

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 940**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2011** **E 11702426 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013** **EP 2528610**

54 Título: **Composición probiótica para uso en el tratamiento de la inflamación del intestino**

30 Prioridad:

28.01.2010 US 299116 P
28.01.2010 EP 10151998

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2014

73 Titular/es:

AB-BIOTICS S.A. (100.0%)
Parc de recerca UAB-Campus UAB s/n, Edificio
Eureka - Despacho P2M1, Bellaterra
08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona, ES

72 Inventor/es:

ESPADALER MAZO, JORDI y
CUÑÉ CASTELLANA, JORDI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 437 940 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

Composición probiótica para uso en el tratamiento de la inflamación del intestino

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos 61/299,116 y de la solicitud de patente europea EP10151998, ambas presentadas el 28 de enero de 2010, las cuales se incorporan aquí como referencia.

La presente invención se refiere a los campos de la medicina, la microbiología y la nutrición y, particularmente, a una nueva composición probiótica. Particularmente, se han aislado nuevas cepas de *Lactobacillus plantarum* y de *Pediococcus acidilactici* y combinado en una formulación útil en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, tales como la inflamación del intestino (p.ej., la enfermedad inflamatoria intestinal) y el síndrome del intestino irritable.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La colitis ulcerosa (CU), la reservoritis ("Pouchitis"), y la enfermedad de Crohn son ejemplos de enfermedades inflamatorias intestinales (EII, en inglés "inflammatory bowel disease", IBD) que se caracterizan por la inflamación crónica en el intestino. Los síntomas clínicos son la diarrea, el dolor abdominal, el sangrado rectal ocasional, la pérdida de peso, el cansancio y algunas veces fiebre. Aunque ocurren a cualquier edad, la EII es más común en adolescentes y adultos jóvenes, que consecuentemente pueden sufrir retraso en el desarrollo y en el crecimiento. La frecuencia de la enfermedad es similar a la diabetes tipo 1 en Europa y los Estados Unidos. El curso clínico de la EII varía considerablemente. Los pacientes con síntomas leves o moderados pueden tratarse sin necesidad de hospitalización. Sin embargo, el 10-15% de los pacientes experimentan una evolución grave de la enfermedad, que en muchos casos requiere de cirugía.

La EII se trata médicamente mediante la reducción de la inflamación y por lo tanto controlando los síntomas gastrointestinales. Sin embargo, actualmente no existe cura médica para la EII. La colectomomía puede eliminar la CU, pero reduce la calidad de vida y aumenta el riesgo de complicaciones. Los tratamientos médicos disponibles incluyen el uso del ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), corticosteroides y medicamentos inmunomoduladores. El tratamiento prolongado de los síntomas de leves a moderados de la EII normalmente se lleva a cabo utilizando 5-ASA, mientras que los corticosteroides y los medicamentos inmunomoduladores se utilizan para tratar los síntomas graves. Como efectos secundarios de la 5-ASA aparecen la diarrea o el dolor abdominal, mientras que el uso prolongado de corticosteroides con frecuencia muestra efectos secundarios graves, incluyendo la reducción de la masa ósea, infección, diabetes, pérdida de masa muscular y trastornos psiquiátricos. Los medicamentos inmunomoduladores suprimen el sistema inmune, que controla los síntomas de la EII. Sin embargo, el estado inmunodeficiente resultante deja al paciente susceptible a muchas enfermedades.

El síndrome del intestino irritable (SII, en inglés "irritable bowel disease", IBS) es una enfermedad caracterizada por dolor abdominal y/o malestar que se asocia a la alteración del hábito intestinal o defecación, donde los síntomas no se explican por anomalías estructurales o bioquímicas. Son también comunes en el SII, la urgencia, la hinchazón y la sensación de evacuaciones incompletas. Por lo tanto, se clasifica entre los trastornos gastrointestinales funcionales que incluyen enfermedades como la distensión abdominal funcional, el dolor torácico no cardíaco, la dispepsia no ulcerosa y el estreñimiento crónico o la diarrea (Longstreth G. H. et al., 2006). Cabe mencionar que el SII tiene un impacto sustancial en la morbilidad y la calidad de vida más allá del dolor abdominal y el malestar, ya que los síntomas asociados afectan tanto a la sensación de bienestar del que lo sufre como a la capacidad de funcionar normalmente (Dean B. B. et al., 2005).

Hay una gran actividad en el campo del desarrollo de fármacos para el tratamiento del SII. En este sentido, han ganado popularidad diferentes antidepresivos a pesar de que su eficacia en ensayos clínicos ha sido modesta y su utilidad clínica está limitada por los efectos secundarios adversos. Los agentes serotoninérgicos han demostrado su eficacia sobre los síntomas globales del SII. Sin embargo, la reciente preocupación sobre la seguridad ha limitado severamente su uso. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas terapias para el SII es de gran interés.

Los probióticos se definen como "microorganismos vivos que cuando se ingieren en cantidades determinadas, ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica inherente" (Araya M. et al., 2002; Guarner F. et al., 1998). Varias bacterias ácido lácticas y especies del género *Bifidobacterium* son probióticas, lo que implica que se ha demostrado que promueven un efecto saludable específico. Las bacterias probióticas deben cumplir varios requisitos relativos a ausencia de toxicidad, viabilidad, adhesión y efectos beneficiosos. Estas características probióticas son dependientes de cepa, incluso entre las bacterias de la misma especie. Por lo tanto, es importante encontrar aquellas cepas que tienen un mejor comportamiento en todos los requisitos probióticos. Se han realizado estudios clínicos en humanos utilizando probióticos solos o en combinación con antibióticos para identificar cepas y/o formulaciones para el tratamiento de pacientes con EII o SII, o para mantener en remisión a pacientes de EII ya tratados. WO 96/29083 y EP 554418 describen dos cepas de *Lactobacillus* colonizadoras del intestino, que incluyen *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 6595) y *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* 271 (DSM 6594). EP 415941 describe métodos para preparar una composición de nutrientes que comprende el tratamiento de papilla de avena con enzimas antes de mezclar con lactobacilos. La patente US 7195906 describe una cepa de *Bifidobacterium*

aislada de una resección lavada de tracto intestinal, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, especialmente la actividad inflamatoria gastrointestinal, tales como la EII, y SII.

A pesar de un potencial prometedor, es necesaria una mejora considerable del efecto de los probióticos para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (como la EII), así como de otras enfermedades gastrointestinales (tales como el SII).

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han encontrado que una composición que comprende cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* es efectiva en el tratamiento de la inflamación del intestino. Particularmente se han aislado tres nuevas cepas probióticas que pertenecen al género *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*. Estas cepas permiten un tratamiento eficiente de la inflamación del intestino cuando se combinan como formulación única.

Así, en un primer aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad efectiva de *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485, y *Pediococcus acidilactici* CECT 7483, o mutantes o variantes de los mismos.

Las cepas *Lactobacillus plantarum* CECT 7485 y CECT 7484, y la cepa *Pediococcus acidilactici* CECT 7483 fueron depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) el 04.02.2009. Las tres cepas depositadas son viables y mantienen todas sus características relativas a su depósito.

La expresión "cantidad efectiva", como se usa en la presente memoria, significa una cantidad de un agente activo lo bastante elevada para conseguir el beneficio deseado, pero lo bastante reducida para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del buen juicio médico.

Está claro que usando las cepas depositadas como material de partida, el experto en la materia puede obtener de forma rutinaria, por mutagénesis convencional o técnicas de reislamiento, mutantes adicionales o derivados de los mismos que conserven o mejoren las características y ventajas relevantes de las cepas que forman la composición de la invención. El experto en la materia decidirá sobre el método adecuado a emplear para determinar la actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora o anti-IBS o anti hinchazón abdominal de las cepas. Se muestran ejemplos de posibles métodos para medir esta actividad en los ejemplos a continuación.

En una realización, el mutante es un mutante modificado genéticamente.

En otra realización del primer aspecto de la invención, la variante es una variante natural.

Las cepas que forman parte de la composición del primer aspecto de la invención pueden estar en forma de células viables. Alternativamente, la cepa puede estar en forma de células no viables.

El uso general de las cepas *P. acidilactici* CECT 7483 así como de *L. plantarum* CECT 7484 y CECT 7485 es en forma de células viables.

Sin embargo, puede extenderse también a células no viables como cultivos inactivados o composiciones que contienen factores beneficiosos producidos por *P. acidilactici* CECT 7483, así como por *L. plantarum* CECT 7484 y CECT 7485. Esto incluye microorganismos inactivados térmicamente, o microorganismos inactivados por exposición a pH alterado, sonicación, radiación, o presión. Con células no viables la preparación del producto es más simple, las células pueden incorporarse fácilmente en fármacos y los requisitos de almacenamiento son menos limitados que en células viables.

Cuando se usa en la forma de la composición de la invención, las cepas están, preferiblemente, en un ratio de concentración 1:1:1.

