

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 338**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/01 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2017** **PCT/EP2017/051306**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017** **WO17129515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2017** **E 17702322 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2020** **EP 3407902**

54 Título: **Cepa de Faecasilbacterium Prausnitzii CNM I-4573 para el tratamiento y la prevención de una inflamación gastrointestinal**

30 Prioridad:

25.01.2016 FR 1650567

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2021

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (33.3%)
147, rue de l'Université
75007 Paris, FR;
SORBONNE UNIVERSITÉ (33.3%) y
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**LANGELLA, PHILIPPE;
MARTIN ROSIQUE, REBECA;
BERMUDEZ HUMARAN, LUIS;
CHAIN, FLORIAN y
SOKOL, HARRY**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 820 338 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa de *Faecalibacterium Prausnitzii* CNCM I-4573 para el tratamiento y la prevención de una inflamación gastrointestinal

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una cepa de *Faecalibacterium Prausnitzii* para su uso en el tratamiento y la prevención de enfermedades gastrointestinales inflamatorias (IBD) en un individuo, en particular de afecciones intestinales inflamatorias (IBD).

Técnica anterior

La inflamación es un proceso biológico natural, que constituye una parte normal de la respuesta a lesiones o infecciones y contribuye a la protección del organismo contra las agresiones internas o externas.

Sin embargo, una disfunción de los mecanismos de la inflamación, en particular una inflamación persistente o demasiado abundante, puede causar enfermedades dolorosas y poner en peligro la vida del paciente. Tales enfermedades comprenden, por ejemplo, unos trastornos cutáneos, unos trastornos intestinales, unos trastornos neurológicos, la artritis y las enfermedades autoinmunes. Varias de estas enfermedades inflamatorias siguen sin tratamiento o sin tratamiento adecuado.

En consecuencia, el estudio y la investigación de nuevas estrategias de tratamiento antiinflamatorio constituyen un tema principal en medicina y en investigación biomédica.

Una afección intestinal inflamatoria es un grupo de trastornos caracterizados por una inflamación crónica y recurrente del tracto gastrointestinal. La forma más habitual de este grupo es la enfermedad de Crohn. La patogénesis utiliza una activación inapropiada y continua del sistema inmunitario mucoso provocada por la presencia de la flora intestinal en un paciente genéticamente predispuesto.

Existe una necesidad constante de nuevas sustancias, en particular de probióticos, o de composiciones para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades gastrointestinales inflamatorias, en particular de las afecciones intestinales inflamatorias, en un individuo.

Resumen de la invención

El objetivo de la presente invención es describir nuevas sustancias, en particular probióticos, y composiciones para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades gastrointestinales inflamatorias en un individuo, en particular unas afecciones intestinales inflamatorias en un individuo.

En el contexto de la presente invención, el término “prevenir” designa la reducción a un grado menor del riesgo o de la probabilidad de aparición de un fenómeno dado, es decir, en la presente invención, una inflamación gastrointestinal, en particular una inflamación intestinal.

La presente invención se basa en el descubrimiento por los presentes inventores de las propiedades antiinflamatorias de la cepa de *Faecalibacterium Prausnitzii* depositada en la CNCM bajo el número de acceso CNCM I-4573.

Según los resultados experimentales de los inventores, una cepa específica de *Faecalibacterium Prausnitzii* (*F. prausnitzii*) depositada en la CNCM el 21 de enero de 2012 bajo el número de acceso CNCM I-4573 posee la capacidad inesperada de reducir *in vitro* e *in vivo* una inflamación gastrointestinal, en particular una inflamación intestinal, en un individuo. Como se ilustra en los ejemplos y se describe a continuación, los inventores han demostrado que, por el contrario, la cepa de *F. prausnitzii* I-4575 no posee tales propiedades ventajosas.

La cepa según la invención es más particularmente capaz de reducir la producción de moléculas proinflamatorias, tales como la interleucina 8 (IL-8), la interleucina 2 (IL-2), la interleucina 4 (IL-4), la interleucina 6 (IL-6) y el interferón gamma (INF γ), y aumentar la producción de moléculas antiinflamatorias, tales como la interleucina 10 (IL-10).

Según un primer objeto, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana de la especie *Faecalibacterium Prausnitzii* depositada en la CNCM bajo el número de acceso CNCM I-4573, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad gastrointestinal inflamatoria en un individuo, en particular de una afección intestinal inflamatoria en un individuo, más particularmente de una afección intestinal inflamatoria cólica en un individuo.

Esta cepa identificada por los inventores es por lo tanto una cepa probiótica que se puede utilizar para las aplicaciones indicadas anteriormente.

Un individuo según la invención es preferentemente un mamífero, incluyendo un mamífero no humano, y es, en particular, un humano.

La enfermedad gastrointestinal inflamatoria es, en particular, una afección intestinal inflamatoria (IBD), más particularmente una afección intestinal inflamatoria cólica.

Dicha afección intestinal inflamatoria cólica puede, en particular, seleccionarse del grupo constituido por la enfermedad de Crohn, la rectocolitis hemorrágica y la reservoritis, en particular la enfermedad de Crohn y la rectocolitis hemorrágica.

Según otro modo de realización, la cepa bacteriana para su uso según la invención está comprendida en una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable, preferentemente en una composición oral, y de manera más particularmente preferida en un suplemento alimenticio.

La expresión "medio fisiológicamente aceptable" se destina a designar un medio que es compatible con el organismo del individuo al cual debe administrarse dicha composición. Puede tratarse, por ejemplo, de un disolvente no tóxico tal como el agua. En particular, dicho medio es compatible con una administración oral.

Una composición de la invención es preferentemente por vía oral.

Una composición de la invención para la vía oral se puede seleccionar del grupo constituido de un producto alimenticio, una bebida, un producto farmacéutico, un nutracéutico, un aditivo alimenticio, un suplemento alimenticio y un producto lácteo y está, en particular, en forma de un suplemento alimenticio.

Leyendas de las figuras

La figura 1 ilustra la concentración de interleucina 8 (IL-8) (en pg de IL-8/mg de proteínas) en unas células Ht-29 estimuladas por TNF α : (a) únicamente en un medio YBHI (control); (b) tratadas con la cepa A2-165 de *F. prausnitzii*; (c) tratadas con la cepa I-4573 de *F. prausnitzii* según la invención; o (d) tratadas con la cepa I-4575 de *F. prausnitzii*. Los ensayos se llevan a cabo por triplicada. Los resultados se normalizan utilizando, como valor de referencia, IL-8 producida por la coinducción con PBS como control negativo. *p<0,05.

