) atenúa marcadores asociados con la obesidad y trastornos metabólicos asociados. La administración de *B. longum* AH1362 se asoció con alteración de la microbiota intestinal, un menor almacenamiento de grasa y menores niveles hepáticos de triglicéridos y de colesterol total e incremento de eliminación de grasa. Sorprendentemente, la administración de *B. longum* NCIMB 41003 no tuvo el mismo efecto.

Ejemplo 1 - La identidad de *B. longum* NCIMB 41715 se confirmó mediante análisis de BLAST en la región espaciadora intergénica (IGS).

Método

Se realizó la secuenciación del espaciador intergénico (IGS) 16s-23s para identificar *B. longum* NCIMB 41715. En resumen, se aisló el ADN total de las cepas utilizando 100 µl de solución de extracción y 25 µl de solución de preparación de tejido (Sigma-Aldrich, kit de XNAT2). Las muestras se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente seguido de 2 h a 95 °C y después se añadieron 100 µl de solución de neutralización (Sigma-Aldrich, kit de XNAT2). La solución de ADN se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop y se almacenó a 4 °C. Se realizó una PCR utilizando los cebadores de IGS. Los pares de cebadores utilizados para la identificación de ambas cepas fueron IGS R 5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3' e IGS L 5'-GCTGGATCACCTCCTTTCT-3'. Las condiciones de los ciclos fueron 94 °C durante 4 min (1 ciclo), 94 °C durante 45 s, 53 °C durante 45 s, 72 °C durante 45 s (28 ciclos). La reacción de PCR contenía 2 µl (100 ng) de ADN, PCR mix (Sigma-Aldrich, Red Taq) y una concentración 0,025 nM de cebador L y R de IGS (MWG Biotech, Alemania). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf. Los productos de PCR se desplazaron junto con un marcador de peso molecular (100 pb Ladder, Roche) en un gel teñido de EtBr de agarosa al 2% en TAE, para determinar el perfil de IGS. Los productos de PCR de *Bifidobacterium* (banda única) se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR Promega Wizard. Los productos de PCR de *Lactobacillus* produjeron 3 bandas. La banda presente a aproximadamente 280 pb (banda inferior) se cortó, se purificó utilizando la columna de centrifugación de agarosa GenElute (Sigma-Aldrich) y se resecuenció como anteriormente y el producto de PCR se purificó utilizando el kit de purificación de PCR Promega Wizard. Los productos purificados de PCR se secuenciaron en Beckman Coulter Genomics (Reino Unido) utilizando las secuencias cebadoras (véase más arriba) para la región espaciadora intergénica. Los datos de secuencia se compararon entonces con la base de datos de nucleótidos de la NCBI para determinar la identidad de la cepa por homología de nucleótidos. Los datos de secuencia de ADN resultantes se sometieron al motor de búsqueda estándar de BLAST de homología de nucleótido a nucleótido de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para identificar el emparejamiento más próximo a la secuencia.

Resultados

Tabla 1: Resultados de Blast de la región espaciadora intergénica (IGS) de *B. longum* NCIMB 41715.

Muestra	Número de entrada	Emparejamiento más próximo en NCBI BLAST 12/07/15	Identities	% Emparejamiento	pb
NCIMB 41715	gb(CP010453.1)	<i>Bifidobacterium longum</i> cepa BG7, genoma completo	480/484	99 %	495
	emb(LN824140.1)	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. ensamblaje de genoma de infantis			

Tabla 2: Secuencia de la región espaciadora intergénica (IGS) de *B. longum* NCIMB 41715.

Secuencia de IGS de <i>B. longum</i> NCIMB 41715 (495 nt)	TGCTGGGATCACCTCCTTTCTACGGAGAATTCAGTCGGATGTTTCGT CCGACGGTGTGCGCCCCGCGCTCGCATGGTGCG ATGGCGGCGGGGTTGCTGGTGTGGAAGACGTCGTTGGCTTTGCC TGCCGGTTCGTGCGGTGGGTGCGGGGTGGTATGGAT GCGCTTTTGGGCTCCCGGATCGCCACCCAGGCTTTTGCCTGGCG CGATTTCGATGCCCGTCGTGCCTGGGGGCCGGCCG TGTGCCGGCGCGATGGCGTGGCGGTGCGTGGTGGCTTGAGAACT GGATAGTGGACGCGAGCAAAACAAGGGTTTTTGAAT CTTTGTTTTGCTGTTGATTTTCGAATCGAACTCTATTGTTTCGTTTCGA TCGTTTTGTGATCATTTTTAGTGTGATGATTTG TCGTCTGGGAATTTGCTAGAGGAATACTTGC GGCCATGCACTTCGT GGTGTGTGTTGCTTGCAAGGGCGTATGGTGGAGG CCTTCGACCACCAGA
---	---

Ejemplo 2 - Prueba de sedimento esponjoso de EPS (voluminosidad de la cepa)

5 Método

Cada cepa se fermentó en un caldo. Las partículas recogidas tras el centrifugado se lavaron y posteriormente se liofilizaron.

10 El polvo liofilizado, ajustado a un número total de células (2 x 10E10), se resuspendió en 10 ml de PBS y se centrifugó a 4000 rpm/10 min/4 °C.

Resultados

15 **Figura 1:** Voluminosidad de la cepa de *B. longum* NCIMB 41715 y de *B. longum* NCIMB 41003 tal como se midió mediante la altura del sedimento esponjoso de EPS.

B. longum NCIMB 41003 produjo un sedimento esponjoso de 0,9 cm mientras que *B. longum* NCIMB 41715 produjo un sedimento esponjoso de 2,5 cm.

20

Conclusión

Se sabe que *B. longum* NCIMB 41003 es un alto productor de EPS. La prueba de sedimento esponjoso de EPS y la altura de sedimento resultante, confirma que *B. longum* NCIMB 41715 produce EPS y produce más EPS que *B. longum* NCIMB 41003.

25

Ejemplo 3 - Ensayo de adherencia microbiana a hexadecano (MATH)

30 La hidrofobicidad es la propiedad física por la que una molécula repele el agua. Los materiales hidrófobos se utilizan para eliminar el aceite del agua, la gestión de vertidos de petróleo y los procesos de separación química para eliminar las sustancias no polares de compuestos polares. La hidrofobicidad de una célula bacteriana depende de la composición de su superficie celular con respecto a las proteínas, péptidos y polisacáridos presentes. La capacidad de una cepa probiótica de adherirse a la mucosa intestinal ayuda a la célula bacteriana a establecerse por sí misma durante el tránsito gastrointestinal proporcionándole una ventaja competitiva en el intestino. La hidrofobicidad de una cepa es un factor que contribuye a la capacidad de adherencia. La determinación de la adherencia bacteriana al hexadecano como un indicador de la capacidad de las cepas de adherirse a las células epiteliales intestinales es una aproximación cualitativa válida (Kiely & Olson, 2000).

35

Método

40

La capacidad de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 de adherirse al hexadecano como medida de su hidrofobicidad se determinó utilizando la prueba de adherencia microbiana al hexadecano (MATH). La adherencia al hexadecano se midió de acuerdo con el método de Rosenberg *et al.*, 1980 con algunas modificaciones (Crow and Gopal, 1995; Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Las bacterias se recogieron en la fase estacionaria por centrifugado a 5000 g durante 15 min, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 0,1 mol/l KNO₃ (pH 6,2) a una DO₆₀₀ de 0,8. Se midió la absorbancia de la suspensión celular a 600 nm (A₀). Se añadieron 2 ml de hexadecano (Sigma

45

Aldrich) a 2 ml de suspensión celular. Después de 10 min de preincubación a temperatura ambiente, el sistema de dos fases se mezcló mediante agitación vorticial durante 2 min. La fase acuosa se eliminó después de 20 min de incubación a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 600 nm (A1). El % de adherencia bacteriana a hexadecano se calculó como $(1-A1/A0) \times 100$, donde A0 y A1 son las absorbancias antes y después de la extracción de los disolventes, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado con células provenientes de cultivos independientes.

Resultados

10 **Figura 2:** % de adherencia de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 a hexadecano como medida de su hidrofobicidad.

Conclusión

15 *B. longum* NCIMB 41715 (58,3 %) mostró una mayor afinidad por hexadecano, indicando que tenía mayor hidrofobicidad, comparado con *B. longum* NCIMB 41003 (28,6 %).

Ejemplo 4 - Perfiles antiinflamatorios PBMC

20 Los perfiles antiinflamatorios de *B. longum* NCIMB 41715, *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* que produce escasos EPS se examinaron mediante la evaluación de la inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 y la citocina proinflamatoria TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

25 Método

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

30 Se obtuvo sangre de tres voluntarios sanos con la aprobación del comité de Ética de investigación clínica de los Cork Teaching Hospitals. Todos los sujetos se abstuvieron del uso de medicación probiótica, antibiótica o antiinflamatoria durante un mes o más antes de la donación de sangre. Se extrajeron PBMC de sangre completa por separación de gradiente de densidad utilizando histopaque (Sigma-Aldrich), un polisacárido hidrófilo que separa capas de sangre, con una 'capa leucocitaria' que se forma bajo una capa de plasma que contiene las PBMC. Para cada cepa, se pesaron 100 mg de polvo liofilizado y se resuspendieron en PBS estéril de Dulbecco (Sigma-Aldrich).
 35 Las células bacterianas se lavaron dos veces por centrifugado (4000 rpm/10 min/4 °C/Parada 0) y se resuspendieron en PBS estéril. Se realizaron recuentos directos al microscopio y las preparaciones de células se diluyeron a las concentraciones adecuadas para llegar a la proporción 100:1; 50:1; 25:1 de bacterias totales: células PBMC. Se realizaron réplicas técnicas por triplicado. Se incubaron las PBMC a una concentración de 2×10^5 células/ml durante 48 h a 37 °C (en presencia de penicilina y estreptomycin (Sigma-Aldrich)) con medio de control o con
 40 concentraciones crecientes de las cepas bacterianas: 1×10^6 células/ml (25:1 Bacterias:PBMC), 1×10^7 células/ml (50:1 Bacterias:PBMC) y 2×10^7 células/ml (100:1 Bacterias:PBMC). Se ensayaron los sobrenadantes para la citocina antiinflamatoria IL-10 y la citocina proinflamatoria TNF- α , que se midieron utilizando los kits de cultivo tisular de plataforma multiplex de MesoScale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics, Maryland, EE.UU.). *B. longum* NCIMB 41003, que previamente ha mostrado tener actividad antiinflamatoria (Groeger *et al.*, 2013), se utilizó como
 45 un control positivo para validar la precisión del ensayo.