Las cepas CECT 7483, CECT 7484, y CECT 7485 muestran una actividad inhibitoria significativa frente varias cepas de bacterias patógenas y potencialmente patógenas, mientras que muestran un mínimo antagonismo contra cepas comunes comensales de la flora gastrointestinal humana. Además, estas tres cepas muestran una falta de actividad inhibitoria significativa entre ellas, permitiendo así su uso combinado en una sola fórmula. Esto es importante porque significa que la composición como se define en el primer aspecto de la invención ejerce un efecto beneficioso en el intestino debido al efecto "intacto" de cada una de las tres cepas. La combinación de estas cepas en una sola fórmula (es decir, la composición de la invención) muestra la capacidad de mejorar los síntomas clínicos (tales como la pérdida de peso y la diarrea) en diferentes modelos animales de inflamación intestinal. En línea con estos resultados, la composición de la invención muestra la capacidad única de reducir significativamente citoquinas agudas (IL-6) y crónicas (IFN γ).

Una gran variedad de especies de bacterias ácido lácticas han demostrado ser seguras. La "European Food Safety Authority" ha desarrollado un sistema que concede el status "Qualified Presumption of Safety" (QPS) a unidades taxonómicas con una larga historia de seguridad probada. Las cepas CECT 7483, CECT 7484 y CECT 7485 pertenecen a especies bacterianas que tienen QPS status (Andreoletti O. et al., 2008).

Las cepas de la presente invención tienen la ventaja de ser particularmente útiles como probióticos. Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias probióticas deben satisfacer varios requisitos relacionados con la ausencia de toxicidad, viabilidad, adhesión y efectos beneficiosos. Estas características probióticas son dependientes de cepa, incluso entre bacterias de la misma especie. Por lo tanto, es importante encontrar aquellas cepas que tengan un mejor comportamiento en todos los requisitos probióticos. Los ejemplos a continuación proporcionan (a modo de ejemplo) protocolos para determinar cada una de las características probióticas y se demuestra que dichas cepas tienen excelentes características probióticas.

La aparición y la propagación de la resistencia a los antibióticos en las bacterias representan una amenaza para la salud humana y animal y presentan un coste financiero y social importante. Cuando la resistencia a un antibiótico es inherente a una especie bacteriana, generalmente se hace referencia a "resistencia intrínseca" (a veces llamada "resistencia natural"). Se presume que la resistencia intrínseca presenta un potencial mínimo de extensión horizontal, mientras que la resistencia adquirida mediada por la adición de genes se considera que tiene un alto potencial de propagación lateral. Los inventores de la presente invención han encontrado que las cepas que forman la composición de la invención no muestran ninguna resistencia significativa a los antibióticos de importancia humana y/o veterinaria (ampicilina, gentamicina, estreptomicina, eritromicina, tetraciclina, clindamicina y cloranfenicol) de acuerdo con las directrices de la European Food Safety Authority (Anadón A. et al., 2005; Borries G. et al., 2008), evitando de esta manera el riesgo de una potencial transferencia de resistencia a los antibióticos a especies patógenas.

Además, los inventores de la presente invención han encontrado que las cepas CECT 7483, CECT 7484, y CECT 7485 pueden co-administrarse conjuntamente con otros medicamentos utilizados para el tratamiento del EII (tales como la mesalazina). Como se muestra a continuación, el crecimiento de dichas cepas no se inhibe completamente incluso utilizando concentraciones saturadas de mesalazina. En otras palabras, incluso utilizando altas concentraciones de mesalazina, la eficacia de la composición de la invención que comprende las cepas probióticas no está comprometida y, por lo tanto, puede ejercer tanto las funciones probióticas como las anti-inflamatorias.

Las cepas de la invención han demostrado que son muy resistentes a las condiciones del medio gastrointestinal de mamíferos (medio ácido, sales biliares, y altas concentraciones de lisozima y de peróxido de oxígeno), siendo por lo tanto capaces de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal (en adelante también llamado "GIT"). Las cepas también tienen una buena adhesión al epitelio intestinal, lo que les permite permanecer en el tracto intestinal para ejercer sus efectos probióticos.

Además, las presentes cepas tienen varios efectos beneficiosos en el hospedador. Además de su actividad antiinflamatoria en el intestino, benefician al equilibrio de la microbiota intestinal debido a su actividad antagonista. La expresión "actividad antagonista" se refiere a la inhibición del crecimiento de bacterias gastrointestinales no beneficiosas por la actividad de bacterias probióticas. El estado de tener un equilibrio microbiano gastrointestinal inadecuado se conoce como disbiosis y tiene múltiples consecuencias negativas para el bienestar humano. A continuación se mostrará que las cepas tienen una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de cepas patógenas cuando se comparan con otras cepas comerciales. Adicionalmente, como se ha mencionado anteriormente, los inventores han encontrado que las nuevas cepas de la invención no muestran actividad inhibitoria entre ellas.

Adicionalmente, se ha encontrado que las cepas que forman la composición del primer aspecto de la invención producen grandes cantidades de ácidos grasos de cadena corta (en inglés, "short chain fatty acids", AGCC). La producción de AGCC a partir de fibras no digeribles es una capacidad probiótica interesante. Esta capacidad es deseable en un probiótico porque los AGCC producidos muestran varias propiedades beneficiosas en el hospedador. Entre sus diversas propiedades, los AGCCs, especialmente el ácido butírico, son fácilmente absorbidos por la mucosa intestinal, estimulan la absorción de sodio y agua en el colon, y son tróficos en la mucosa intestinal (D'Argenio G. et al, 1999; Tedelind S. et al., 2007). Además, el ácido butírico es utilizado como combustible por los colonocitos. Cada cepa en la fórmula es un fuerte productor de un AGCC diferente, ya sea acético, propiónico o butírico, que son los tres AGCCs principales encontrados en el intestino. La mejor comprensión de cómo los ácidos grasos de cadena corta actúan sobre el proceso de la inflamación puede ayudar a mejorar la eficacia de los tratamientos actuales de inflamación del intestino. A este respecto, se ha reportado la relación entre los AGCCs y la regulación de las condiciones inflamatorias a través de receptores acoplados a proteína G (Maslowski K.M. et al., 2009).

Por otra parte, las cepas CECT 7483, CECT 7484 y CECT 7485 promueven efectos inmunomoduladores en el hospedador, ya que inducen un patrón mejorado de citoquinas de la mucosa intestinal. Estos efectos inmunomoduladores son beneficiosos para el hospedador, ya que ayudan a conseguir una mejor resistencia a las enfermedades y una disminución del riesgo de alergias. Se sabe que las bacterias Gram-negativas en el GIT presentan la molécula lipopolisacárida (LPS) en su superficie, lo que induce la producción de señales pro-inflamatorias por las células de la mucosa intestinal. La suplementación con probióticos puede cambiar esta situación para favorecer una mayor presencia de las bacterias Gram-positivas en el GIT (agrupadas en el grupo de bacterias del ácido láctico), con una mejor aptitud ecológica o con propiedades antagonistas contra algunos microorganismos Gram negativos. Sin embargo, algunos microorganismos probióticos muestran la capacidad de modular per se la producción de citoquinas, que son moléculas mensajeras que regulan las respuestas inmunes e inflamatorias en el cuerpo. En particular, algunas bacterias probióticas inducen un patrón más equilibrado entre la

señalización pro/anti-inflamatoria en la mucosa intestinal (independientemente del efecto sobre las bacterias Gram-negativas). Como se ilustrará a continuación, se encontró que las cepas de la composición de la invención promueven una reducción de los niveles de citoquinas inflamatorias (IFN- γ e IL-6), induciendo así un patrón mejorado de citoquinas de la mucosa intestinal. Este efecto inmunomodulador se complementa con las propiedades antagonistas de las cepas reduciendo de la presencia de patógenos Gram negativos en el GIT.

Se sabe que las bacterias no viables y los componentes bacterianos pueden tener efectos inmunomoduladores per se. Por ejemplo, se ha reportado que los componentes celulares de especies de *Lactobacillus* inducen citoquinas anti-inflamatorias (Pathmakanthan S. et al., 2004) o reducen citoquinas pro-inflamatorias (Zhang L. et al., 2005). Tras el aislamiento de estos componentes, es esperable su manipulación con fines farmacéuticos.