La figura 2 ilustra la concentración de interleucina 10 (IL-10) (en pg de IL-10/ml de proteínas) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC): (a) únicamente en un medio YBHI (control); (b) tratadas con la cepa A2-165 de *F. prausnitzii*; (c) tratadas con la cepa I-4573 de *F. prausnitzii* según la invención; o (d) tratadas con la cepa I-4575 de *F. prausnitzii*. Los ensayos se efectúan por triplicado. ***p<0,001.

La figura 3 ilustra el protocolo experimental para el modelo de colitis crónica en el ratón (DNBS).

La figura 4 ilustra los resultados macroscópicos del colon y del intestino delgado (a) de ratones control (sin colitis) que reciben únicamente EtOH; (b) de ratones control que presentan una colitis DNBS y tratados con PBS; (c) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa A2-165 de *F. prausnitzii*; (d) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa I-4573 de *F. prausnitzii*; y (e) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa I-4575 de *F. prausnitzii*. Los criterios macroscópicos (evaluados en una escala de 0 (sin daño) a 9) comprenden los daños macroscópicos de las mucosas (tales como úlceras, un engrosamiento de la pared del colon, la presencia de adherencias entre el colon y otros órganos intraabdominales), la consistencia de las materias fecales (como indicador de diarrea) y la presencia de hiperemia. n=8. **p<0,01.

La figura 5 ilustra la actividad mieloperoxidasa (MPO) (U/mg) en el colon distal (a) de ratones control (sin colitis) que reciben únicamente EtOH; (b) de ratones control que presentan una colitis DNBS y tratados con PBS; (c) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa A2-165 de *F. prausnitzii*; (d) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa I-4573 de *F. prausnitzii*; y (e) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa I-4575 de *F. prausnitzii*. n=8. *p<0,05.

La figura 6 ilustra las concentraciones de citoquinas cólicas ((figura 6A) IL-2, (figura 6B) IL-4 (figura 6C) IL-6 y (figura 6D) IFN γ) (en pg/ml) (a) de ratones control (sin colitis) que reciben únicamente EtOH; (b) de ratones control que presentan una colitis DNBS y tratados con PBS; (c) de ratones que presentan colitis DNBS y tratados con la cepa A2-165 de *F. prausnitzii*; (d) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa I-4573 de *F. prausnitzii*; y (e) de ratones que presentan una colitis DNBS y tratados con la cepa I-4575 de *F. prausnitzii*.

Descripción detallada de la invención

Los presentes inventores han llevado a cabo unos trabajos extensos a fin de identificar la capacidad de una cepa específica de *Faecalibacterium prausnitzii* a tratar y/o prevenir unas enfermedades gastrointestinales inflamatorias en un individuo, en particular unas afecciones intestinales inflamatorias en un individuo.

En efecto, los inventores han determinado de manera inesperada que la cepa de *F. prausnitzii* I-4573 posee la capacidad de reducir una inflamación gastrointestinal, en particular una inflamación intestinal en un individuo.

Actualmente se describe que la cepa bacteriana de la invención puede, en particular, reducir la concentración de moléculas proinflamatorias, tales como la interleucina 8 (IL-8), la interleucina 2 (IL-2), la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 6 (IL-6).

Se demuestra también actualmente que la cepa bacteriana de la invención es, en particular, capaz de aumentar la concentración de moléculas antiinflamatorias, tales como la interleucina 10 (IL-10).

Cepa de *Faecalibacterium prausnitzii* de la invención

F. prausnitzii es un miembro importante del filo Firmicutes y pertenece a las bacterias comensales más abundantes en la flora intestinal del intestino grueso sano humano.

F. prausnitzii es una bacteria extremadamente sensible al oxígeno (EOS) y es, por lo tanto, difícil de cultivar, incluso en condiciones anaeróbicas (Duncan *et al.* 2002, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52(Pt 6): 2141-6 y Lopez-Siles *et al.* Appl. Environ Microbiol. Enero de 2012; 78 (2):420-8). *F. prausnitzii* se conoce, en particular, como una de las bacterias productoras de butirato más abundantes en el tracto digestivo humano, siendo el butirato de ácido graso de cadena corta muy importante en la fisiología del intestino, de las funciones sistémicas y de los efectos beneficiosos para la salud humana (Macfarlane y Macfarlane (2011), J. Clin. Gastroenterol. 45 Suppl: S120-7).

La cepa de *F. prausnitzii* A2-165 se conoce también por tener efectos antiinflamatorios y protectores en modelos murinos de colitis aguda y crónica, es decir en trastornos inflamatorios (Martin *et al.*, Inflamm Bowel Dis. Mars 2014; 20(3):417-30 y Sokol *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 28 de octubre de 2008; 105(43): 16731-6).

Las propiedades antiinflamatorias de la cepa A2-165 no pueden atribuirse, generalmente, a la especie *F. prausnitzii*, puesto que la existencia de propiedades antiinflamatorias es imprevisible para una cepa dada de *F. prausnitzii*. En efecto, tal actividad antiinflamatoria específica se ilustra en los ejemplos, en los que se ha llevado a cabo un ensayo comparativo con una cepa de *F. prausnitzii* que no pertenece a la invención, a saber la cepa CNCM I-4575, que no posee la actividad antiinflamatoria de la cepa de la invención.

Una dosis diaria adecuada de una cepa bacteria según la invención es de 10^7 a 10^{11} unidades que forman unas colonias (ufc) como medicamento, por ejemplo bajo la forma de una dosis diaria equivalente a 10^9 ufc.

Una cepa de *Faecalibacterium prausnitzii* de la invención es para su uso el tratamiento y/o la prevención de una inflamación gastrointestinal en un individuo, en particular una inflamación del intestino en un individuo.

La cepa de la invención es un probiótico cuya actividad se sitúa en el intestino. Una bacteria probiótica según la invención designa una bacteria que, cuando se ingiere viva en cantidades suficientes, puede ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana.

En consecuencia, esta cepa debe administrarse viva en el intestino.

La cepa bacteriana de la invención se puede administrar en el intestino de un individuo a tratar de diferentes maneras, a saber por vía oral o rectal. Una bacteria según la invención se administra, preferentemente, por vía oral.

Según un modo de realización preferido, la cepa bacteriana de la invención está comprendida en una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable. Tal composición es, preferentemente, para la vía oral, y en particular en forma de suplemento alimenticio.

Composiciones

La presente invención se refiere además a una composición que comprende, en un medio fisiológicamente aceptable, al menos la cepa bacteriana de *Faecalibacterium prausnitzii* I-4573 de la invención.