Resultados

50 **Figura 3:** Inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocina de PBMC seguido de 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 positiva para EPS y una cepa de *Lactobacillus* que produce escasos EPS.

Hay una mayor inducción de la citocina antiinflamatoria IL-10 tras la estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 positiva para EPS con respecto a la cepa *Lactobacillus* de escasos EPS.

55 **Figura 4:** Inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocinas de PBMC tras 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* que produce escasos EPS. Hay una menor inducción de la citocina proinflamatoria TNF- α tras la estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 positiva para EPS con respecto a la cepa *Lactobacillus* de escasos EPS.

60 **Figura 5:** Inducción de IL-10 en el ensayo de inducción de citocina de PBMC tras 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y *B. longum* NCIMB 41715. Ambas cepas inducen, de una manera sensible a la dosis, niveles similares de la citocina antiinflamatoria IL-10.

65 **Figura 6:** Inducción de TNF- α en el ensayo de inducción de citocina de PBMC tras 48 h de estimulación con *B. longum* NCIMB 41003 y *B. longum* NCIMB 41715. *B. longum* NCIMB 41715 induce niveles similares de TNF- α con respecto a *B. longum* NCIMB 41003.

Conclusión

5 *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003, que son ricos en EPS, inducen perfiles inmunitarios antiinflamatorios similares en un ensayo de inducción de citocinas de PBMC. La cepa que produce escasos EPS produce un perfil inmunitario muy diferente.

10 **Ejemplo 5 - Efecto de la administración de *B. longum* NCIMB 41715, *B. longum* NCIMB 41003 y una cepa de *Lactobacillus* de escasos EPS sobre los resultados metabólicos en el modelo de ratón de obesidad inducida por dieta (DIO)**

MétodoAnimales

15 Unos ratones macho de 7 semanas de edad C57BL/6JRccHsd (Harlan Laboratories, Países Bajos) (72 ratones, n=12 por grupo), aleatorizados basándose en el peso corporal, se mantuvieron en un ambiente controlado a 22 ± 3 °C de temperatura, 50 ± 20 % de humedad, un ciclo de luz/oscuridad de 12 h cada uno y 15-20 cambios de aire fresco por hora. Los ratones se encerraron en grupos (4 ratones por jaula) y se utilizaron mazorcas de maíz autoclavadas como material para los lechos. Los ratones se recibieron con 5 semanas de edad y se mantuvieron en cuarentena durante una semana tras la cual se aclimataron durante una semana antes del comienzo del estudio. Desde el día 0, los ratones se alimentaron *ad libitum* y se proporcionó a los ratones en cada jaula 50 ml de agua estéril para beber (grupos 1 y 2; Tabla 1) o agua para beber que contenía probiótico liofilizado (1×10^9 ufc/dosis/día) a través de botellas de policarbonato equipadas con tubos de boquilla de acero inoxidable (grupos 3, 4, 5 y 6; Tabla 1). El tratamiento continuó durante 16 semanas.

Diseño experimental

30 Del día 0 en adelante, el grupo 1 se alimentó con dieta baja en grasa (LFD) D12450 (10 % kcal % grasa, irradiada con gamma; Research Diets Inc, EE.UU.) y los otros cinco grupos (grupos 2 a 6) se alimentaron con dieta alta en grasa (HFD) D12451 (45 % kcal % grasa, irradiada con gamma; Research Diets Inc) durante un periodo de 16 semanas. La alimentación HFD indujo resistencia a insulina y obesidad en animales que se caracterizó por el incremento de peso corporal y de valores de glucosa sanguínea en ayunas. A los grupos 1 y 2 se les proporcionó agua estéril para beber mientras que a los grupos 3, 4, 5 y 6 se les proporcionó agua para beber que contenía 1×10^9 ufc/dosis/día del probiótico adecuado (Tabla 1). Se realizó una observación de salud general cada día a la misma hora del día. Esta incluyó estado de alerta, textura del pelo, movimiento en la jaula y presencia de cualquier secreción de la nariz, ojos, boca y oídos. En cada jaula se dejó la comida medida previamente y los restos de comida se midieron y grabaron cada tres días para calcular la cantidad de comida consumida por los ratones. El consumo de agua de los animales se midió a diario empezando por la dosis del primer día. Se proporcionaron 50 ml de agua a los ratones en cada jaula (n=4) diariamente. El agua sobrante en cada jaula se midió cada 24 h.

Pesos y muestreo de tejido

45 Los pesos corporales se registraron individualmente para todos los animales en la recepción, el día de la aleatorización, antes del tratamiento y una vez cada tres días desde entonces. El porcentaje de cambio en el peso corporal se calculó de acuerdo con la fórmula $(TT-TC)/TC * 100$ donde TT es el día de prueba tratado y TC es el día de prueba control. Los ratones se sometieron a Imagen por resonancia magnética Eco (MRI) utilizando un Echo MRI (EchoMRI-700™) en los días -1 y 28, 56, 84 y 112 para calcular la grasa corporal y la composición de masa magra. El animal se situó en un soporte de plástico sin sedación o anestesia. La grasa se midió como la masa de todas las moléculas de grasa en el cuerpo. Magro es una masa de tejido muscular equivalente a todas las partes del cuerpo que contienen agua. La contribución al "agua libre" proviene en mayor medida de la vejiga. El agua total incluye tanto el agua libre como el agua contenida en la masa magra, que es el contenido total de agua del cuerpo. Los soportes de plástico se desinfectaron entre animales de diferentes grupos para evitar contaminación cruzada. Se siguieron técnicas asépticas mientras se manipularon animales de diferentes grupos. Al final de la semana 16, se sacrificaron los animales mediante asfixia con CO₂. Se recogieron hígado, músculo esquelético, grasa visceral (epididimal, renal y mesentérica), grasa subcutánea, bazo, ciego, grasa adiposa marrón, cerebro e intestino, se pesaron y conservaron a -80 °C para futuros análisis bioquímicos y genéticos.

Marcadores metabólicos

60 Se tomaron muestras de sangre a las 9 a.m. mediante el método de pellizco de cola en los días 0, 30, 60, 90 y 112 para las mediciones de glucosa sanguínea aleatoria (se hicieron un total de 5 muestreos), empezando/incluyendo el primer día de dosis. El análisis de glucosa sanguínea se hizo mediante un glucómetro de Johnson and Johnson (One touch Ultra 2). Se siguieron técnicas asépticas mientras se manipularon animales de diferentes grupos. Al final de 16 semanas, se hizo ayunar a los animales durante 6 h y se extrajo sangre mediante el método de pellizco de cola (extracción de sangre de modo no anestésico) para la estimación de la glucosa sanguínea. La sangre se extrajo

mediante el método de punción retro-orbital bajo anestesia ligera de isoflurano y se separó el plasma, que se usó para estimar el colesterol total (TC), triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) mediante el analizador de química clínica totalmente automatizado de acceso aleatorio (EM-360, Erba Mannheim, Alemania). Los niveles plasmáticos de VLDL se obtuvieron mediante el método de cálculo: $(VLDL = \text{Triglicéridos (mg/dl)} / 5)$. Para la estimación de TC y TG hepáticos, el hígado se homogeneizó en isopropanol (1 ml/50 mg de tejido) y se incubó a 4 °C durante 1 h. Las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 2.500 rpm. Las concentraciones de colesterol y triglicéridos en los sobrenadantes se midieron mediante un analizador de química clínica totalmente automatizado de acceso aleatorio (EM-360, Erba Mannheim).

Estimación de eliminación de energía

Se recogieron dos sedimentos fecales de cada ratón en las semanas 6, 10 y 15 y se analizaron para comprobar su valor calorífico bruto mediante una bomba calorimétrica. Para el análisis calorimétrico, las muestras se pesaron y se secaron en un horno a 60 °C durante 48 h. El contenido en energía de las heces se evaluó con un calorímetro Parr 6100 utilizando una semi-micro bomba 1109 (Parr Instruments & Co., Moline, Illinois, EE.UU.). El factor de equivalente energético del calorímetro se determinó utilizando patrones de ácido benzoico y cada muestra (100 mg) se analizó por triplicado. La eliminación de energía acumulada de ratones alimentados con probióticos a lo largo del estudio se estimó como un porcentaje relativo a la energía eliminada por los ratones del grupo de control de la dieta alta en grasa.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo realizando una prueba t desapareada para las diferencias entre los dos grupos. Se utilizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido de un test de Tukey de comparaciones múltiples cuando se examinaron más de dos grupos. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Tabla 5: Grupos experimentales y pautas de tratamiento y dieta asociados. LFD= control de dieta baja en grasa; HFD= control de dieta alta en grasa.