Teniendo en cuenta los resultados que se adjuntan a continuación, está claro que las cepas CECT 7484 y CECT 7485, que conforman la composición del primer aspecto de la invención, se caracterizan por características específicas tales como: supervivencia al tracto gastrointestinal, adherencia a la mucosa intestinal, resistencia al estrés oxidativo, producción de metabolitos con actividad anti-inflamatoria (tanto ácidos grasos de cadena corta como otros productos con dicha actividad) y ausencia de antagonismo entre ellas. La composición y las cepas aisladas de la presente invención no derivan de manera obvia del estado de la técnica porque son el resultado de una investigación compleja y los resultados obtenidos en relación a la actividad inflamatoria en el intestino son sorprendentes. Los protocolos para la determinación de cada una de las características mencionadas se incluyen más adelante. A partir del contenido de la presente solicitud, el experto en la materia podría encontrar otras cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Pediococcus*, y más concretamente a las especies *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus acidilactici*, las cuales, cuando son administradas de manera separada o combinadas en una única composición, muestran los mismos efectos probióticos o terapéuticos que los descritos en la presente solicitud.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad efectiva de las cepas de la invención, o de cepas mutantes de las mismas, para su uso como medicamento.

En particular, se ha encontrado que la composición que comprende las cepas CECT 7483, CECT 7484 y CECT 7485 tiene una actividad anti-inflamatoria en el intestino en modelos de EII. Como se ha comentado, la inflamación del intestino es una de las principales características de la EII. Por lo tanto, la composición del primer aspecto de la invención es útil en la prevención o el tratamiento de dicha enfermedad.

Así, en un tercer aspecto, la invención proporciona la composición como se define en el primer aspecto para su uso en la prevención o el tratamiento de la inflamación del intestino en un animal, incluyendo un humano. Este aspecto puede ser formulado alternativamente como el uso de una composición como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación del intestino. Esto puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación del intestino en un animal, incluyendo un humano, que comprende administrar a dicho animal que lo necesite una cantidad efectiva de la composición como se define en el primer aspecto de la invención.

En una realización del tercer aspecto de la invención, la composición es usada para el tratamiento o la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal.

A partir de los datos obtenidos usando modelos de EII reportados en los ejemplos (ver más adelante), se deriva que la administración de las cepas de la invención, que son efectivas en el tratamiento de alteraciones de la salud caracterizadas por la inflamación intestinal y la diarrea, también puede ser útil para tratar otras alteraciones de la salud caracterizadas por la inflamación de la mucosa o la submucosa intestinal y cuando la diarrea es prevalente, como la enteritis causada por radioterapia o quimioterapia. La enteritis es un efecto secundario común de la radioterapia abdominal o pélvica, que afecta al 60-70% de los pacientes. La enteritis puede forzar la programación de cambios en el régimen de radioterapia para disminuir los efectos secundarios, llevando potencialmente a una eficacia anti-tumoral subóptima del tratamiento. Actualmente no existen estrategias preventivas para la enteritis inducida por radioterapia. A pesar de esto, algunos probióticos han mostrado ser prometedores en ensayos clínicos aleatorizados (ECAs). Una composición probiótica, como la de la presente invención, combina los efectos saludables de la producción de AGCCs, la capacidad para resistir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que se encuentran en la mucosa inflamada, y la actividad antimicrobiana contra patógenos oportunistas que puede ser útil para el tratamiento de la enteritis inducida por radioterapia o quimioterapia.

Por otra parte, los presentes inventores han encontrado que las cepas de la presente invención son eficientes en el tratamiento de SII. Como se muestra más adelante, la composición del primer aspecto de la invención es útil para tratar el SII, como se demuestra mediante un ensayo aleatorizado, doble ciego, cruzado, controlado con placebo.

Por lo tanto, en un cuarto aspecto la presente invención proporciona la composición del primer aspecto de la invención para su uso en la prevención y/o el tratamiento del SII. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de una composición como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento del SII. Esto puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o el tratamiento del SII en un animal, incluyendo un humano, que comprende administrar a

dicho animal que lo necesite una cantidad efectiva de la composición como se define en el primer aspecto de la invención.

Además, los presentes inventores han encontrado que debido a las características de las cepas, la composición del primer aspecto de la invención es útil en el tratamiento de la hinchazón y la distensión abdominales. Como se muestra más adelante, cuando la composición es administrada a gente que sufre de hinchazón o de distensión abdominal, se observa una mejora sorprendente.

Por lo tanto, en un quinto aspecto la presente invención proporciona la composición del primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento de la hinchazón o distensión abdominal. Este aspecto puede ser formulado alternativamente como el uso de la composición como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hinchazón o la distensión abdominales. Esto puede formularse alternativamente como un método para el tratamiento de la hinchazón o distensión abdominales en un animal, incluyendo un humano, que comprende administrar a dicho animal que lo necesite una cantidad efectiva de la composición como se define en el primer aspecto de la invención.

Los sorprendentes efectos beneficiosos observados en personas que sufren SII, y/o hinchazón y distensión abdominales pueden deberse al hecho de que las cepas de la invención CECT 7483, CECT 7484 y CECT 7485 tengan la capacidad de producir los AGCCs listados en la Tabla 6 y la actividad antagonista que se muestra en la Tabla 3.

Es bien conocido en el estado de la técnica que los AGCCs modulan la motilidad intestinal. Particularmente, se sabe que los AGCCs estimulan la liberación de serotonina (5-HT) en colon de rata (Fukumoto S. et al., 2003; Tazoe H. et al., 2008) lo que juega un rol importante en la regulación tanto en la sensación como en la motilidad intestinal. De manera similar, se ha descrito que el ácido butírico disminuye la sensibilidad visceral del intestino en voluntarios humanos (Vanhoutvin S. A. et al., 2009). A partir de este hecho, se puede concluir que las cepas que forman la composición de la invención pueden ser útiles para el tratamiento, no sólo del SII o del dolor abdominal, sino también de otras alteraciones de la salud relacionadas con la motilidad gastrointestinal y/o el dolor gastrointestinal, tales como el estreñimiento funcional o la diarrea funcional.

La composición y las cepas aisladas de la presente invención no derivan de manera obvia del estado de la técnica porque son el resultado de una investigación compleja y los resultados que han sido obtenidos en relación a la eficiencia en el tratamiento de SII e hinchazón y distensión abdominales son sorprendentes.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado por primera vez una cepa de *Pediococcus acidilactici* con capacidad para tratar EII y SII. Dicha capacidad se cree que es debida a las propiedades específicas, indicadas a lo largo de la especificación, de la cepa aislada de *Pediococcus*. A la luz de las enseñanzas y los protocolos proporcionados en la presente especificación, un experto en la materia será capaz de encontrar más cepas de *P. acidilactici* con las mismas características probióticas y terapéuticas que el objeto de la presente invención.

La composición de acuerdo con la invención que comprende una cantidad efectiva de las cepas de la invención, o de sus mutantes, puede ser formulada como producto comestible, farmacéutico o veterinario, en los cuales dichas cepas son los únicos agentes activos o están mezcladas con uno o más agentes activos diferentes y/o mezcladas con excipientes farmacéuticos o veterinarios aceptables (en el caso de un producto farmacéutico o veterinario) o aditivos adecuados (en el caso de un producto comestible). En una realización particular de la invención, los productos contienen adicionalmente uno o más agentes activos adicionales. Preferiblemente, los agentes activos adicionales son otras bacterias probióticas no antagónicas a las cepas que forman la composición de la invención. Dependiendo de la formulación, las cepas podrían ser añadidas como bacterias purificadas, como cultivo bacteriano, como parte de un cultivo bacteriano, como cultivo bacteriano que ha sido post-tratado, en solitario o en combinación con vehículos o ingredientes adecuados. También podrían añadirse prebióticos.

En otros aspectos, la invención proporciona un producto farmacéutico y veterinario que contiene una cantidad efectiva de la composición de la invención, junto con cantidades adecuadas de excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables. A este respecto, el producto farmacéutico puede prepararse en cualquier forma adecuada que no afecte negativamente a la biodisponibilidad de las cepas que forman la composición de la invención. Así, la composición de la invención puede formularse para ser administrada oralmente en forma, por ejemplo, de polvo liofilizado, cápsulas, preparaciones líquidas, etc. La selección de los excipientes y de los métodos más apropiados para la formulación en vista del propósito particular de la composición están dentro del alcance de los expertos en la materia de la tecnología farmacéutica. Aunque se prefiere la administración oral, son posibles otras vías, tales como la inyectable, rectal o tópica.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, en proporción a una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Pueden encontrarse vehículos, excipientes, etc. adecuados en los textos

farmacéuticos convencionales. Asimismo, la expresión "veterinariamente aceptable" significa adecuado para su uso en contacto con los tejidos de un animal no humano.