Se proporciona una composición según la invención para el tracto digestivo, en particular el intestino.

Por consiguiente, una composición según la invención se selecciona entre una composición oral o rectal. Una composición de la invención es, preferentemente, una composición oral o rectal, más preferiblemente una composición oral.

Según un modo de realización, una composición de la invención es una composición oral, es decir que está prevista para una administración oral a un sujeto.

Tal composición puede estar en forma de una suspensión, un comprimido, una píldora, una cápsula, un granulado o un polvo.

- 5 La composición según la invención para la vía oral se puede seleccionar del grupo constituido de un producto alimenticio, una bebida, un producto farmacéutico, un nutracéutico, un aditivo alimenticio, un suplemento alimenticio o un producto lácteo, y es, en particular, un suplemento alimenticio.

Según un modo de realización preferido, una composición según la invención es un suplemento alimenticio.

- 10 Un suplemento alimenticio para una administración oral puede estar presente en unas cápsulas, unas cápsulas duras, unas cápsulas blandas, unos comprimidos, unas grageas, unas píldoras, unas pastas, unas pastillas, unas gomas, unas soluciones o emulsiones bebibles, un jarabe o un gel.

- 15 Ventajosamente, una composición según la invención, prevista para una administración oral, puede estar provista de un recubrimiento que resiste al jugo gástrico, a fin de asegurar que la cepa bacteriana de la invención comprendida en dicha composición pueda atravesar el estómago dañado. La liberación de cepa bacteriana puede así producirse por primera vez en el tracto intestinal superior.

- 20 Un suplemento alimenticio según la invención puede comprender además un edulcorante, un estabilizante, un antioxidante, un aditivo, un agente aromatizante, y/o un colorante.

- 25 La formulación de este se efectúa mediante unos procedimientos habituales para producir unas grageas, unas cápsulas, unos geles, unos hidrogeles para liberación controlada, unas emulsiones, unos comprimidos o unas cápsulas.

Una composición según la invención puede estar también en forma de composición nutricional.

- 30 Una composición nutricional según la invención está en forma de yogur, barra de cereal, cereales para el desayuno, postre, alimento congelado, sopa, alimento para animales de compañía, suspensión líquida, polvo, comprimido, goma o caramelo.

En otro modo de realización de la invención, una composición que contiene la cepa bacteriana de la invención se administra por vía intrarrectal.

- 35 Preferentemente, una administración rectal se lleva a cabo en forma de un supositorio, una lavativa o una espuma.

- 40 En particular, una composición de la invención es adecuada para la administración de una dosis diaria que representa de 10^7 a 10^{11} unidades que forman unas colonias (ufc) como medicamento, preferentemente una dosis diaria equivalente a 10^9 ufc.

Por ejemplo, una composición según la invención se puede administrar a un individuo que lo necesita a una dosis diaria única de 1 g que contiene la cepa bacteriana I-4573 de la invención en una cantidad equivalente a una dosis comprendida entre 10^7 y 10^{11} ufc, preferentemente 10^9 ufc.

- 45 En otro ejemplo, una composición según la invención se puede administrar a un individuo que lo necesita a una dosis diaria única de 0,2 g que contiene la cepa bacteriana I-4573 de la invención en una cantidad equivalente a una cantidad comprendida entre 10^7 y 10^{11} ufc, preferentemente 10^9 ufc.

- 50 En otro ejemplo, una composición según la invención se puede administrar a un individuo que lo necesita dos veces por día en base a dos dosis de 1 g, conteniendo cada dosis, independientemente, la cepa bacteriana I-4573 de la invención en una cantidad equivalente a una cantidad comprendida entre $5 \cdot 10^6$ y $5 \cdot 10^{10}$ ufc (en base al peso seco), preferentemente $5 \cdot 10^8$ ufc, de manera que la dosis diaria total de cepa bacteriana I-4573 de la invención administrada al individuo sea tal como se indicó anteriormente.

- 55 Una composición según la invención puede comprender además al menos uno de entre: unos antioxidantes, unos aceites de pescado, DHA, EPA, unas vitaminas, unos minerales, unos fitonutrientes, una proteína, un lípido, unos probióticos y combinaciones de estos.

- 60 La invención se describe a continuación de manera más detallada mediante unos ejemplos siguientes, que se presentan únicamente a título de ilustración.

Todas las referencias a porcentajes son porcentajes en peso, salvo que se indique lo contrario.

Ejemplos

La cepa de *F. prausnitzii* según la invención, depositada en la CNCM bajo el número de acceso CNCM I-4573 se ha ensayado y comparado con dos otras cepas de *F. prausnitzii*, A2-165 y CNCM I-4575, por su capacidad de modular *in vitro* e *in vivo* la respuesta inmunitaria y tener un impacto directo sobre la inflamación intestinal.

En los ensayos *in vitro*, se utilizan dos modelos celulares diferentes: HT-29 y PBMC.

En los ensayos *in vivo*, se utiliza un modelo de colitis murina.

Ensayos *in vitro*

I. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Los aislados de las cepas de *F. prausnitzii* ensayadas se cultivan en un medio YBHI (medio de perfusión cerebro-corazón suplementado con un 0,5% de extracto de levadura) (Difco, Detroit, Estados Unidos) suplementado con 1 mg/ml de celobiosa (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Suiza), 1 mg/ml de maltosa (Sigma-Aldrich) y 0,5 mg/ml de cisteína (Sigma-Aldrich) a 37°C en una cámara anaeróbica llena de N₂=85%, CO₂=10% y H₂=5%.

Las cepas se aíslan a partir de pacientes sanos:

- cepas CNCM-I4573 y CNCM-I4575 de un hombre de 40 años de edad; y

- cepa A2-165 (DSMZ 17677) de una mujer de 34 años de edad de Duncan SH *et al.* IJSEM, 2002, 52(Pt 6):2141-2146.

II. Propiedades inmunomoduladoras por medio de células HT-29

A. Cultivo de células

La línea celular HT-29 (ATCC HTB-38) (LGC-Standards) se cultiva en un medio esencial mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich) suplementado con un 10% (m/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor (GibcoBRL, Eragny, Francia) y con penicilina G/ estreptomicina (5 000 UI/ml, 5 000 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Los cultivos se incuban en frascos de cultivo de tejido de 25 cm² (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a 37°C en una atmósfera al 5% (v/v) CO₂ hasta confluencia.

B. Ensayos antiinflamatorios

Se llevan a cabo unos ensayos antiinflamatorios que utilizan HT-29 según el procedimiento descrito por Kechaou *et al.* (Applied and environmental microbiology 2012, 79(5):1491-1499).