(Grupos)	Número de ratones/grupo	Pauta de dieta	Pauta de tratamiento
Grupo 1 (control de LFD)	12	10 % grasa kcal	Agua estéril para beber,
(Grupo 2 (control de HFD)	12	45 % grasa kcal	Agua estéril para beber, diariamente
Grupo 4 (HFD) + cepa de <i>Lactobacillus</i> de escasos EPS)	12	45 % grasa kcal	1 x 10 ⁹ ufc/dosis/día en agua para beber, diariamente
Grupo 5 (HFD + <i>B. longum</i> NCIMB 41715)	12	45 % grasa kcal	1 x 10 ⁹ ufc/dosis/día en agua para beber, diariamente
Grupo 6 (HFD + <i>B. longum</i> NCIMB 41003)	12	45 % grasa kcal	1 x 10 ⁹ ufc/dosis/día en agua para beber, diariamente

Resultados

Figura 7: Cuando se comparó el grupo de control con la dieta alta en grasa (HFD), *B. longum* NCIMB 41715 mostró una reducción significativa de ganancia de masa grasa en la semana 16, mientras que *B. longum* NCIMB 41003 no tuvo un efecto significativo.

Figura 8: Efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el peso de la almohadilla de grasa. *B. longum* NCIMB 41715 tuvo una reducción significativa en los pesos de la almohadilla de grasa (grasa subcutánea y grasa epididimal) mientras que *B. longum* NCIMB 41003 no tuvo un efecto significativo.

Figura 9: Efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol total y los triglicéridos hepáticos. *B. longum* NCIMB 41715 pero no *B. longum* NCIMB 41003 redujeron el colesterol total y los triglicéridos hepáticos en ratones DIO.

Figura 10: Efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol plasmático total.

Figura 11: Efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol plasmático LDL.

Figura 12: Efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en el colesterol plasmático VLDL.

Figura 13: Efecto de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 en la glucosa sanguínea final.

Figura 14: Ingesta de alimento acumulada por ratón tras la administración de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 con respecto al grupo de control de dieta alta en grasa (HFD) en el modelo de ratón DIO.

5 **Figura 15:** Estimación del % de eliminación de energía acumulada tras la administración de *B. longum* NCIMB 41715 y *B. longum* NCIMB 41003 con respecto al grupo de control de dieta alta en grasa (HFD) en el modelo de ratón DIO.

La cepa de *Lactobacillus* que produce escasos EPS no tuvo ningún efecto significativo en este modelo.

10

Conclusión

La administración de *B. longum* NCIMB 41715 condujo a una reducción significativa en la masa de grasa en la semana dieciséis en ambas cepas. Esto se acompañó de una reducción estadísticamente significativa en la grasa subcutánea y en la grasa epididimal para *B. longum* NCIMB 41715. La administración de *B. longum* NCIMB 41715 condujo a una reducción significativa en los niveles hepáticos de colesterol total y de triglicéridos cuando se comparó con el grupo de control HFD. Asimismo, se observó una mejora significativa en el colesterol total, colesterol LDL y colesterol VLDL con la administración de *B. longum* NCIMB 41715 cuando se comparó con el grupo de control HFD. A pesar de la diferencia no significativa en la ingesta de alimento acumulada a lo largo del estudio, se observó un aumento en el % de eliminación de energía para *B. longum* NCIMB 41715, que sugiere que la administración de la cepa hidrófoba *B. longum* NCIMB 41715 puede reducir la cantidad de energía extraída de la comida ingerida que podría ser responsable de las mejoras en los resultados metabólicos observados en este modelo de ratón DIO.

15

20

Prebióticos

25

La introducción de organismos probióticos se consigue mediante la ingesta del microorganismo en un vehículo adecuado. Resultaría una ventaja proporcionar un medio que promocionara el crecimiento de la cepa en el intestino grueso. La adición de uno o más oligosacáridos, polisacáridos u otros prebióticos mejora el crecimiento de bacterias del ácido láctico en el tubo digestivo. Los prebióticos se refieren a cualquier componente alimentario no viable que fermenta específicamente en el colon por la acción de bacterias autóctonas a las que se atribuye un valor positivo, por ejemplo bifidobacterias, lactobacilos. Entre los tipos de prebióticos se pueden incluir aquellos que contienen fructosa, xilosa, soja, galactosa, glucosa y manosa. La administración combinada de una cepa probiótica con uno o más compuestos prebióticos puede mejorar el crecimiento del probiótico administrado *in vivo* dando como resultado un beneficio para la salud más pronunciado y que se denomina simbiótico.

30

35

Otros ingredientes activos

Se apreciará que la cepa puede administrarse profilácticamente o como un método de tratamiento en sí mismo o con otros materiales probióticos y/o prebióticos como se describió anteriormente. Además, la cepa se puede utilizar como parte de una pauta profiláctica o de tratamiento utilizando otros materiales activos tales como aquellos utilizados para tratar la inflamación u otros trastornos, especialmente aquellos con una implicación inmunológica. Tales combinaciones pueden administrarse en una formulación única o como formulaciones independientes administradas a la vez o en momentos diferentes y utilizando las mismas o diferentes vías de administración.

40

Formulaciones

Se pueden administrar una o más de las cepas de la invención a animales (seres humanos incluidos) en una forma ingerible por vía oral en una preparación convencional tal como cápsulas, microcápsulas, comprimidos, granulados, polvo, pastillas para chupar, píldoras, supositorios, suspensiones y jarabes. Las formulaciones adecuadas pueden prepararse por métodos comúnmente empleados usando aditivos orgánicos e inorgánicos convencionales. La cantidad de ingrediente activo en la composición médica puede estar a un nivel que ejercerá el efecto terapéutico deseado.

50

La formulación puede incluir también un componente bacteriano, un fármaco o un compuesto biológico.

55

Además, una vacuna que comprende una o más de las cepas de la invención se puede preparar utilizando cualquier método conocido adecuado y puede incluir un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Las cepas de la invención pueden formularse para facilitar la liberación controlada tal como una liberación retardada de la cepa. Por ejemplo, la formulación puede adaptarse para liberar la cepa en un lugar determinado en el tubo digestivo tal como el intestino delgado o en el colon. Para conseguir tal liberación controlada, la cepa puede formularse en una cápsula que tenga un revestimiento que esté adaptado a la liberación de la cepa en un lugar determinado. Para facilitar tal liberación controlada existe una gama de revestimientos disponibles. Una de tales familias de revestimientos son las disponibles bajo la marca comercial Eudragit.

60

65

Referencias

- ADAMS, E. L., RICE, P. J., GRAVES, B., ENSLEY, H. E., YU, H., BROWN, G. D., GORDON, S., MONTEIRO, M. A., PAPP-SZABO, E., LOWMAN, D. W., POWER, T. D., WEMPE, M. F. & WILLIAMS, D. L. 2008. Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *J Pharmacol Exp Ther*, 325, 115-23.
- ARONSSON, L., HUANG, Y., PARINI, P., KORACH-ANDRE, M., HAKANSSON, J., GUSTAFSSON, J. A., PETERSSON, S., ARULAMPALAM, V. & RAFTER, J. 2010. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). *PLoS One*, 5.
- BACKHED, F., DING, H., WANG, T., HOOPER, L. V., KOH, G. Y., NAGY, A., SEMENKOVICH, C. F. & GORDON, J. I. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15718-23.
- BACKHED, F., MANCHESTER, J. K., SEMENKOVICH, C. F. & GORDON, J. I. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 979-84.
- BLAND, E. J., KESHAVARZ, T. & BUCKE, C. 2004. The influence of small oligosaccharides on the immune system. *Carbohydr Res*, 339, 1673-8.
- CANI, P. D., AMAR, J., IGLESIAS, M. A., POGGI, M., KNAUF, C., BASTELICA, D., NEYRINCK, A. M., FAVA, F., TUOHY, K. M., CHABO, C., WAGET, A., DELMEE, E., COUSIN, B., SULPICE, T., CHAMONTIN, B., FERRIERES, J., TANTI, J. F., GIBSON, G. R., CASTEILLA, L., DELZENNE, N. M., ALESSI, M. C. & BURCELIN, R. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56, 1761-72.
- CANI, P. D., BIBILONI, R., KNAUF, C., WAGET, A., NEYRINCK, A. M., DELZENNE, N. M. & BURCELIN, R. 2008a. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57, 1470-81.
- CANI, P. D., DELZENNE, N. M., AMAR, J. & BURCELIN, R. 2008b. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)*, 56, 305-9.
- FANNING, S., HALL, L. J., CRONIN, M., ZOMER, A., MACSHARRY, J., GOULDING, D., MOTHERWAY, M. O., SHANAHAN, F., NALLY, K., DOUGAN, G. & VAN SINDEREN, D. 2012. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2108-13.
- GREGOR, M. F. & HOTAMISLIGIL, G. S. 2011. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, 29, 415-45.
- GUH, D. P., ZHANG, W., BANSBACK, N., AMARSI, Z., BIRMINGHAM, C. L. & ANIS, A. H. 2009. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*, 9, 88.
- GUPTA, S., RICHARD, L. & FORSYTHE, A. 2015. The humanistic and economic burden associated with increasing body mass index in the EU5. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 8, 327-38.
- HIDALGO-CANTABRANA, C., LOPEZ, P., GUEIMONDE, M., DE LOS REYES-GAVILAN, C., SUAREZ, A., MARGOLLES, A. & RUAS-MADIEDO, P. 2012. Immune Modulation Capability of Exopolysaccharides Synthesised by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 227-237.
- HIDALGO-CANTABRANA, C., NIKOLIC, M., LOPEZ, P., SUAREZ, A., MILJKOVIC, M., KOJIC, M., MARGOLLES, A., GOLIC, N. & RUAS-MADIEDO, P. 2014. Exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains and their polymers elicit different responses on immune cells from blood and gut associated lymphoid tissue. *Anaerobe*, 26, 24-30.
- JONES, S. E., PAYNICH, M. L., KEARNS, D. B. & KNIGHT, K. L. 2014. Protection from intestinal inflammation by bacterial exopolysaccharides. *J Immunol*, 192, 4813-20.
- KAHN, S. E., HULL, R. L. & UTZSCHNEIDER, K. M. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-6.
- KANKAINEN, M., PAULIN, L., TYNKKYNNEN, S., VON OSSOWSKI, I., REUNANEN, J., PARTANEN, P., SATOKARI, R., VESTERLUND, S., HENDRICKX, A. P., LEBEER, S., DE KEERSMAECKER, S. C., VANDERLEYDEN, J., HAMALAINEN, T., LAUKKANEN, S., SALOVUORI, N., RITARI, J., ALATALO, E., KORPELA, R., MATTILA-SAND- HOLM, T., LASSIG, A., HATAKKA, K., KINNUNEN, K. T., KARJALAINEN, H.,

SAXELIN, M., LAAKSO, K., SURAK-KA, A., PALVA, A., SALUSJARVI, T., AUVINEN, P. & DE VOS, W. M. 2009. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 17193-8.