Las cepas de la invención también pueden incluirse en una diversidad de productos comestibles, tales como productos lácteos, un yogur, una cuajada, un queso (por ejemplo tipo quark, cremoso, procesado, blando y duro), una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado a base de leche, un helado, un producto a base de cereal fermentado, un polvo a base de leche, una bebida, un aliño y un alimento para mascotas. La expresión "producto comestible" se usa en la presente memoria en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto en cualquier forma de presentación que puede ser ingerido por un animal, pero excluyendo productos farmacéuticos y veterinarios. Son ejemplos de otros productos comestibles los productos cárnicos (por ejemplo, paté de hígado, salchichas tipo frankfurt y embutidos de salami o pastas de carne), pastas de chocolate, rellenos (por ejemplo, trufa, crema) y escarchados, chocolate, dulces (por ejemplo caramelo, glaseados o dulce de leche), productos horneados (tartas, pasteles), salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores de café. Los productos comestibles particularmente interesantes son los complementos alimenticios y las fórmulas infantiles. En el sentido de la presente invención, los complementos alimenticios también incluyen nutraceuticos, que se sabe que son extractos de alimentos que tienen un efecto medicinal sobre la salud humana. También se incluyen en el alcance de la invención forrajes para alimentación animal. Las composiciones de la invención también podrían usarse como ingrediente en otros productos alimenticios.

Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporciona un producto comestible que contiene la composición de la invención junto con cantidades apropiadas de ingredientes comestibles. Preferentemente, la composición de la invención es un complemento alimenticio.

La cantidad efectiva de unidades formadoras de colonias (ufc) para cada cepa en la composición se determinará por el experto en la materia y dependerá de la formulación final. Por ejemplo, en productos comestibles, la cepa o cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^5 ufc/g a aproximadamente 10^{12} ufc/g, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^7 ufc/g a aproximadamente 10^{12} ufc/g, de acuerdo con la legislación actual. La expresión "unidad formadora de colonias" ("ufc") se define como el número de células bacterianas revelado por los recuentos microbiológicos en placas de agar.

Los complementos alimenticios contienen habitualmente cepas probióticas en una cantidad que varía de 10^7 a 10^{12} ufc/g. En una realización particular, la composición de la invención es un complemento alimenticio que comprende entre 10^9 - 10^{11} ufc/g.

Las cepas de la invención se producen por cultivo de las bacterias en un medio adecuado y en condiciones adecuadas. Las cepas pueden cultivarse en solitario para formar un cultivo puro, o como un cultivo mixto junto con otros microorganismos, o por cultivo de bacterias de diferentes tipos por separado y después combinando las mismas en las proporciones deseadas. Después del cultivo, la suspensión celular se recupera y se usa como tal o es tratada de la forma deseada, por ejemplo, por concentración o liofilización, para emplearse después en la preparación de productos farmacéuticos o comestibles. A veces la preparación probiótica está sujeta a un procedimiento de inmovilización o encapsulación para mejorar la vida útil. Se conocen en el estado de la técnica varias técnicas para la inmovilización o encapsulación de bacterias.

Si la composición de acuerdo con la invención se usa como complemento alimenticio, puede administrarse como tal, puede mezclarse con un líquido adecuado para beber, tal como agua, yogur, leche o zumo de frutas, o puede mezclarse con alimento sólido o líquido. En este contexto, el complemento alimenticio puede estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, sobrecitos, pastillas, dulces, barritas, jarabes y formas de administración correspondientes, habitualmente en forma de una dosis unitaria. Preferentemente, la composición de la invención se administra en forma de comprimidos, cápsulas, jarabes o píldoras, fabricados en procedimientos convencionales de preparación de productos farmacéuticos.

A lo largo de la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características, aditivos, componentes o etapas técnicas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Además, la presente invención abarca todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en la presente memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 representa los patrones de electroforesis de campo pulsante con Not-I o Sfi-I (izquierda) y Sma-I (derecha) de ADN genómico de: 1, *Pediococcus acidilactici* CECT 7483; 2, *Lactobacillus plantarum* CECT 7484; 3, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485. Como controles: 4, cepa comercial *P. acidilactici* Rossell1001 (Institut Rossell, Canada); 5, *L. plantarum* 299v (Probi AB, Suecia); y 6, cepa *L. plantarum* aislada del producto comercial VSL#3 (VSL Pharmaceuticals, USA). Esta figura se refiere a la sección "genotipado de cepa".

La FIG. 2 representa el Índice de Actividad de la Enfermedad (eje Y) en un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS. El eje de las X representa la administración de: a, formulación probiótica de la invención en un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS; b, una formulación

probiótica comercial (VSL#3) en un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS; c, vehículo en un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS; y d, vehículo en un grupo control sano. Esta figura se refiere a la sección "Efecto in vivo sobre la inflamación del intestino inducida químicamente".

La FIG. 3 representa los niveles de IL-6 (eje Y) en un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS. El eje de las X representa: a, formulación probiótica de la invención administrada a un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS; b, una formulación probiótica comercial (VSL#3) administrada a un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS; c, vehículo administrado en un grupo de ratones que padecen de una inflamación intestinal inducida por DSS; y d, vehículo en un grupo control sano. Esta figura se refiere a la sección "Efecto in vivo sobre la inflamación del intestino inducida químicamente".

La FIG. 4 representa el número de semanas sin síntomas (es decir, el número de semanas antes del comienzo del primer síntoma, por lo tanto siendo el Índice de Actividad de la Enfermedad igual a 0) (eje-Y) en un modelo de ratón knock-out de IL-10. El eje-X representa la administración de: a, la composición probiótica de la invención a un grupo de ratones knock-out de IL-10; b, formulación probiótica comercial VSL#3 a un grupo de ratones knock-out de IL-10; PBS a un grupo de ratones knock-out de IL-10; y d, vehículo a un grupo control sano. Esta figura hace referencia a la sección "Efecto in vivo sobre la Inflamación Intestinal Espontánea".

La FIG. 5 representa los niveles de IFN- γ (eje-Y) en un modelo de ratón knock-out de IL-10. El eje-X representa: a, formulación probiótica de la invención a un grupo de ratones knock-out de IL-10; b, formulación probiótica comercial (VSL#3) a un grupo de ratones knock-out de IL-10; c, vehículo a un grupo de ratones knock-out de IL-10; y d, vehículo a un grupo control sano. La figura hace referencia a la sección "Efecto in vivo sobre Inflamación Intestinal Inducida Químicamente".

La FIG. 6 representa los niveles de IL-6 (eje-Y) en un modelo de ratón knock-out de IL-10. El eje-X representa: a, formulación probiótica de la invención a un grupo de ratones knock-out de IL-10; b, formulación probiótica comercial (VSL#3) a un grupo de ratones knock-out de IL-10; c, vehículo administrado a un grupo de ratones knock-out de IL-10; y d, vehículo a un grupo control sano. Esta figura hace referencia a la sección "Efecto in vivo sobre la Inflamación Intestinal Inducida Químicamente".

La FIG. 7 representa la variación de la puntuación IBSQoL en comparación con la línea base (eje-Y) de los voluntarios tratados con cápsulas incluyendo la composición (barras negras) o el placebo (barras blancas). El eje-X representa la variación en la puntuación a los 21 días y después de 42 días de tratamiento. Esta figura hace referencia a la "Mejora en la Calidad de Vida relacionada con la Salud" en la sección "Eficacia in vivo de los sujetos SII".

La FIG. 8 representa la variación en la puntuación VSI en comparación con la línea base (eje-Y) de los voluntarios tratados con cápsulas que incluyen la composición (barras negras) o el placebo (barras blancas). El eje-X representa la variación de la puntuación después de tres semanas y después de seis semanas de tratamiento. Esta figura hace referencia a la "Mejora de la Sensibilidad Visceral" en la sección "Eficacia in vivo de Sujetos con SII".

EJEMPLOS

Las siguientes secciones describen la caracterización de las cepas de la invención, sus características probióticas específicas y sus efectos fisiológicos en el sistema gastrointestinal e inmune. Como se usa de aquí en adelante, la cepa F1033 corresponde a *Pedococcus acidilactici* CECT 7483, la cepa F2064 a *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, y la cepa F2076 a *Lactobacillus plantarum* CECT 7485.

1. Aislamiento de microorganismos

A) Métodos

Para el aislamiento de microorganismos, se tomaron heces frescas y saliva (Daniel C. et al., 2006) de niños de 0-5 años de edad y se disolvieron en tampón PBS (pH 7.4), se alicuotaron y sembraron en MRS suplementado con varias combinaciones de antibióticos. Las cepas se cultivaron bajo condiciones microaerófilas (5% CO₂) a 37 °C. El tiempo de incubación dependió de la velocidad de crecimiento, pero normalmente fue de 24 h a 3 días. Se realizó una tinción gram para tener una primera identificación. Una vez crecidas, las cepas aisladas fueron guardadas por liofilización en PBS 0.1X con un 15% de polvo de leche desnatada.

B) Resultados

Las cepas nuevas F2064, F2076 y F1033 fueron cultivadas en agar MRS suplementado con 10 µg/ml de vancomicina. El examen microscópico reveló que las cepas F2064 y F2076 son bacilos Gram-positivos, mientras que la cepa F1033 es un gran-positivo con morfología cocal.