Brevemente, se siembran 50 000 células HT-29 por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos (Nunc). Veinticuatro horas antes de la estimulación bacteriana, el medio de cultivo se sustituye por un medio con FBS al 5%.

Los ensayos empiezan en el día 7 después de la siembra, cuando las células están en confluencia (1,83X10⁶ células/pocillo). Veinticuatro horas antes del cocultivo bacteriano (día 6), el medio de cultivo se sustituye por un medio con un 5% de FBS inactivado por calor y un 1% de glutamina.

El día del cocultivo, se añade un 10% del sobrenadante bacteriano en DMEM en un volumen total de 500 µl. Las células se estimulan simultáneamente con TNF-α humano (5 ng/ml; Peprotech, NJ) durante 6h a 37°C en un 10% de CO₂.

Todas las muestras se analizan por triplicado.

Después de la coincubación, los sobrenadantes de células se recogen y se conservan a -80°C hasta el análisis posterior de las concentraciones de interleucina 8 (IL-8) por ELISA (Biolegend, San Diego, CA).

Las proteínas totales se determinan mediante la prueba del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich). Los ensayos se llevan a cabo al menos por triplicado.

Los resultados se expresan en IL-8/proteína (pg/mg) y se normalizan utilizando, como valor de referencia, IL-8 producido después de la coincubación con PBS como control negativo.

C. Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectúa mediante el programa GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos). Todos los datos se expresan en forma de promedio $\pm$ SEM.

Las comparaciones se realizan con el ensayo de Kruskal-Wallis no paramétrico seguido por un ensayo de comparación múltiple de Dunn.

Las pruebas de correlación se efectúan mediante la prueba de Spearman.

Un valor p inferior a 0,05 se considera como significativo.

D. Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 1.

Se puede observar, a partir de estos ensayos, que la cepa CNCM I-4573 es capaz de reducir significativamente la producción de citoquina proinflamatoria IL-8 inducida por la estimulación de TNF- α en unas células epiteliales HT-29.

Como previsto, la cepa de *F. prausnitzii* A2-165 produce también tal reducción de la producción de IL-8.

Por el contrario, la cepa de *F. prausnitzii* I-4575 no induce a una disminución estadísticamente significativa de IL-8.

III. Propiedades inmunomoduladoras por medio de PBMC

A. Cultivo de células

Se utilizan unos PBMC comerciales (StemCell Technologies, Francia) de cinco donantes sanos.

Los donantes presentan las características siguientes: hombre de menos de 65 años, índice de masa corporal < 30 , no fumador, sin medicamentos que tengan efectos antiinflamatorios conocidos tomados durante los 15 días anteriores a la selección, y prueba negativa para los virus VIH, hepatitis A y hepatitis B.

Después de la recepción, las células se conservan en nitrógeno líquido hasta su uso.

B. Ensayos antiinflamatorios

Con el fin de preparar unos PBMC para unos ensayos de cocultivo con unas bacterias *F. prausnitzii*, los frascos se descongelan a 37°C en un baño maría y después se transfieren en un medio que contiene un medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de FCS inactivado por calor, un 1% de L-glutamina y un 0,1% de penicilina/estreptavidina (los componentes del medio se compran a Lonza, Suiza). Se añade DNasa (100 μ g/ml, Roche Applied Science, Francia) a la mezcla a fin de evitar la aglomeración de las células.

Las células se centrifugan después a 200 g durante 15 minutos, se cuentan utilizando azul de tripano y se esparcen en placas de 24 pocillos a 1×10^6 células/pocillo. Se añaden por triplicado unos sobrenadantes (tres pocillos por donante) al 10% en un volumen total de 1 ml. Las placas se incuban durante 24h a 37°C con 10% de CO₂.

Los sobrenadantes de cultivo se recogen, se mezclan con un cóctel de antiproteasas conforme a las instrucciones del fabricante (EDTA-inhibidor de proteasa completo, Roche Applied Bioscience) y se conservan a -80°C hasta el análisis posterior de las concentraciones de interleucina 10 (IL-10) por ELISA (Mabtech, Suecia).

C. Análisis estadístico

El análisis estadístico se efectúa mediante el programa GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos). Todos los datos se expresan en forma de media $\pm$ SEM.

Las comparaciones se realizan con la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica seguida de un ensayo de comparación múltiple de Dunn.

Las pruebas de correlación se efectúan mediante la prueba de Spearman.

Un valor p inferior a 0,05 se considera como significativo.

D. Resultados

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 2.

Estos ensayos demuestran que la cepa CNCM I-4573 es capaz de aumentar significativamente la producción de citoquina antiinflamatoria IL-10 en PBMC.

5 Como era de esperar, la cepa de *F. prausnitzii* A2-165 produce también tal aumento de la producción de IL-10.

Por el contrario, la cepa de *F. prausnitzii* I-4575 no induce un aumento estadísticamente significativo de IL-10.

Ensayo in vivo

10

A. Inducción de colitis DNBS y administración de bacterias

El protocolo de colitis inducida por DNBS es como se describió anteriormente (Martin R, *et al.* Inflamm Bowel Dis. Mars 2014; 20(3):417-30).

15

Brevemente, los ratones se anestesian con enflurano (Abbott, Abbott Park, IL) y se fija un segmento de 10 cm de longitud de tubo PE-90 (ClayAdam, Parsippany, NJ) a una jeringa de tuberculina y se inserta a 3,5 cm en el colon.

20

La colitis se induce por inyección intrarrectal (i.r.) por medio de este tubo de 200 mg/kg de solución de ácido DiNitroBenceno-sulfónico (DNBS) (ICN, Biomedical Inc.) en etanol al 30% (EtOH).

Los ratones control (sin colitis) reciben únicamente EtOH.

25

Los ratones se alimentan con un 6% de sacarosa en agua de bebida durante los 3 primeros días después de la inyección de DNBS para prevenir la deshidratación (periodo DNBS). 10 días después del periodo de DNBS, se administran 200 µl que contienen 1X10⁹ UFC de una de las cepas bacterianas por vía intragástrica, todos los días durante 10 días (periodo de alimentación forzada) (véase la figura 3).

30

Los grupos de estudio son de la siguiente manera: grupo control sin colitis (EtOH + PBS), grupo control con colitis (DNBS + PBS), grupo de cepas de *F. prausnitzii* A2-165 (DNBS + A2-165), *F. prausnitzii* CNCM-I4573 (DNBS + CNCM-I4573) y *F. prausnitzii* CNCM-I4575 (DNBS + CNCM-I4575).