5 KOTZAMPASSI, K., GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. & STAVROU, G. 2014. Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. *ISRN Obes*, 2014, 651895.

10 LEE, H. Y., PARK, J. H., SEOK, S. H., BAEK, M. W., KIM, D. J., LEE, K. E., PAEK, K. S., LEE, Y. & PARK, J. H. 2006. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta*, 1761, 736-44.

15 NAITO, E., YOSHIDA, Y., MAKINO, K., KOUNOSHI, Y., KUNIHICO, S., TAKAHASHI, R., MATSUZAKI, T., MIYAZAKI, K. & ISHIKAWA, F. 2011. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in diet-induced obesity mice. *J Appl Microbiol*, 110, 650-7.

20 RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., CHENG, J., DUNCAN, A. E., KAU, A. L., GRIFFIN, N. W., LOMBARD, V., HENRISSAT, B., BAIN, J. R., MUEHLBAUER, M. J., ILKAYEVA, O., SEMENKOVICH, C. F., FUNAI, K., HAYASHI, D. K., LYLE, B. J., MARTINI, M. C., URSELL, L. K., CLEMENTE, J. C., VAN TREUREN, W., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., NEWGARD, C. B., HEATH, A. C. & GORDON, J. I. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 341, 1241214.

25 TURNBAUGH, P. J., HAMADY, M., YATSUNENKO, T., CANTAREL, B. L., DUNCAN, A., LEY, R. E., SOGIN, M. L., JONES, W. J., ROE, B. A., AFFOURTIT, J. P., EGHOLM, M., HENRISSAT, B., HEATH, A. C., KNIGHT, R. & GORDON, J. I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457, 480-4.

TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E. R. & GORDON, J. I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027-31.

30 VINDEROLA, G., PERDIGON, G., DUARTE, J., FARNWORTH, E. & MATAR, C. 2006. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, 36, 254-60.

35 VOLMAN, J. J., RAMAKERS, J. D. & PLAT, J. 2008. Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol Behav*, 94, 276-84.

40 VRIEZE, A., VAN NOOD, E., HOLLEMAN, F., SALOJARVI, J., KOOTTE, R. S., BARTELSMAN, J. F., DALLINGA-THIE, G. M., ACKERMANS, M. T., SERLIE, M. J., OOZEER, R., DERRIEN, M., DRUESNE, A., VAN HYLCKAMA Vlieg, J. E., BLOKS, V. W., GROEN, A. K., HEILIG, H. G., ZOETENDAL, E. G., STROES, E. S., DE VOS, W. M., HOEKSTRA, J. B. & NIEUWDORP, M. 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143, 913-6.e7.

WHO (2015) Obesity and overweight. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> (acceso: 10 de diciembre de 2015).

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Alimentary Health Limited

50 <120> *Bifidobacterium longum* para el tratamiento de obesidad y desórdenes metabólicos asociados

<130> ALIM60/C/WO

<150> EP15199660.0

55 <151> 2015-12-11

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

60 <210> 1

<211> 495

<212> ADN

<213> *Bifidobacterium longum*

65 <400> 1

ES 2 760 076 T3

tgctgggatc acctcctttc tacggagaat tcagtcggat gttcgtccga cgggtgtgcg	60
cccgcgcgtc gcatggtgcg atggcggcgg ggttgctggt gtggaagacg tcgttggctt	120
tgccctgccg gtcgtgcggt ggggtgcggg tggtatggat gcgcttttgg gctcccggat	180
cgccaccca ggctttttgc ctggcgcgat tcgatccccg tcgtgcctgg gggccggccg	240
tgtgccggcg cgatggcgtg gcggtgctg gtggcttgag aactggatag tggacgcgag	300
caaaacaagg gtttttgaat ctttgtttg ctggtgattt cgaatcgaac tctattgttc	360
gtttcgatcg ttttgtgatc attttttagtg tgatgatttg tcgtctggga atttgctaga	420
ggaatacttg cggccatgca cttcgtggtg tgtgttgctt gcaagggcgt atggtggagg	480
ccttcgacca ccaga	495

5 <210> 2
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 2
 ctggtgcaa gcatcca 18

15 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> secuencia sintetizada

<400> 3
 gctggatcac ctctttct 19

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Bifidobacterium longum* AH1362 depositada en la NCIMB con el número de entrada NCIMB 41715.
- 5 2. Una cepa según la reivindicación 1 en la forma de células viables.
3. Una cepa según la reivindicación 1 en la forma de células no viables.
- 10 4. Una formulación que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5 10 5. Una formulación según la reivindicación 4 que comprende adicionalmente un material probiótico o un material prebiótico.
- 15 6. Una formulación según las reivindicaciones 4 o 5 que comprende adicionalmente un vehículo ingerible, en donde el vehículo ingerible puede ser un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una cápsula, comprimido o polvo, el vehículo ingerible puede ser un producto alimentario tal como leche acidificada, yogur, yogur helado, leche en polvo, concentrado de leche, queso untable, aderezos o bebidas.
- 20 7. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 que comprende adicionalmente una proteína y/o péptido, en particular proteínas y/o péptidos que son ricos en glutamina/glutamato, un lípido, un carbohidrato, una vitamina, mineral y/u oligoelemento.
- 25 8. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en la que la cepa está presente en una cantidad de más de 10^6 ufc por gramo de la formulación.
- 30 9. Una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 que comprende adicionalmente un adyuvante y/o un fármaco.
- 10 30 10. Una composición liofilizada que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9.
- 35 11. Un producto alimentario que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una composición según la reivindicación 10.
- 40 12. Un medicamento que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una composición según la reivindicación 10.
- 45 13. Una cápsula que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, una formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una composición según la reivindicación 10, en donde la cápsula puede adaptarse a la liberación controlada en el tubo digestivo.
14. Una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una composición según la reivindicación 10 para utilizar en la prevención o tratamiento de la obesidad o del síndrome metabólico relacionado con obesidad.
15. Una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 o una composición según la reivindicación 10 para utilizar en la prevención o tratamiento de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD).