2. Identificación

A) Métodos

El ADN genómico fue extraído usando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega). Para cada cepa aislada, se amplificó el gen 16S por PCR, usando los cebadores universales 27f, 357f, 907r y 1492r (Weisburg W. G. et al., 1991), que generan un fragmento de 16S rRNA de una longitud casi completa (1465 pb). El ADN fue lavado usando un kit Quiaquick (Quiagene, GmbH, Hilden, Alemania) y se realizaron cuatro reacciones de secuenciación por muestra, usando el kit BigDye v.3.1, en un Analizador Genético 3130 (Applied Biosystems). Se usó el programa Selected sequencing primers DNA Sequence Analysis v.5.2 (Applied Biosystems) para obtener los datos y para elaborar los cromatogramas, los cuales fueron analizados a través de los programas Chromas (Technelysium Pty Ltd.) y BioEdit (Ibis Biosciences). La identificación de género y especie se realizó comparando la secuencia obtenida con secuencias 16S de organismos conocidos de la base de datos RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) mediante un búsqueda BLASTN (Altschul S. F. et al., 1990), del Ribosomal Database Project.

TABLA 1: Cebadores usados para amplificar y secuenciar el gen 16S

Etapa	Cebador	Orientación	Secuencia 5' → 3'
Amplificación	27f	directa	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEC NO ID: 1)
	1492r	inversa	GGTTACCTTGTTACGACTT (SEC NO ID: 2)
Secuenciación	27f	directa	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEC NO ID: 1)
	357f	directa	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG (SEC NO ID: 3)
	907r	inversa	CCGTCAATTCTTTGAGTTT (SEC NO ID: 4)
	1492r	inversa	GGTTACCTTGTTACGACTT (SEQ NO ID: 2)

B) Resultados

Se identificaron las cepas F2064 y F2076 como miembros del grupo del *Lactobacillus plantarum*. La cepa F1033 se identificó como *Pediococcus acidilactici*.

3. Supervivencia en el tracto GI

A) Métodos

Para evaluar la tolerancia en un ambiente ácido, se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo bacteriano en placas de 96 pocillos junto con alícuotas de 200 µl de medio MRS ajustado a pH 2 y 3 con HCl (Panreac). Las placas se mantuvieron a 37 °C durante una hora y se midió la densidad óptica a 620 nm. Finalmente, se determinaron las células viables por recuento en placa y se compararon con el número de células viables en el inóculo.

Para evaluar la tolerancia a las sales biliares, se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo bacteriano en placas de 96 pocillos junto con 200 µl de medio MRS suplementado con un 0.5% de Oxgall (Sigma). Las placas fueron incubadas durante 3 horas a 37 °C y con un 5% de CO₂, y posteriormente se midió la densidad óptica. Finalmente, se determinaron las células viables por recuento en placa y se compararon con el número de células viables en el inóculo.

B) Resultados

Las tres cepas mostraron una buena capacidad de sobrevivir en ambientes ácidos, con menos de un logaritmo de reducción en el número de células viables después de 1 h de incubación en MRS a pH=2 o pH=3. Las cepas también tenían una marcada resistencia a las sales biliares, con menos de un 50% de reducción del número de células viables después de 3 h de incubación en MRS suplementado con un 0.5% de sales biliares.

4. Adherencia

A) Métodos

Se lavó un intestino porcino con PBS a pH 7.4 que contenía un 0.01% de gelatina y un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete®, Sigma). Se rasó la mucosa y se disolvió en tampón HEPES-Hank (HEPES 10 mM, pH 7.4) (Collado M. et al., 2007) que contenía los inhibidores anteriormente mencionados. Después la mucosa fue centrifugada a 13000 rpm durante 10 min usando el mismo tampón. Se recuperaron los sobrenadantes y se

determinó el contenido en proteína mediante el protocolo de Bradford. 24 h antes del ensayo, se incubó 1 ml de 0.5 mg/ml de solución de mucosa en pocillos de una placa ELISA de 24 pocillos.

Cada cepa a ensayar fue cultivada durante toda la noche (overnight) en medio MRS suplementado con timidina tritiada (5 µl en 3 ml de MRS). Los cultivos se centrifugaron y ajustaron a 10^8 UFC/ml en PBS realizando un recuento en una cámara Neubauer y se tomaron muestras de cada cultivo para determinar la cantidad de timidina tritiada incorporada mediante un contador de centelleo. A continuación, se añadieron 0.5 ml a los pocillos de la placa de 24 pocillos que contenían mucosa y se incubaron a 37 °C durante 60 min. Se descartó el sobrenadante de cada pocillo, y los pocillos fueron lavados dos veces con medio MEM Alpha (Gibco) para eliminar las bacterias débilmente adheridas. Finalmente, se rascaron los pocillos para recuperar la mucosa junto con las bacterias adherentes, y se midió la radioactividad. La actividad específica (cpm/UFC) de cada cultivo se calculó a partir de la radioactividad total incorporada en la suspensión de PBS ajustada a 10^8 ufc/ml. Se usó *Lactobacillus rhamnosus* GG (Valio Ltd, Finlandia) como control positivo, debido a su notablemente alta adherencia al epitelio intestinal (Jacobsen C. N. et al., 1999).

Las células Caco-2 se obtuvieron del ATCC (ECACC N°: 86010202). Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos y se dejaron crecer en DMEM hasta la confluencia (37 °C, 5% CO₂). El procedimiento experimental para obtener el número de bacterias que se adhiere por unidad de área de células caco-2 es esencialmente la misma que la explicada anteriormente para la adhesión a mucosa.

B) Resultados

La capacidad de adhesión de las cepas F1033, F2064 y F2076 se midió a partir del centelleo de la timidina tritiada y se comparó con la cepa comercial *L. rhamnosus* GG. La adhesión de las células epiteliales usando el modelo de Caco-2 es un ensayo común para cepas probióticas. En comparación con *L. rhamnosus* GG, las cepas F2064 y F2076 muestran una afinidad para células epiteliales un 60% inferior. Pese a esto, considerando la elevada afinidad de *L. rhamnosus* GG para las células epiteliales, estos valores son comparables con otros probióticos bien conocidos tales como *L. plantarum* 299v, y superiores a muchas otras cepas probióticas (Jacobsen C. N. et al., 1999). Por otro lado, la adhesión de la cepa F1033 a las células epiteliales es 2.5 veces superior a *L. rhamnosus* GG. Además, las cepas F2064 y 2076 mostraron una afinidad mucho más alta para la mucosa intestinal que para las células epiteliales, mientras que la cepa F1033 mostró un comportamiento opuesto. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

TABLA 2: Adhesión de cepas bacterianas probióticas a la mucosa. [* A partir de un concentración total de bacterias de 10^8 ufc].

Cepa	Caco-2 (ufcs/cm ²)	Mucus (ufcs/cm ²)
F1033	$1.21 \pm 0.17 \cdot 10^5$ ufc	$6.06 \pm 0.73 \cdot 10^4$ ufc
F2064	$1.89 \pm 0.12 \cdot 10^4$ ufc	$2.25 \pm 0.12 \cdot 10^6$ ufc
F2076	$1.71 \pm 0.16 \cdot 10^4$ ufc	$5.91 \pm 0.03 \cdot 10^5$ ufc
<i>L. rhamnosus</i> GG	$4.41 \pm 0.22 \cdot 10^4$ ufc	$3.29 \pm 0.57 \cdot 10^6$ ufc

5. Capacidad antagonista

A) Métodos

Se usaron las siguientes colonias indicadoras: *P. mirabilis* CECT 4557, *K. oxytoca* CIP 103434, *C. perfringens* ATCC 13124, *C. ramosum* ATCC 25582, *E. faecalis* CETC 795, *Y. pseudotuberculosis* ATCC29833, *B. vulgatus* ATCC 8482 y *B. thetaiotaomicron* ATCC2079 fueron cepas de colección. *C. albicans*, *S. enterica* thyphimurium, *S. enterica* cholerasuis, *C. jejuni*, *E. coli* y *P. aeruginosa* fueron aislados de laboratorio. Las cepas indicadoras fueron sembradas uniformemente en placas que contenían el medio apropiado (Oxoid) y cultivadas hasta confluencia a las temperaturas apropiadas en condiciones microaerófilas (5% CO₂). A continuación, se situaron secciones cilíndricas de 6 mm (diámetro) de las placas de agar confluentes de F1033, F2064 o F2076 boca abajo sobre la placa de cepas indicadoras y se incubaron toda la noche (overnight) a 37 °C. Al día siguiente, se midieron las zonas de inhibición situando las placas de agar sobre una regla plana. La actividad inhibitoria del crecimiento (GI) se calculó de la siguiente manera:

$$GI = \frac{(IZD - CD)}{2}$$

donde IZD es el Diámetro de la Zona de Inhibición y CD el diámetro del cilindro, medido en milímetros.

B) Resultados

TABLA 3: Actividad inhibitoria del crecimiento (GI) de las cepas probióticas frente a 12 cepas patógenas o potencialmente patógenas, y frente a 2 cepas comensales de la flora gastrointestinal.