35

La colitis se reactiva 21 días después de la primera inyección de DNBS (periodo de recuperación) con una segunda inyección de 100 mg/kg de solución de DNBS.

La gravedad de la colitis se determina después vigilando la pérdida de peso (resultados no representados) durante los 3 días después de la segunda inyección.

40

B. Resultados macroscópicos

Los ratones se sacrifican por dislocación cervical y se abre la cavidad abdominal. Se extraen el colon y el intestino delgado y se abren longitudinalmente, se evalúan inmediatamente los daños macroscópicos.

45

Los resultados macroscópicos se registran mediante un sistema anteriormente descrito para la colitis por DNBS.

Brevemente, los criterios macroscópicos (evaluados en una escala de 0 a 9) comprenden los daños macroscópicos de las mucosas (tales como úlceras, engrosamiento de la pared del colon, presencia de adherencias entre el colon y otros órganos intraabdominales), la consistencia de las materias fecales (como indicador de diarrea) y la presencia de hiperemia.

50

Los resultados obtenidos se representan en la figura 4.

C. Actividad de mieloperoxidasa (MPO)

55

La actividad de la mieloperoxidasa (MPO), utilizada como marcador de infiltración neutrofílica, se determina mediante una versión modificada del procedimiento descrito por Bradley *et al.* (J. Invest. Dermatol. 1982, 78(3):206-209).

60

Se recupera una longitud de un centímetro de colon distal y se homogeneiza (50 mg/ml) en un tampón de fosfato de potasio 50 mM helado (pH 6) que contiene un 5% de bromuro de hexadeciltrimetilaminio (Sigma-Aldrich) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

La reacción colorimétrica se sigue midiendo la absorbencia con un espectrofotómetro.

Los resultados obtenidos se representan en la figura 5.

65

D. Análisis de citoquinas

Se recupera una longitud de un centímetro de colon distal y se homogeneiza en 400 µl de tampón Tris-HCl que contiene unos inhibidores de proteasa (Sigma-Aldrich) en un lisador de tejidos.

Las muestras se centrifugan durante 20 min y se congela el sobrenadante a -80°C hasta el análisis posterior.

Antes del sacrificio, se obtienen las muestras de sangre a partir del plexo venoso retroorbital y se centrifugan, y después se conservan los sueros a -80°C hasta el análisis.

Las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-4, IFN-γ, y IL-2) se analizan mediante un sistema de matriz de perlas citométricas (BD, NJ, Estados Unidos).

Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 6a (IL-2), 6b (IL-4), 6c (IFN-γ) y 6d (IL-6).

E. Análisis estadístico

Se utiliza el programa GraphPad (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estado Unidos) para el análisis estadístico.

Los resultados se presentan en forma de gráficos de barras +/- SEM.

Las comparaciones se realizan con la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica seguida de una prueba de comparación múltiple de Dunn. Los ensayos de correlación se efectúan mediante la prueba de Spearman.

Un valor p inferior a 0,05 se considera como significativo.

F. Resultados

1. Los resultados macroscópicos de la figura 4 muestran que se obtiene un resultado muy bueno en ratones DNBS tratados con la cepa I-4573, equivalente al obtenido en los ratones control que no presentan colitis.

Por el contrario, los resultados obtenidos con unos ratones DNBS tratados con la cepa A2-165 o con la cepa I-4575 son más altos en la escala de los criterios macroscópicos que los obtenidos con los ratones control que no presentan colitis y los ratones DNBS tratados con la cepa I-4573.

2. En lo que se refiere a las actividades de mieloperoxidasa medidas, las actividades obtenidas con los ratones DNBS tratados con la cepa I-4573 o con la cepa A2-165 son prácticamente similares a la actividad obtenida con los ratones control que no presentan colitis.

Por el contrario, la actividad con unos ratones DNBS tratados con la cepa I-4575 es similar a la actividad obtenida con unos ratones DBNS control tratados.

3. Finalmente, el perfil de citoquinas proinflamatorias obtenido con unos ratones DNBS tratados con la cepa I-4573 y de los ratones DNBS tratados con la cepa A2-165 demuestra claramente el efecto antiinflamatorio de estas dos cepas.

En realidad, en lo que se refiere, en particular, a los ratones DNBS tratados con la cepa I-4573, los niveles de expresión de IL-2 y IL-4 son similares a los obtenidos con unos ratones control que no presentan colitis. Los niveles de expresión de IFN-γ y IL-6 son más reducidos con respecto a los obtenidos con los ratones DNBS control no tratados.

Por el contrario, la cepa I-4575 no presenta ninguna propiedad anti-inflamatoria. Sus niveles de expresión de IL-2, IL-4, IL-6 y IFN-γ son similares, o incluso superiores, a los observados con los ratones DNBS control no tratados.

En consecuencia, se demuestra en los presentes ejemplos que la cepa de *F. prausnitzii* I-7573 presenta ventajosamente unas propiedades antiinflamatorias y que todas las cepas de *F. prausnitzii* no poseen tales propiedades, como se demuestra con la cepa I-4575.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa bacteriana de la especie *Faecalibacterium prausnitzii* depositada en la CNCM bajo el número de acceso CNCM I-4573, para su utilización en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad gastrointestinal inflamatoria en un individuo.
2. Cepa bacteriana para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que el individuo es un mamífero.
- 10 3. Cepa bacteriana para su utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizada por que el individuo es un humano.
4. Cepa bacteriana para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que la enfermedad gastrointestinal inflamatoria es una afección intestinal inflamatoria.
- 15 5. Cepa bacteriana para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la enfermedad gastrointestinal inflamatoria es una afección intestinal inflamatoria cólica.
6. Cepa bacteriana para su utilización según la reivindicación 5, caracterizada por que la afección intestinal inflamatoria cólica se selecciona del grupo constituido por la enfermedad de Crohn, la rectocolitis hemorrágica y la reservoritis.
- 20 7. Cepa bacteriana para su utilización según la reivindicación 5 o 6, caracterizada por que la afección intestinal inflamatoria cólica se selecciona del grupo constituido por la enfermedad de Crohn y la rectocolitis hemorrágica.
8. Cepa bacteriana para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la cepa bacteriana está comprendida en una composición que comprende un medio fisiológicamente aceptable.
- 25 9. Cepa bacteriana para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la cepa bacteriana está comprendida en una composición oral.
- 30 10. Cepa bacteriana para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la cepa bacteriana está comprendida en un suplemento alimenticio.
- 35 11. Cepa bacteriana para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, caracterizada por que la composición es adecuada para la administración de una dosis diaria que representa de 10^7 a 10^{11} unidades que forman colonias (ufc) como medicamento, preferentemente en forma de una dosis diaria equivalente a 10^9 ufc.
12. Cepa bacteriana para su utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizada por que la composición es para la vía oral, y se selecciona del grupo constituido de un producto alimenticio, una bebida, un producto farmacéutico, un nutracéutico, un aditivo alimenticio, un suplemento alimenticio y un producto lácteo.
- 40 13. Cepa bacteriana para su utilización según la reivindicación 12, caracterizada por que la composición es para la vía oral y es un suplemento alimenticio.