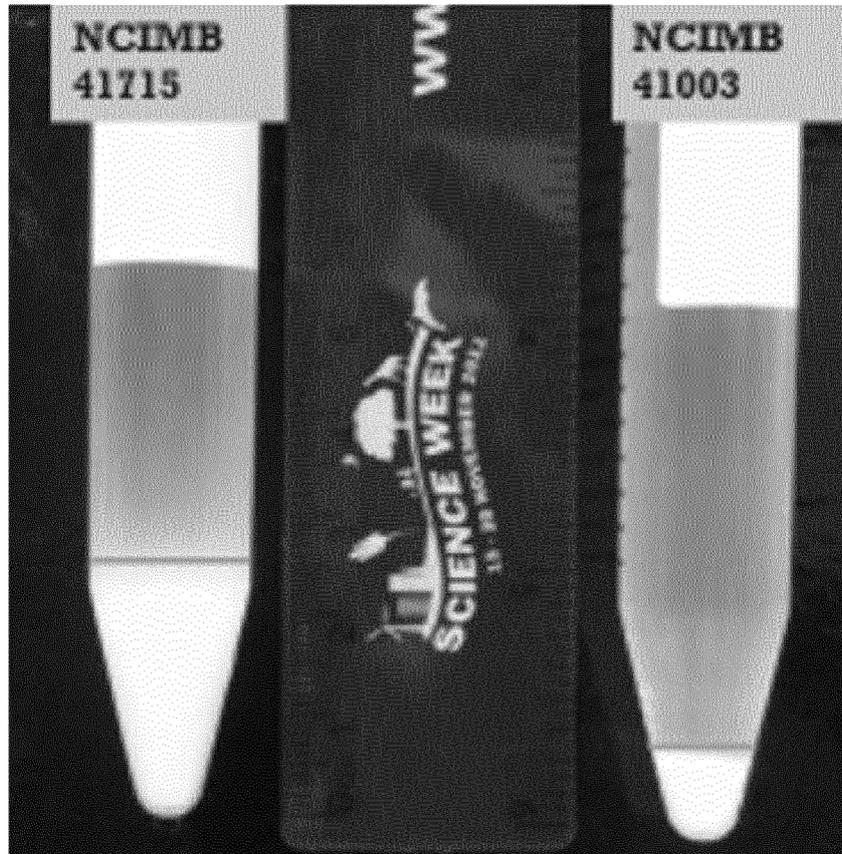


Fig. 1

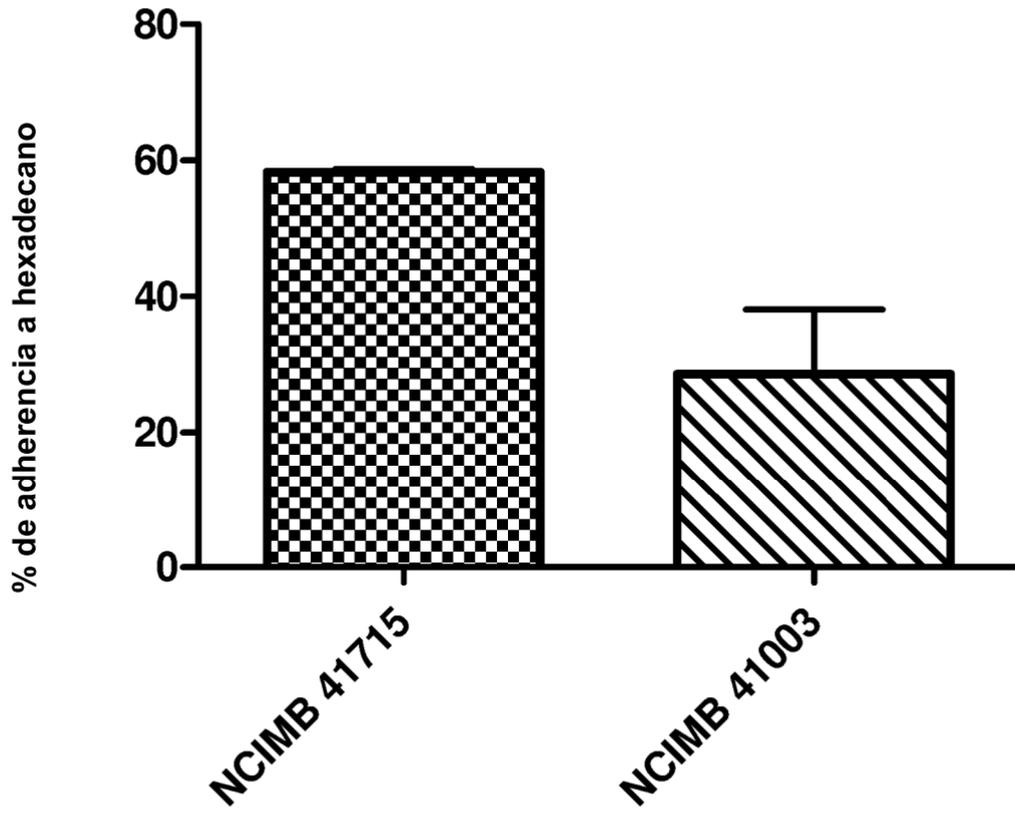


Fig. 2

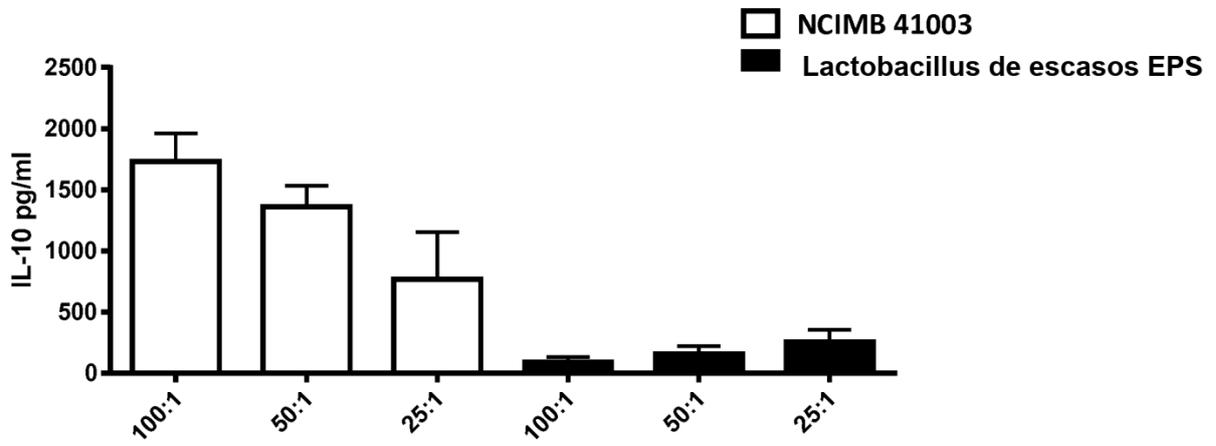


Fig. 3

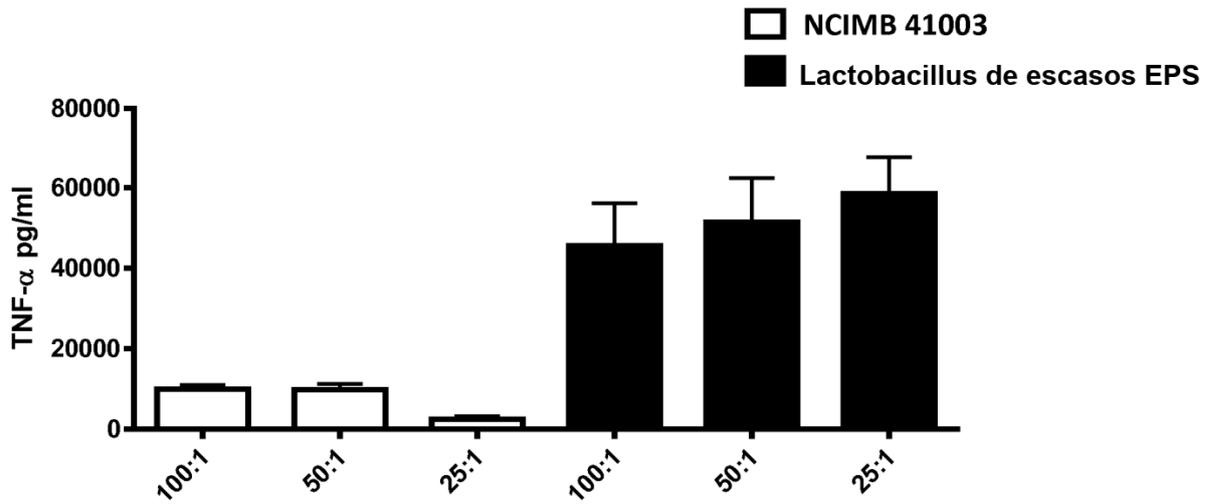


Fig. 4

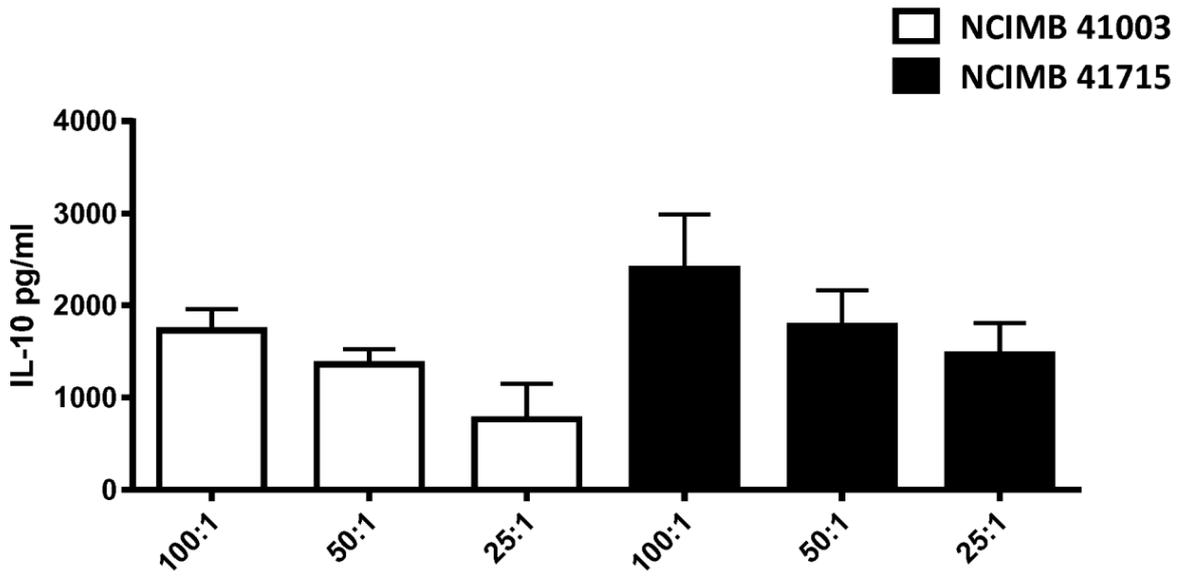


Fig. 5

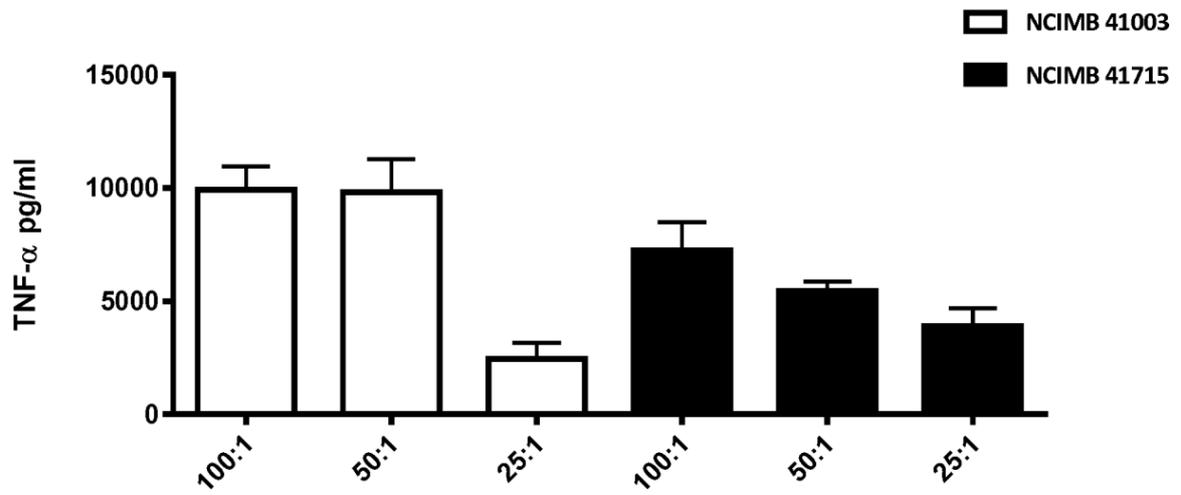
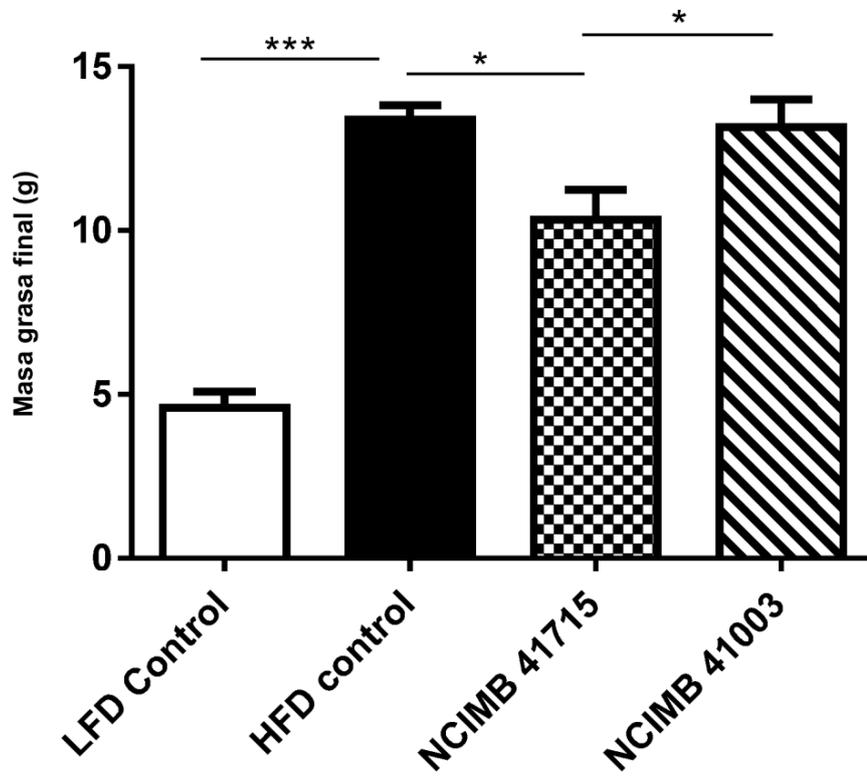