	F2064	F2076	F1033
Patógenos			
<i>C. albicans</i>	2	0.5	1.25
<i>S. enterica typhimurium</i>	1	1	0.25
<i>S. enterica choleraesuis</i>	1	1	0.5
<i>E. coli</i>	1.75	3.7	1.1
<i>C. jejuni</i>	0	0	4.75
<i>K. oxytoca</i>	0.5	1	2
<i>P. mirabilis</i>	4	1.5	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	3	3.75	4.5
<i>E. faecalis</i>	1.75	1	1.25
<i>C. perfringens</i>	2.25	3.75	1.75
<i>C. ramosum</i>	1.25	1.75	0.5
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	5.5	3.4	4.5
Comensales			
<i>B. thetaiotaomicron</i>	0.4	0.4	0.5
<i>B. vulgatus</i>	0.3	0.5	0.7

5

Las cepas F2064, F2076 y F1033 mostraron una capacidad inhibitoria significativa contra *Candida albicans* y varias bacterias potencialmente patógenas. Por otro lado, las cepas mostraron una actividad mínima contra cepas comensales que se encuentran comúnmente en la flora gastrointestinal indígena del género *Bacterioides*. Además, las cepas F2064, F2076 y F1033 no mostraron una actividad inhibitoria significativa entre ellas. Cabe mencionar que la cepa F1033 es la única cepa que mostró una elevada actividad inhibitoria contra *Campylobacter jejuni*, mientras que la cepa F2076 destaca en la inhibición de *Escherichia coli* y la cepa F2064 en la inhibición tanto de *Candida albicans* como *Proteus mirabilis*.

10

6. Capacidad antioxidante

A) Métodos

Se pusieron alícuotas de 20 µl de cultivos overnight de cada cepa (10^9 ufc/ml aprox) en placas de 96 pocillos. Se añadieron a los pocillos 200 µl de MRS suplementado con 10 mM de paraquat ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$, un donante de anión superóxido) o nitroprusiato de sodio ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$, un donante de óxido nítrico) y las placas se incubaron a 37 °C con un 5% de CO_2 . Después de 6 h se leyeron las densidades ópticas a 620 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de crecimiento de células comparado con el crecimiento en medio MRS estándar. Se siguió el mismo protocolo para las cepas de *L. rhamnosus* GG y la cepa de *L. plantarum* aislada de la formulación comercial VSL#3 (el aislamiento se realizó siguiendo procedimientos estándar).

20

B) Resultados

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un decaimiento del sistema de defensa antioxidante. El estrés oxidativo se desarrolla particularmente en reacciones inflamatorias porque las células inflamatorias, los neutrófilos y los macrófagos producen grandes cantidades de ROS (Rezaie A. et al., 2007; Roessner A. et al., 2008). Las cepas F1033, F2064 y F2076 mostraron capacidad de sobrevivir bajo fuertes condiciones oxidantes comparables a la bien conocida cepa probiótica *L. rhamnosus* GG, así como a la cepa de *L. plantarum* aislada de la fórmula VSL#3. Cabe mencionar que la cepa F2076 mostró la mayor resistencia tanto frente a paraquat (donante de anión superóxido) como a nitroprusiato de sodio (donante de óxido nítrico). La resistencia al estrés oxidativo es una característica deseable para una cepa probiótica que se espera que sobreviva en un ambiente de mucosa inflamada.

25

30

TABLA 4: Porcentaje de crecimiento en un medio que contiene paraquat y nitroprusiato de sodio 10 mM, comparado con el medio MRS estándar.

Cepa	% crecimiento en paraquat	% crecimiento en nitroprusiato
<i>L. rhamnosus</i> GG	70 ± 10	99 ± 17
<i>L. plantarum</i> VSL#3	61 ± 4	88 ± 10
F1033	67 ± 9	76 ± 22
F2064	61 ± 18	67 ± 8
F2076	72 ± 1	104 ± 19

7. Genotipado de cepa

5 A) Métodos

Las cepas F1033, F2064 y F2076 fueron sometidas a un protocolo previamente descrito (Rodas A. M. et al., 2005) con ligeras modificaciones. Las cepas fueron cultivadas en placas de agar MRS e incubadas a 37 °C 5% CO₂ durante 18 h. Las células fueron recogidas y lavadas 3 veces en 8 ml de PET (10 mM Tris pH 7.6, 1 M NaCl) y después centrifugadas 10 min a 6000 rpm. Los pelets (precipitados) fueron resuspendidos en 700 ml de tampón de lisis (6 mM Tris, NaCl 1 M, EDTA 0.1 M, SLS 0.5%, ácido deoxicólico 0.2 %; 1 mg/ml lisozima; 40 U/ml mutanolisina; 20 mg/ml ARNasa). A las células resuspendidas se añadió un volumen igual de agarosa con bajo punto de fusión al 1.6% (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) y se dejó solidificar durante 1 h a 4 °C. Se transfirieron los insertos a 2 ml de tampón de lisis II (EDTA 0.5 M pH 9.2, N-lauril sarcosina 1% y pronasa 1 mg/ml) y se incubaron durante 48 h a 50 °C. Los insertos se lavaron a temperatura ambiente con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0). La digestión total del ADN se realizó por separado con enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I (Roche Diagnostics).

Se realizó una electroforesis de campo pulsante usando un equipo CHEF DRII (BioRad Laboratories). Los insertos se cargaron en un gel de agarosa 1% (SeaKem ME gel de agarosa, FMC BioProducts, ME, EEUU). Los marcadores de peso molecular de ADN fueron el Lambda ladder PFG Marker y el Low Range PFG Marker (New England Biolabs). Después de la electroforesis, los geles fueron impregnados con bromuro de etidio y luz UV usando GelDoc System (BioRad).

20 B) Resultados

La FIG. 1 muestra los perfiles de campo pulsante obtenidos. La cepa F1033 muestra un perfil de restricción genómica similar a *P. acidilactici* R1001 después de la digestión con Sma-1. Pese a esto, el perfil genómico obtenido después de la digestión con la enzima Not-I es claramente diferente. Por otro lado, los perfiles de restricción genómica de las cepas F2064 y F2076 son claramente diferentes entre ellos y también en comparación tanto con las cepas de *L. plantarum* 299v como con la cepa *L. plantarum* presente en la fórmula VSL#3.

8. Producción de ácidos grasos de cadena corta

A) Métodos

Las cepas fueron incubadas toda la noche (overnight) a 37 °C en condiciones microaerófilas (5% CO₂) en medio basal (ver Tabla 5) suplementado con diferentes fibras, cada una (inulina, pectina y FOS) en una cantidad específica. Posteriormente, las células fueron descartadas por centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron filtrados, congelados en nitrógeno líquido y conservados a -80 °C hasta su análisis por cromatografía de gases, centrándose en la cantidad de ácido acético, propiónico y butírico.

TABLA 5

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Peptona	2 g/l
Extracto de levadura	2 g/l
NaCl	0.1 g/l
K ₂ HPO ₄	0.04 g/l
KH ₂ PO ₄	0.04 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g/l
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g/l
NaHCO ₃	2 g/l
Hemina	0.05 g/l
HCl Cisteína	0.5 g/l
Sales biliares	0.5 g/l
Tween 80	2 g/l
Vitamina K1	10 µl
Inulina	10 g/l
Pectina	10 g/l
FOS	10 g/l

B) Resultados

5 Los ácidos grasos de cadena corta (AGCCs) son el producto final de la degradación de los carbohidratos en el intestino grueso por parte de las bacterias anaeróbicas. Los AGCCs, principalmente el acetato, el propionato y el butirato suponen aproximadamente el 80% de la concentración de aniones colónicos y son producidos en una relación molar constante de 62:22:15. Entre las diferentes propiedades, los AGCCs, especialmente el ácido butírico, pero también el acético y el propiónico, son fácilmente absorbidos por la mucosa intestinal, tienen un contenido calórico elevado, son metabolizados por colonocitos y hepatocitos, estimulan la absorción de sodio y agua en el

10 colon y son tróficos para la mucosa intestinal (D'Argenio G. et al., 1999). Por otro lado, es bien conocido que cantidades elevadas de ácido acético son irritantes en la mucosa intestinal (Yamada Y. et al., 1992). Las cepas F1033, F2064 y F2076 son buenas productoras de ácido acético, propiónico o butírico.

TABLA 6: Ácido acético, propiónico y butírico producidos por cepas cultivadas en un medio basal enriquecido con inulina, pectina y FOS.