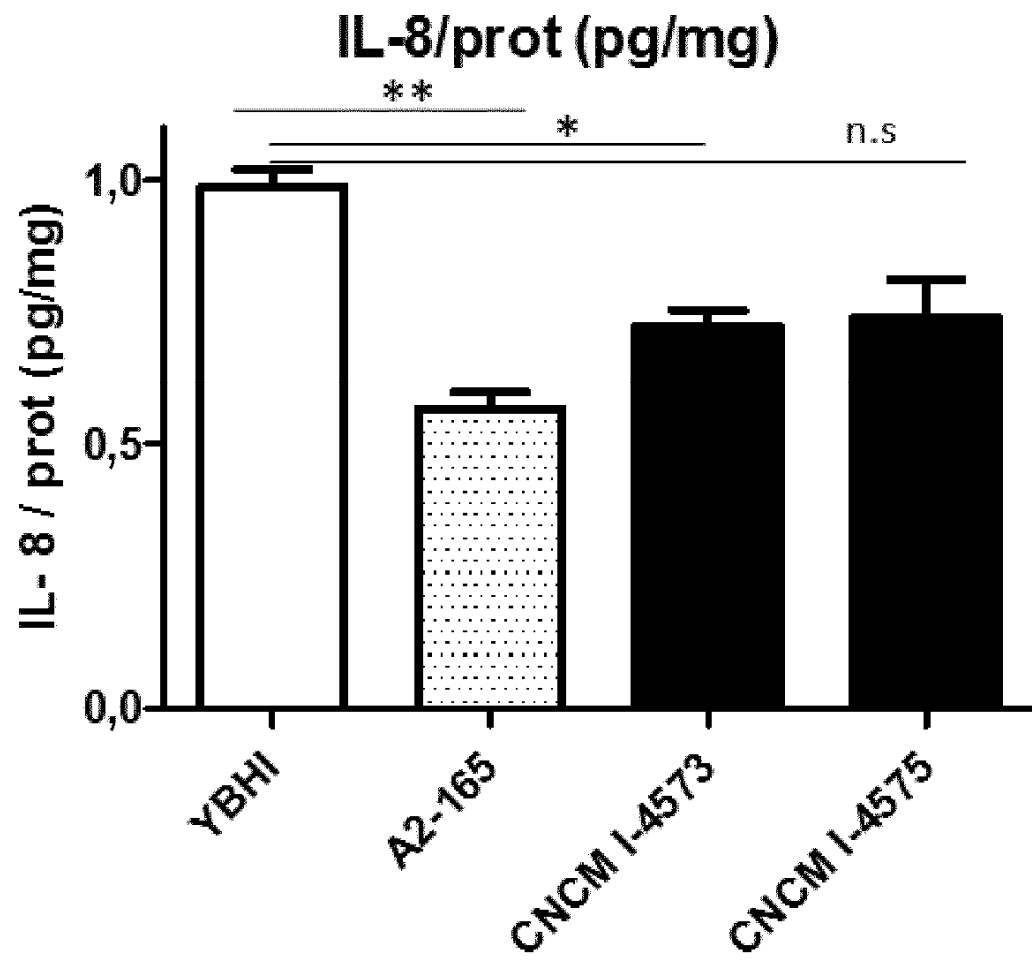


Figura 1

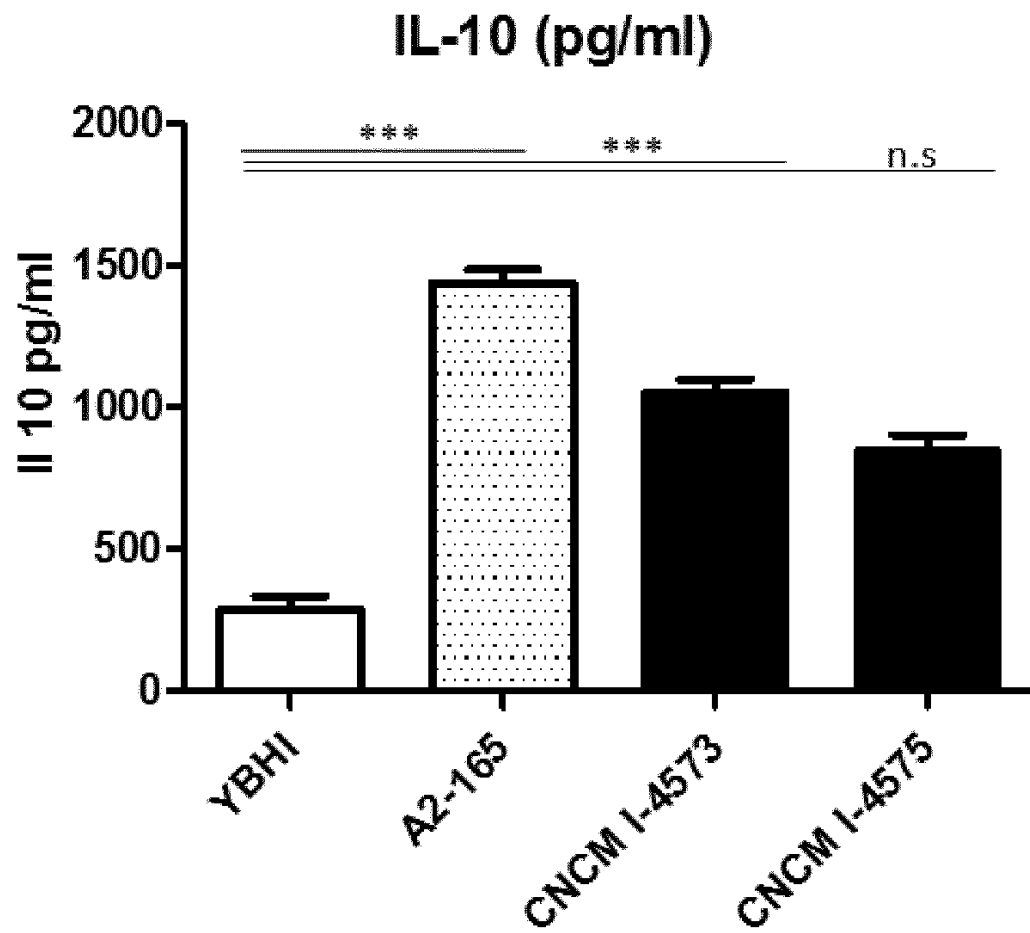


Figura 2