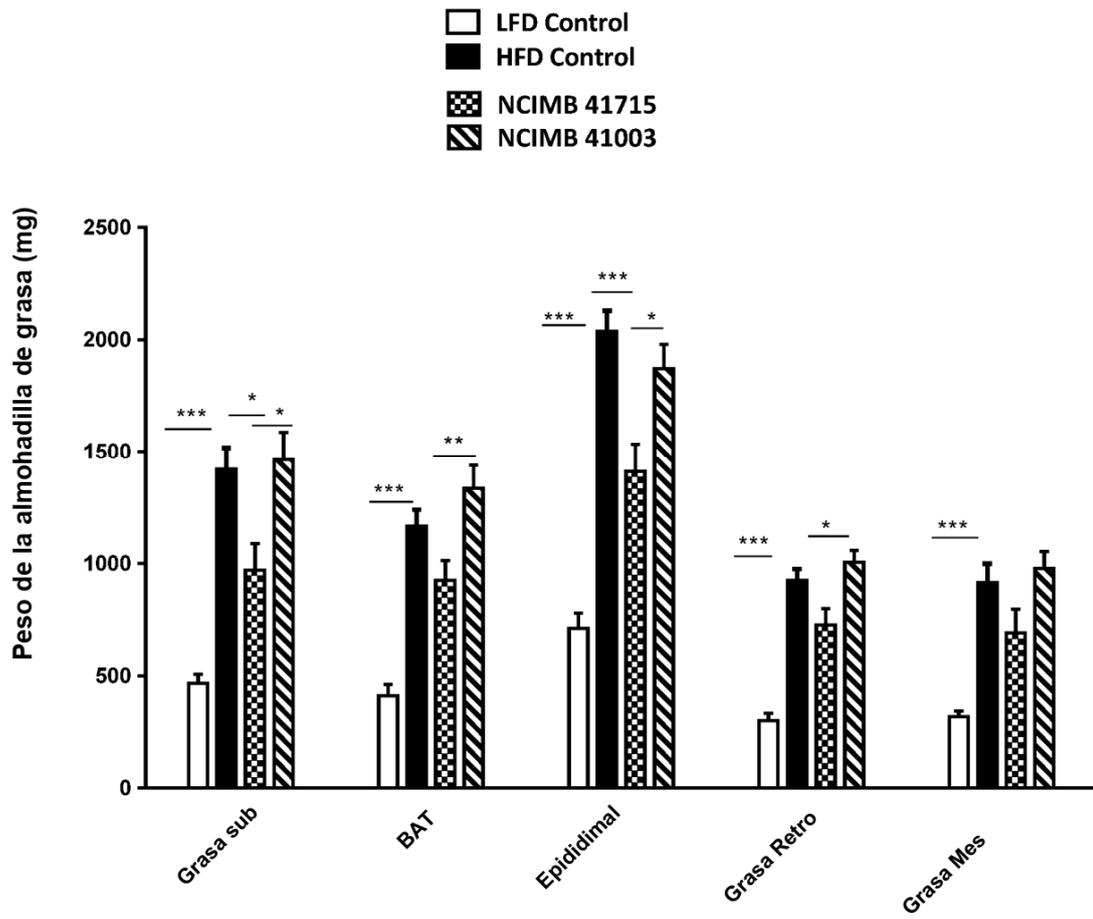
Fig. 6



- 1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)

*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Fig. 7

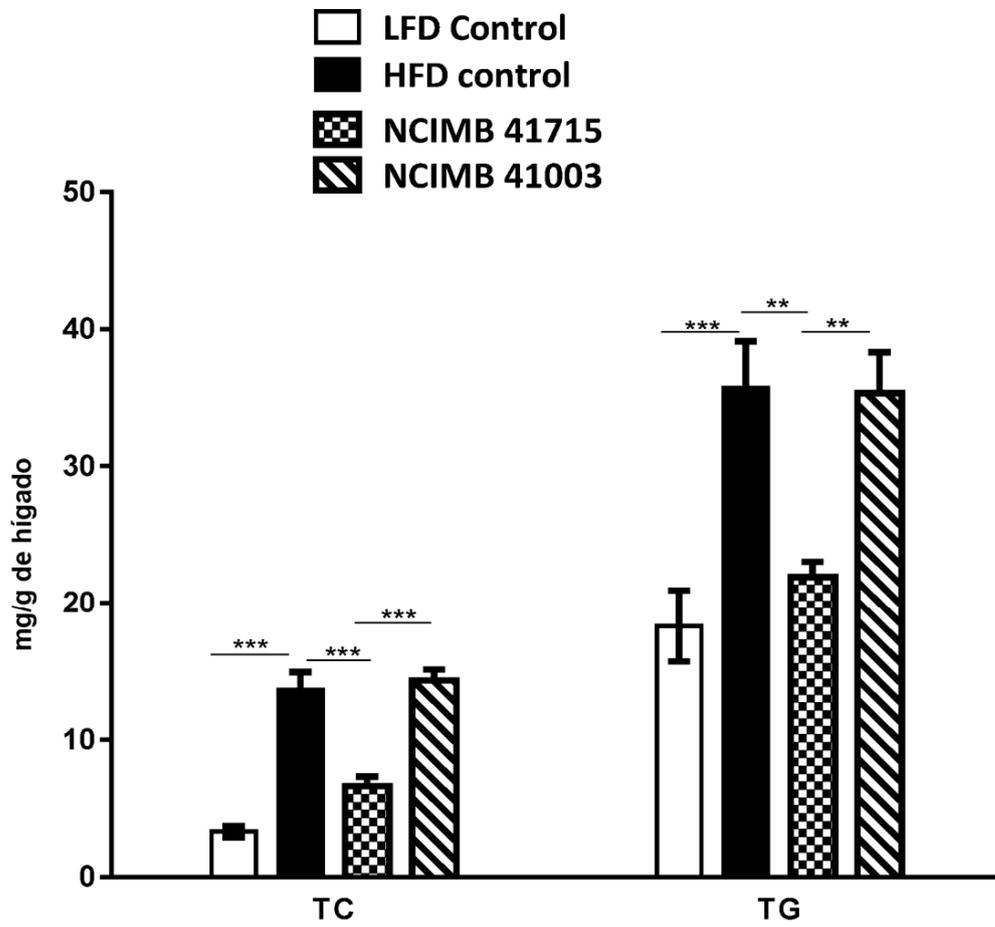


1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)

2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)