Cepa	Acético (mg/ml)	Propiónico (mg/ml)	Butírico (mg/ml)
L. rhamnosus GG	n.d	n.d	7.7
F1033	n.d	n.d	21.4
F2064	n.d	30.2	9.7
F2076	46.5	n.d	n.d

15 (n.d.= no detectado)

9. Compatibilidad con tratamientos para ESS.

A) Método

- Se preparó un medio líquido suplementado disolviendo ácido 5-aminosalicílico (Pentasa®, Ferring Pharmaceuticals) a la máxima concentración soluble (0.84 g/l) y a la mitad de dicha concentración (0.42 g/l) en medio líquido MRS. Las cepas de la invención se cultivaron en medio líquido MRS estándar o medio líquido suplementado con ácido 5-aminosalicílico durante 4 h a 37 °C en condiciones microaerófilas (5% CO₂) y el crecimiento fue evaluado midiendo la densidad óptica a 620 nm. Los resultados se expresan como porcentaje de crecimiento en medio MRS estándar.

B) Resultados

- Normalmente, el tratamiento prolongado de los síntomas leves o moderados de EII se lleva a cabo con aminosalicilatos orales (derivados del 5-ASA) (Katz J. A., 2007). Por lo tanto, resulta interesante evaluar si las cepas probióticas de la invención pueden ser co-administradas con derivados del 5-ASA. Teniendo en cuenta que el crecimiento de ninguna de dichas cepas se inhibe completamente pese a las altas condiciones de astringencia, se puede concluir que es probable que la co-administración con mesalazina no comprometa la eficacia del probiótico, incluso usando concentraciones saturadas de mesalazina (0.84 g/l) como se muestra en la TABLA 7:

TABLA 7

	4 h (% de crecimiento)		8 h (% de crecimiento)	
	0.42 g/l	0.84 g/l	0.42 g/l	0.84 g /l
VSL#3	56.2	38.1	43.2	35.1
F1033	72.7	60.6	51.8	42.3
F2064	59.7	48.0	62.3	55.1
F2076	51.6	22.1	50.2	22.5

10. Efecto in vivo sobre la Inflamación del Intestino inducida químicamente.

A) Métodos

- El efecto terapéutico de la composición de la invención sobre la inflamación intestinal leve fue investigado con la administración oral repetida durante 5 días de dextrán sulfato sódico (DSS) en ratones (Okayasu I. et al., 1990). Cuando se usa en dosis bajas (2.5-3%) por un corto periodo de tiempo, el DSS produce una colitis leve, con inflamación intestinal leve a nivel histológico, pero sin cambios macroscópicos significativos (p.ej. acortamiento de colon, adherencias mesentéricas).

- Los síntomas externos incluyen pérdida de peso y diarrea, con rara ocurrencia de sangre en las heces. Por lo tanto, este modelo es representativo de una colitis ulcerativa de grado leve.

Las cepas F1033, F2064 y F2076 fueron liofilizadas en agua estéril con un 15% de leche desnatada y un 4% de sacarosa como crioprotectores y fueron mezcladas en cantidades iguales (relación de concentración 1:1:1).

- Ratones Balb/c de ocho semanas de edad (Charles River, Barcelona, España), de un peso entre 20-25 g, se mantuvieron en condiciones libres de patógenos (CLP) en una cámara de aislamiento (Harlan Iberica, Barcelona, España) a temperatura constante (22 °C) en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Se distribuyeron los ratones a razón de 2 por jaula. Tuvieron libre acceso a la dieta esterilizada (dieta estándar de laboratorio, Harlan Iberica, Barcelona, España) y a la bebida. Los ratones se mantuvieron 7 días en las instalaciones antes de empezar con los experimentos (cuarentena). Los ratones se distribuyeron en uno de los cuatro grupos siguientes: a) composición probiótica de la invención + DSS (n=8); b) VSL#3 (VSL Pharmaceutical, EEUU) + DSS (n=8); c) vehículo + DSS (n=8); y d) vehículo + controles sanos (n=6).

Los probióticos (o vehículos) fueron administrados por sonda durante los 10 días anteriores (día -10) a la administración de DSS (día 0). Cada ratón recibió diariamente 2.5×10^8 ufc de probiótico en 0.1 ml de agua destilada (vehículo) por sonda. Los ratones no tratados con probióticos recibieron el mismo volumen de vehículo (agua destilada con 15% de leche desnatada y 4% de sacarosa).

- Los ratones fueron alimentados con DSS al 3% (p/v) (peso molecular 40 kD, Applichem Lifescience, VWR, Barcelona) en el agua de bebida durante 5 días (de los días 0 al 4, seguido de tres días sin DSS) de acuerdo con el método descrito previamente (Okayasu I, et al. Gastroenterol 1990) con modificaciones menores. Los controles sanos nunca recibieron DSS.

Se monitorizaron los signos clínicos. El Índice de la Actividad de la Enfermedad (IAE) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula y tabla de interpretación:

$$\text{IAE} = \text{Puntuación}_{\text{Pérdida de peso}} + \text{Puntuación}_{\text{Sangre en las heces}} + \text{Puntuación}_{\text{Consistencia de las heces}}$$

Los resultados se muestran en la TABLA 8:

5 TABLA 8

Pérdida de peso	Puntuación	Sangre en las heces	Puntuación	Consistencia de las heces	Puntuación
< 1%	0	Ausencia	0	Con forma y dura	0
1 – 5%	1			Con forma pero blanda	1
5 – 10%	2	Presencia	2	Heces blandas	2
10 – 15%	3			Diarrea leve (acuosa)	3
> 15%	4	Sangrado grave	4	Diarrea grave	4

El Índice de Actividad de la Enfermedad usado aquí fue descrito por primera vez por Cooper et al. y combina varios síntomas clínicos en una puntuación normalizada (Cooper H. S. et al., 1993). La puntuación máxima son 12 puntos. Esta puntuación ha sido ampliamente usada para evaluar la eficacia de tratamientos experimentales, probióticos entre ellos, en modelos de EII (Fitzpatrick L. R. et al., 2007; Grabig A. et al., 2006; Sasaki M. et al., 2005).

Después de ser sacrificados por sobredosis de anestésico inhalado de halotano (Fluotane®, Zeneca Ltd, UK), se recogieron muestras de colon de los animales y se lavaron con PBS frío. Se apuntó la relación peso del colon/longitud. Las muestras para la determinación de citoquinas fueron congeladas en nitrógeno líquido y homogeneizadas con 1 mL de PBS frío con un cóctel inhibidor de proteína (Sigma-Aldrich Chem., España) y centrifugadas (15000 x g, 10 min). Las concentraciones de IL-6, IL-10, IL23p19, IFN- γ y TNF- α en los sobrenadantes colónicos se determinaron usando el Cytokine 6-Plex Assay (Procarta™ Cytokine Profiling Kit, PANOMICS, Spain) de la plataforma Luminex® (Luminex® Co, Austin, USA). Se incubaron micropartículas fluorescentes con anticuerpos específicos anti-citoquinas con 50 μ L de sobrenadante diluido 1:5. Se añadieron secuencialmente anticuerpos secundarios marcados específicamente con biotina; y estreptavidina-ficoeritrina (S-PE). Los resultados fueron expresados como pg de citoquina por mg de proteína (Quick Start Bradford Protein Assay, BIO-RAD, CA, EEUU). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

B) Resultados

Índice de Actividad de la Enfermedad (IAE)

Como se muestra en la FIG. 2, el grupo que recibió la fórmula probiótica de la invención mostró una mejora significativa de los síntomas clínicos en comparación con los tratados con DSS, en base al Índice de Actividad de la Enfermedad ($p < 0.05$, ANOVA de dos colas con test post-hoc de Tukey-Kramer). Los controles sanos también mostraron un Índice de Actividad de la Enfermedad inferior ($p < 0.05$).

Niveles de citoquinas

El análisis de varias citoquinas en la mucosa intestinal reveló que la fórmula probiótica de la invención disminuyó significativamente los niveles de IL-6 en comparación con los controles tratados con DSS ($p < 0.01$, ANOVA de dos colas con test post-hoc Tukey-Kramer), mientras que el efecto de la fórmula probiótica comercial VSL#3 no alcanzó la significación ($p > 0.05$). La IL-6 es un marcador de inflamación aguda (FIG. 3). Como cabe esperar, los niveles de IL-6 en los controles sanos fueron también significativamente más bajos a los controles tratados con DSS ($p < 0.05$). Se encontró una correlación estadísticamente significativa entre los síntomas clínicos (Puntuación IAE) y los niveles de IL-6 en la mucosa intestinal ($p < 0.05$, test de rangos de Spearman). Por otro parte, la correlación entre los síntomas clínicos e IL-10, IL-23, TNF α o IFN γ no fue estadísticamente significativa, y la formulación probiótica de la invención no afectó significativamente los niveles de estas citoquinas.