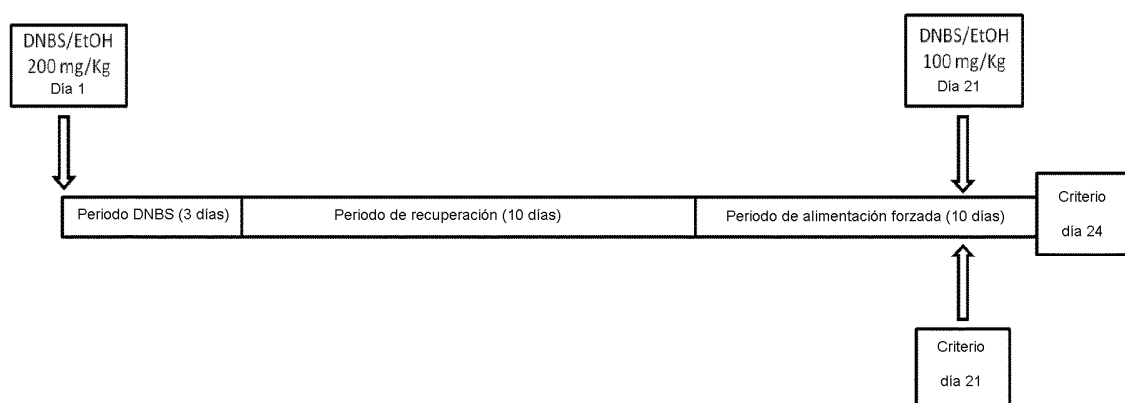


Figura 3

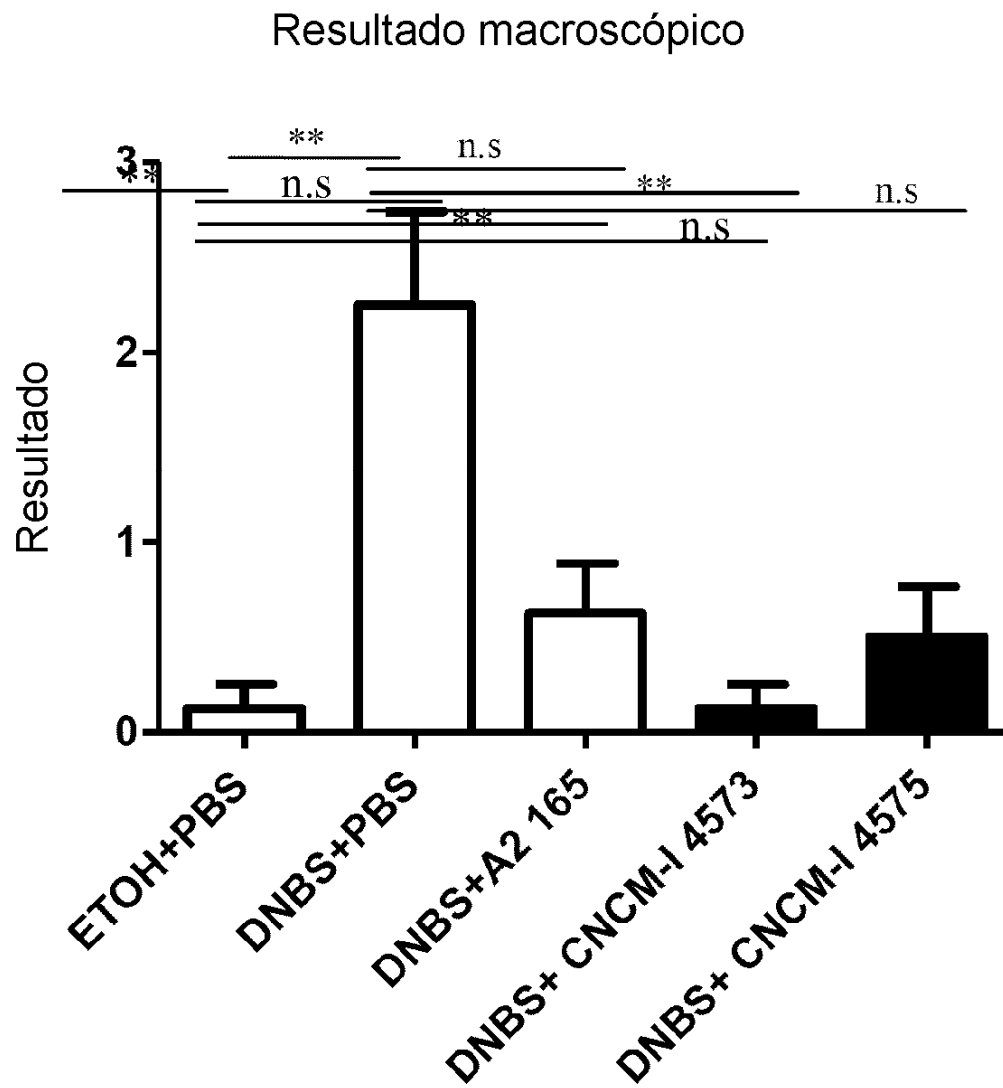


Figura 4