*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

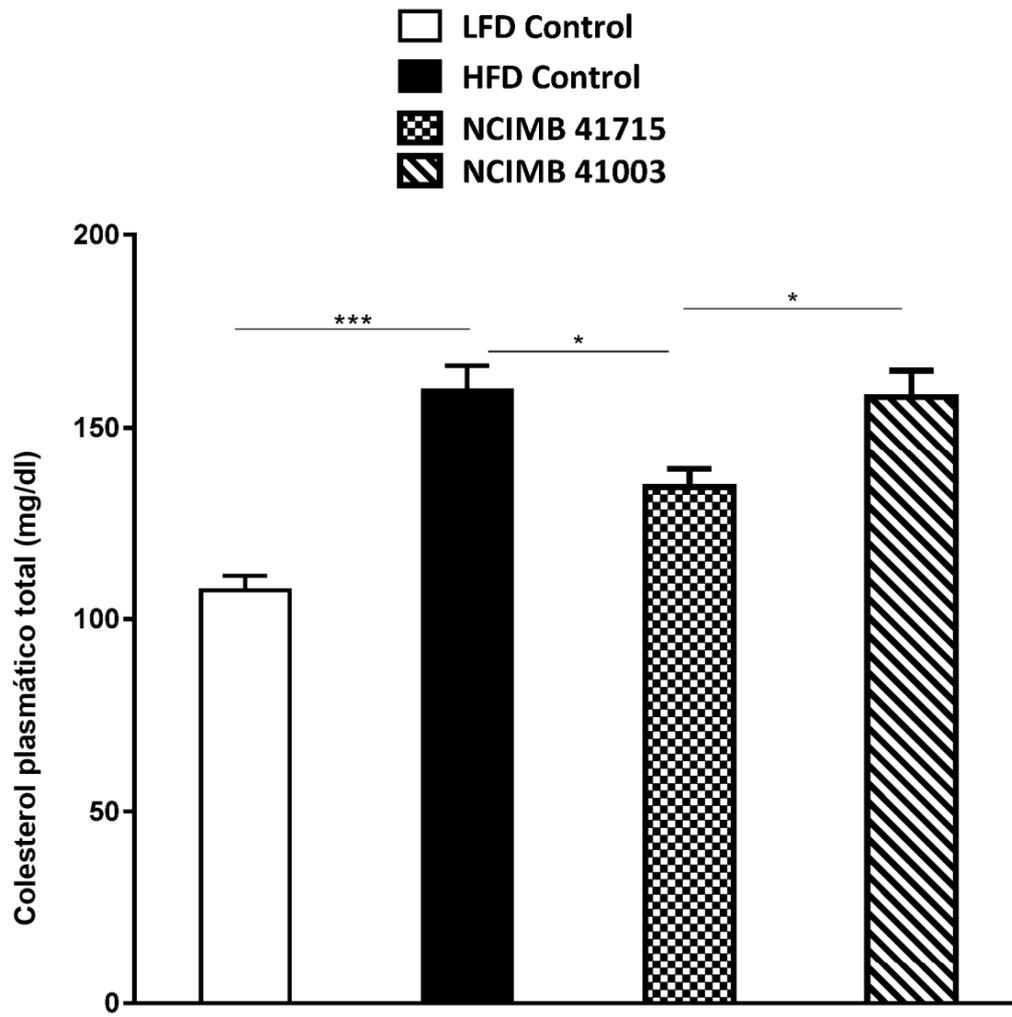
Fig. 8



- 1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)

*** p<0,001. ** p<0,01, * p<0,05

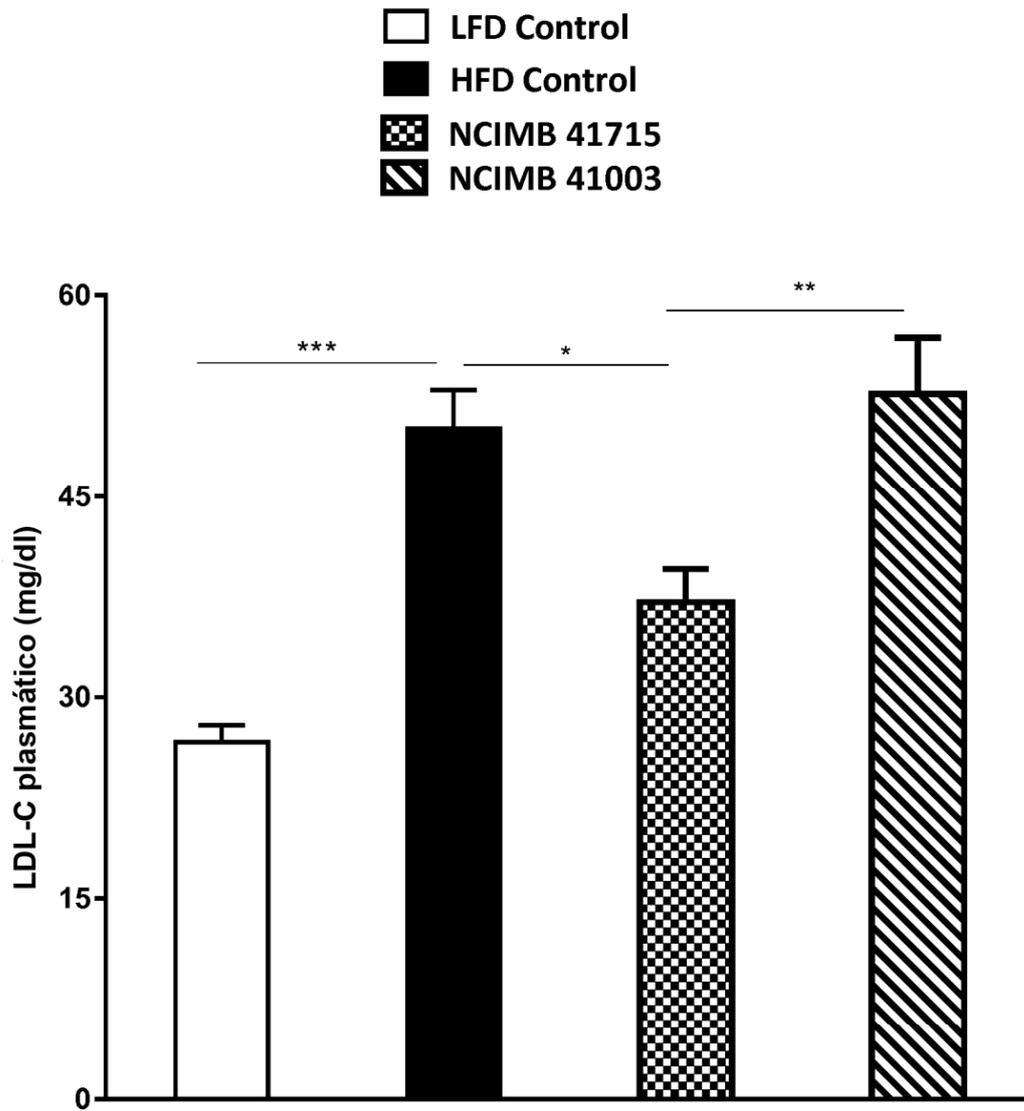
Fig. 9



- 1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)

*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

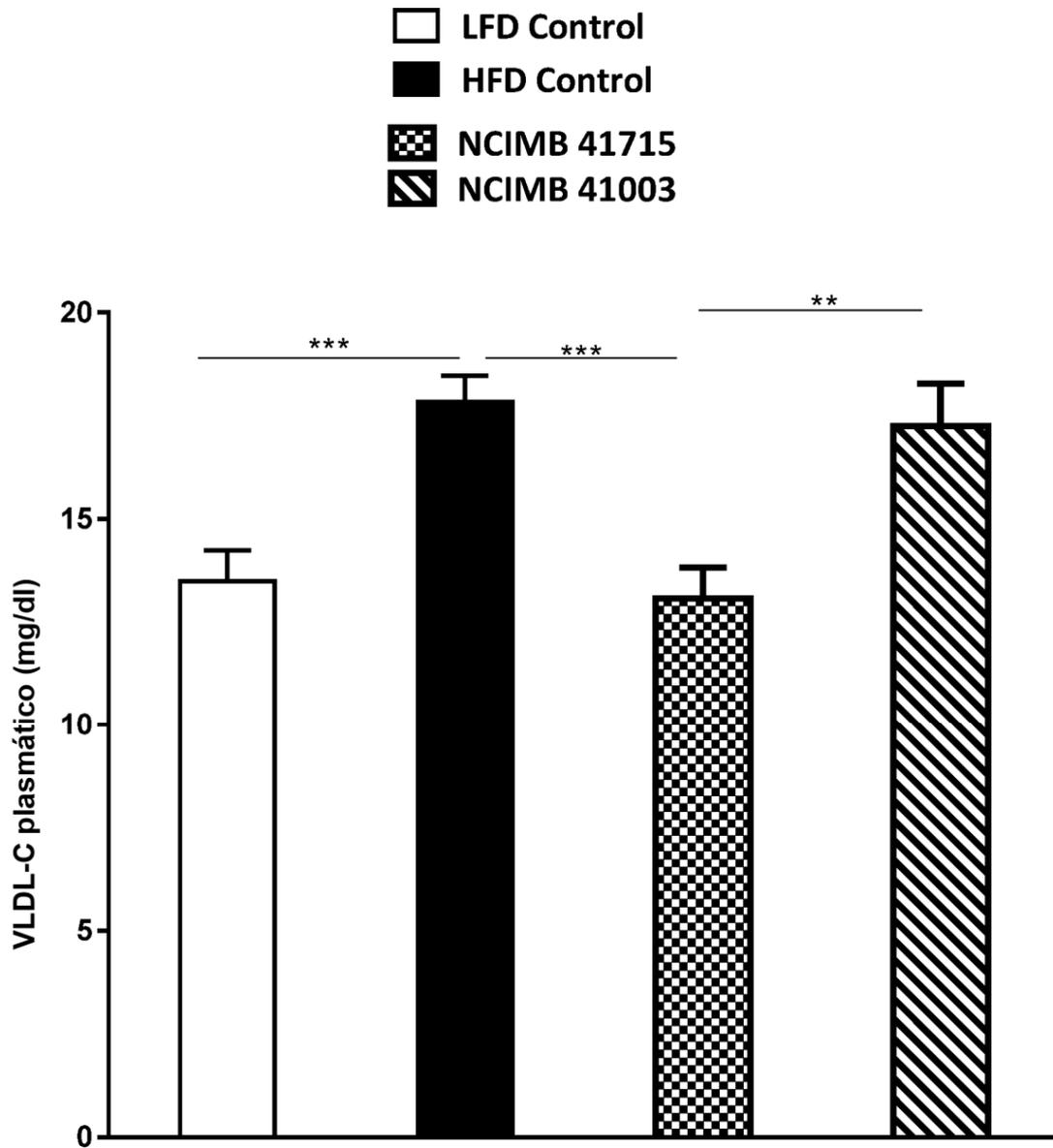
Fig. 10



- 1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)

*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

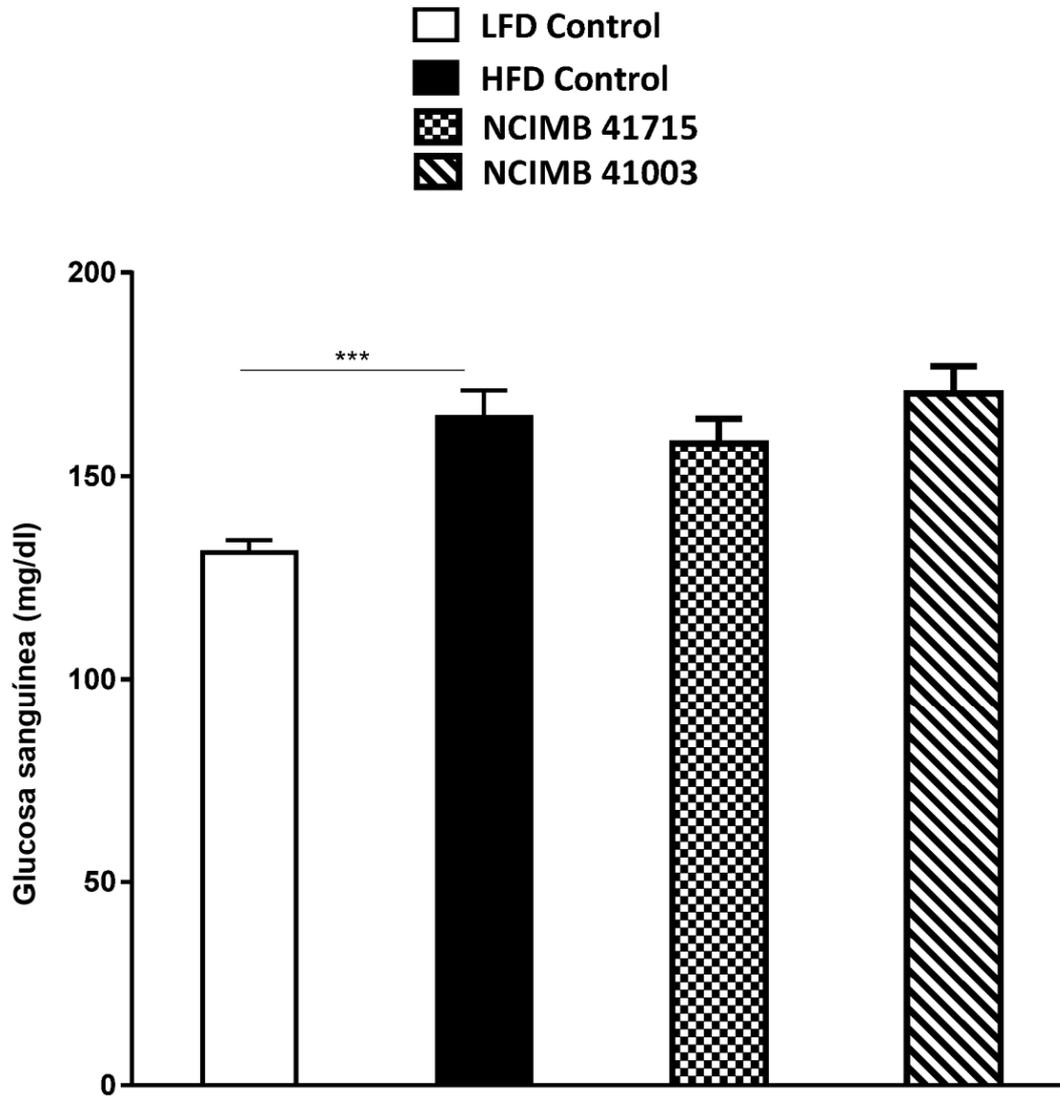
Fig. 11



- 1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)

*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

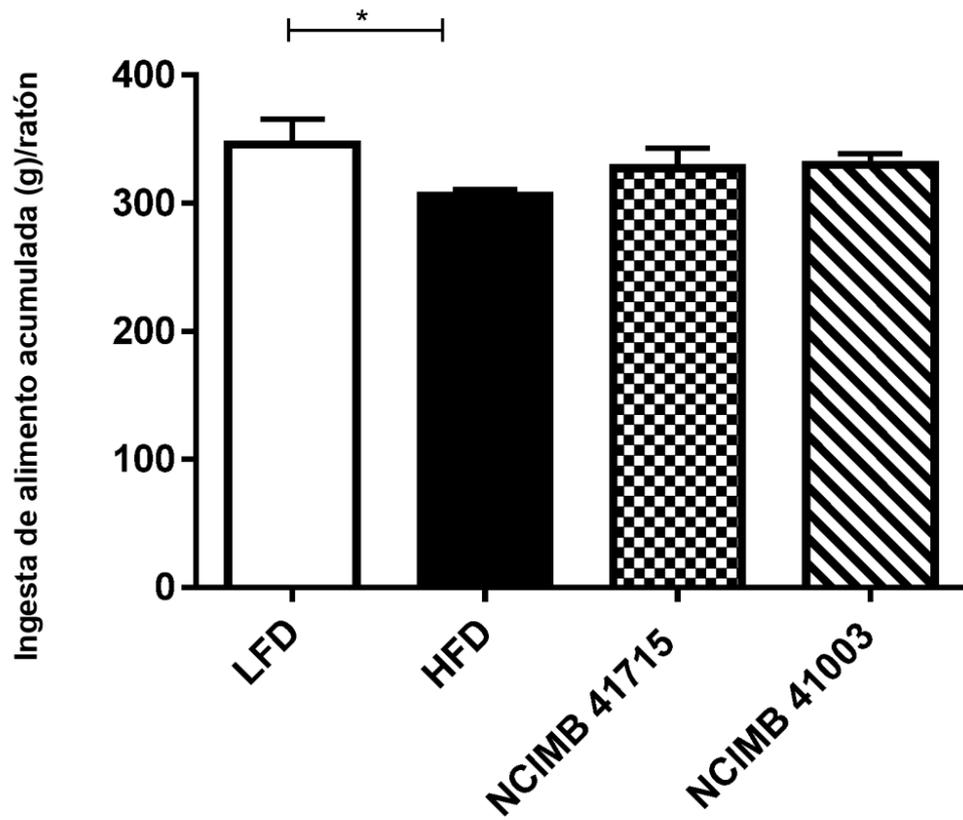
Fig. 12



- 1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)
- 2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)

*** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Fig. 13



- 1) Prueba t de Student desapareada (Magro frente a DIO)
 - 2) ANOVA de una vía seguido del test de Tukey de comparaciones múltiples (DIO frente a todas las cepas)
- *** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Fig. 14

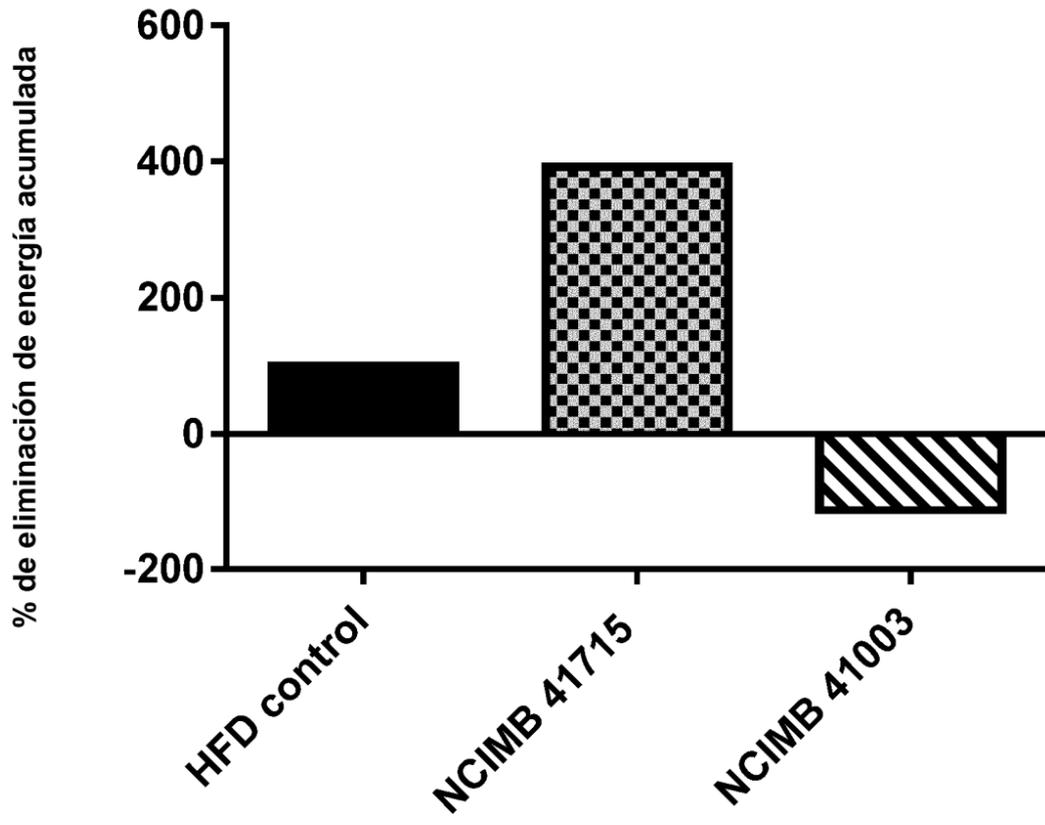


Fig. 15