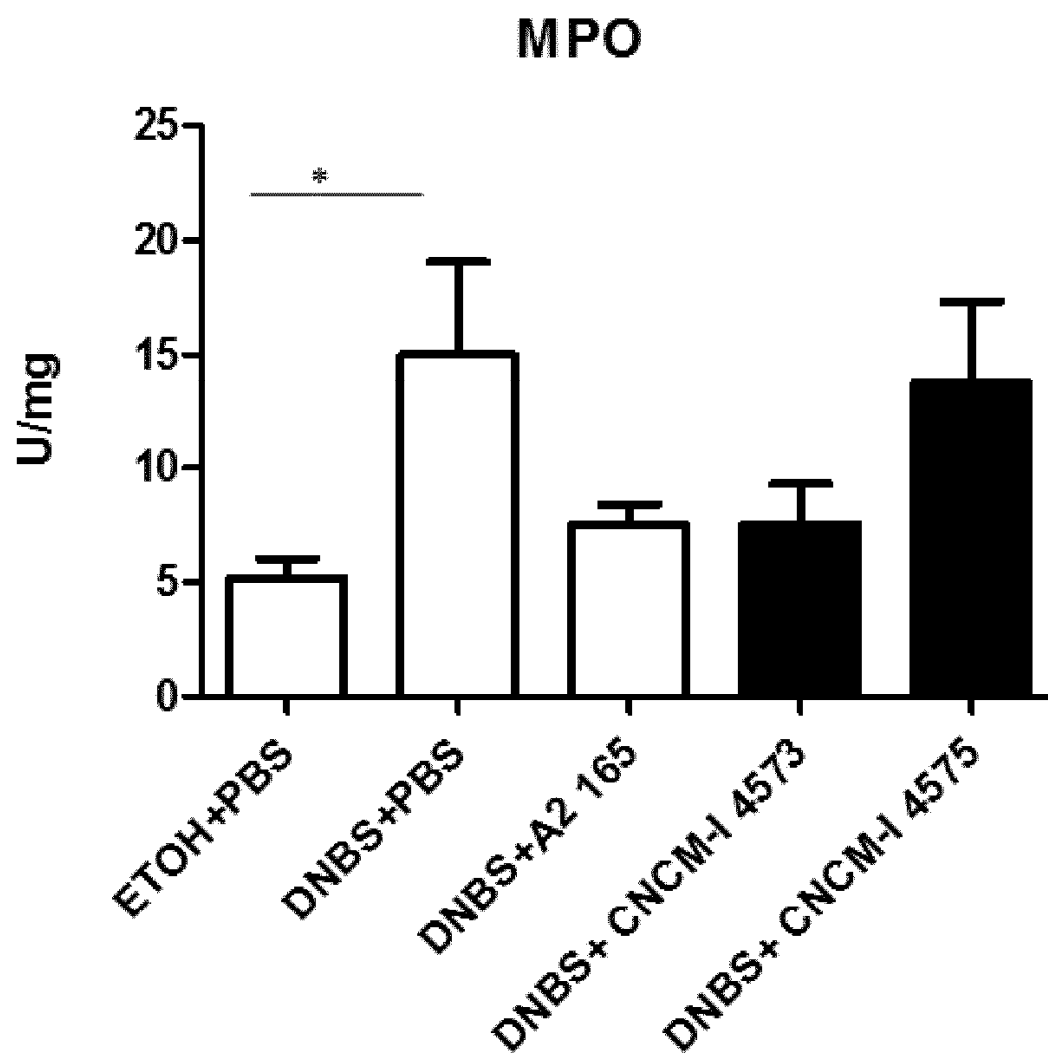


Figura 5

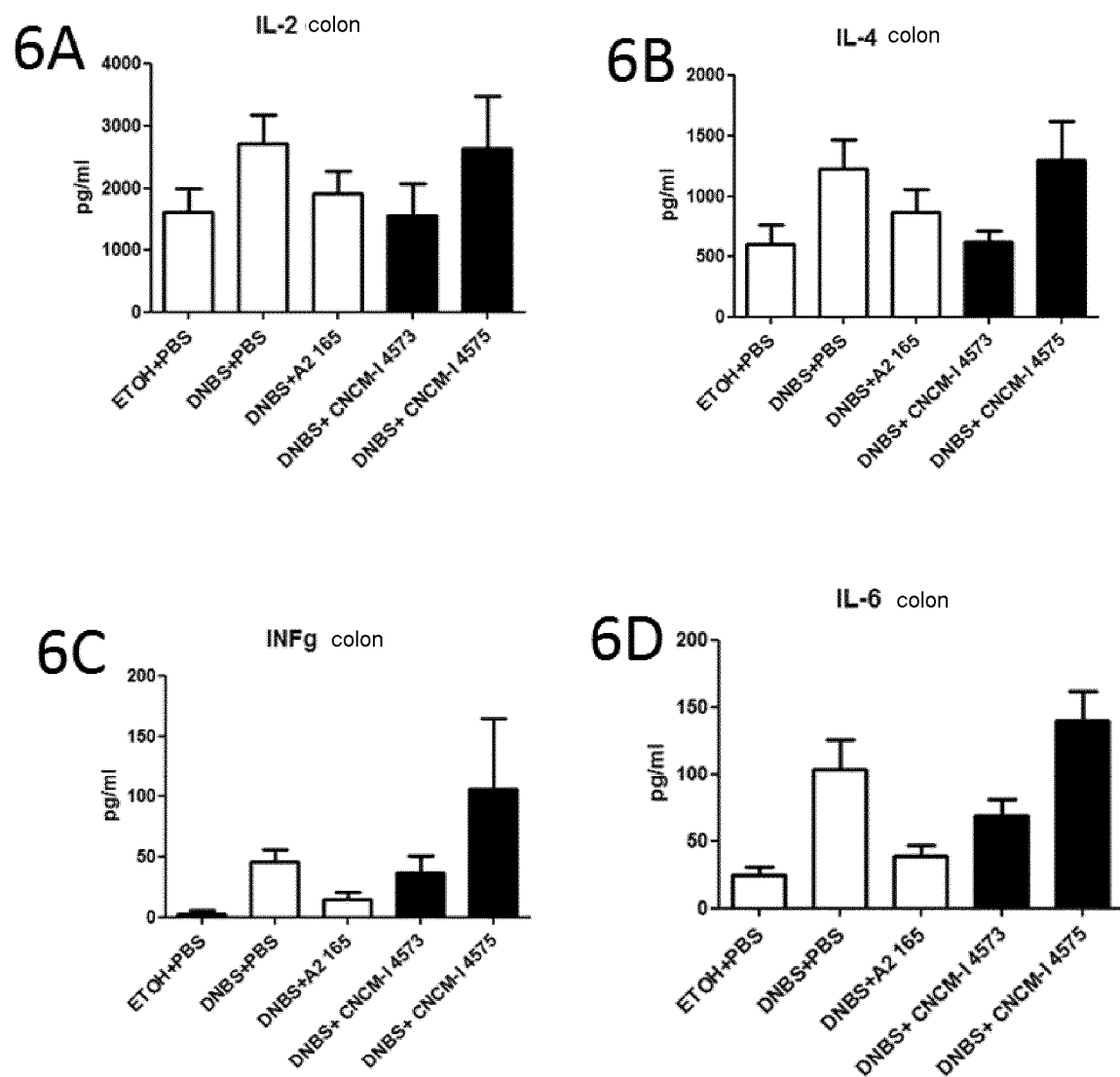


Figura 6