11. Efecto in vivo sobre la Inflamación Intestinal Espontánea

A) Métodos

También se investigaron los efectos terapéuticos de la fórmula probiótica de la invención en el modelo de ratones knock-out de IL-10. Este modelo desarrolla espontáneamente inflamación intestinal a las 8-12 semanas de edad, con una penetrancia del 80-90% (Scheinin T. et al., 2003). La interleuquina 10 (IL-10) es una citoquina reguladora importante que suprime las funciones efectoras de macrófagos/monocitos, células T-helper 1 (Th1) y células natural killer. Adicionalmente, la IL-10 aumenta la proliferación y diferenciación de células B. Los modelos murinos que no tienen el gen de IL-10 desarrollan espontáneamente la enfermedad inflamatoria intestinal y tumores gastrointestinales. La flora gastrointestinal se ha relacionado con la patogénesis de los estadios de dicha enfermedad ya que los animales germ free (sin flora intestinal) no desarrollan la enfermedad. El ratón knock-out de IL-10 ha sido ampliamente utilizado para evaluar nuevas opciones terapéuticas para EII.

Ratones C57B6J IL-10-deficientes o salvajes de seis semanas de edad Charles River, Barcelona, España) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos (en inglés "specific pathogen free", SPF) en una cámara de aislamiento (Harlan Ibérica, Barcelona, España) a temperatura constante (22°C) en ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones tuvieron libre acceso a dietas esterilizadas (dietas basadas en la AIN-93 para mantenimiento compuesta por un 12% de agua, 14.5% de proteína, 4% de grasa, 4.5% de fibra and 4.7% de cenizas; Harlan Interfauna Ibérica S.A., Barcelona, España) y a bebida.

Los ratones se distribuyeron en uno de los tres grupos: a) fórmula probiótica I.3.1 (n=12 IL-10^{-/-}; n=5 cepa salvaje); b) VSL#3 (n=12 IL-10^{-/-}; n=5 cepa salvaje); y c) vehículo (n=12 IL-10^{-/-}; n=5 cepa salvaje). Cada ratón en los grupos "a" y "b" recibió diariamente 10⁹ UFC de probiótico en agua de bebida esterilizada (vehículo). Los ratones no tratados con probiótico (grupo placebo) recibieron solo vehículo. Los probióticos (o el vehículo) fueron administrados durante diez semanas. Los signos clínicos fueron monitorizados diariamente. El Índice de Actividad de la Enfermedad (Cooper H. S. et al., 1993) fue calculado como en el modelo de inflamación intestinal inducido con DSS (ver más arriba).

Los ratones de dieciséis semanas de edad fueron sacrificados por sobredosis de anestésico por inhalación de halotano (Fluotane®, Zeneca Ltd, UK). Se recogieron las muestras de colon de los animales y se limpiaron con PBS frío. También se recogieron muestras de sangre por punción cardiaca para analizar el hematocrito y la concentración de hemoglobina (Analizador Coulter MaxM con autocarga, Izasa, España). Se registró la relación peso de colon/longitud. Posteriormente, los cólones fueron congelados con nitrógeno líquido y se determinaron las citoquinas IL-6 y IFN γ usando el mismo protocolo que para el modelo de inflamación inducida DSS (ver más arriba).

B) Resultados

Índice de Actividad de la Enfermedad

Como se muestra en la FIG. 4, se observó un retraso significativo en el comienzo de los síntomas clínicos en las grupos tratados con la composición de la invención y con la fórmula comercial VSL#3 en comparación con los controles tratados con vehículo ($p < 0.01$, ANOVA de dos colas con test post-hoc de Tukey-Kramer). Adicionalmente, los grupos tendieron a mostrar puntuaciones del Índice de Actividad de la Enfermedad inferiores, aunque las diferencias no alcanzaron la significación (resultados no mostrados).

Niveles de citoquinas

El análisis de varias citoquinas reveló que la composición probiótica de la invención disminuía significativamente los niveles de IFN γ en ratones knock-out en comparación tanto con los knock-outs tratados con vehículo ($p < 0.01$, para una ANOVA no paramétrica de dos colas con test post hoc de Dunn) como con los tratados con fórmula comercial VSL#3 ($p < 0.05$). De hecho, como se muestra en la FIG. 5, los niveles de IFN γ alcanzaron los mismos niveles que los controles salvajes sanos. Adicionalmente, como se deriva de la FIG. 6., también hubo una tendencia clara por parte de las fórmulas probióticas de reducir los niveles de IL-6, aunque el resultado no alcanzó la significación debido a la gran desviación entre los ratones knock-out tratados con vehículo.

Se encontró una correlación significativa entre la severidad de los síntomas clínicos (Índice de Actividad de la Enfermedad) y los niveles de IFN γ al final del estudio en la mucosa colónica determinados después del sacrificio ($p < 0.05$, test de rangos de Spearman) (resultados no mostrados).

Seguridad de la Fórmula Probiótica

Los signos clínicos (pérdida de peso, comportamiento alterado, aspecto del pelaje, diarrea y sangre en las heces) se monitorizaron diariamente en los animales salvajes que recibieron durante 10 semanas dosis diarias de la fórmula probiótica de la invención, la fórmula VSL#3 o el vehículo. No se detectaron signos de morbilidad durante el estudio. En el momento del sacrificio, se les realizó una necropsia macroscópica. El análisis de las cavidades mayores y los órganos no reveló ninguna alteración patológica (resultados no mostrados).

12. Eficacia In Vivo en sujetos con SII

A) Métodos

Diseño del estudio

Se realizó un estudio clínico multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para estudiar el efecto de la composición de la invención en pacientes con SII.

Se llenaron cápsulas de hidroximetilpropil celulosa con: (1) 150 mg de maltodextrina, (2) 5 mg de estearato de magnesio, (3) 5 mg de dióxido de silicio y (4) 200 mg de una mezcla 1:1:1 de las tres cepas de la invención (en una concentración de $5 \cdot 10^{10}$ ufc/cápsula). Adicionalmente se fabricó un placebo con la misma lista y cantidad de excipientes pero sin incluir la composición de la invención. El contenido de las cápsulas durante el estudio osciló entre $5 \cdot 10^{10}$ y $1 \cdot 10^{10}$ ufc.

Se reclutaron 33 pacientes elegibles de ambos sexos que cumplían el criterio de Rome III para síndrome de intestino irritable (Longstreth G. F. et al., 2006) y se distribuyeron aleatoriamente en uno de los siguientes tratamientos durante 6 semanas: a) la cápsula que incluía la composición de la invención una vez al día (n=18); y b) la cápsula placebo una vez al día (n=15). El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki para Estudios Clínicos y fue aprobado por el Comité Ético apropiado.

Evaluación de la eficacia

La finalidad principal de este estudio era evaluar el efecto global sobre la calidad de vida relacionada con la salud (de aquí en adelante referida como HRQOL) evaluada usando un cuestionario específico para SII: la versión española validada de los IBSQOL (Badia X. et al., 2000). Siguiendo las indicaciones de la Asociación Española de Gastroenterología, las puntuaciones fueron estandarizadas a una escala de 0-100. El objetivo secundario era la evaluación de la ansiedad relacionada con los sensaciones y síntomas gastrointestinales mediante un cuestionario validado del Índice de Sensibilidad Visceral (de aquí en adelante referida como "VSI") (Labus J. S. et al., 2004). Se pidió a los voluntarios que rellenaran estos cuestionarios en la línea base (día 1), en el día 21 y en el día 42. Los resultados fueron analizados según el criterio de intención de tratar. Los resultados se muestran en las FIGs. 7 y 8.

B) Resultados

Características basales

No hubo diferencias significativas evidentes entre los grupos en lo que se refiere a características basales, como se puede observar en la Tabla 9, indicando que los sujetos de ambos grupos eran comparables en relación a las variables evaluadas. Los grupos también fueron comparables en términos de parámetros bioquímicos estándar basales, parámetros antropométricos, edad y sexo.

TABLA 9: Puntuaciones a nivel basal para los dos grupos de tratamiento

Grupo	Cápsula incluyendo la composición de la invención (n=18)	Placebo (n=15)	Mejora en la Calidad de Vida relacionada con la Salud (FIG. 7)
		35	
IBSQOL	45.7 ± 7.9	48.2 ± 19.2	
VSI	34.9 ± 13.3	41.2 ± 11.8	

La composición de la invención mejoró significativamente la calidad de vida relacionada con la salud en comparación con el placebo cuando se evaluó tanto a los 21 como a los 42 días de tratamiento ($p < 0.05$, test-T). Por lo tanto, queda demostrado que la presente invención reduce significativamente la morbilidad y mejora la calidad de vida de sujetos con SII muy por encima del efecto placebo. El efecto positivo de la composición incluye malestar relacionado con la comida, ansiedad, interferencia con actividades diarias y alteraciones de los ciclos del sueño de los cuestionarios HRQOL. Las mejoras en estas escalas sugieren una reducción en el dolor abdominal, en el malestar y en las alteraciones de los hábitos intestinales. Dentro de nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se observa que una composición probiótica muestra un efecto significativo en la calidad de vida relacionada con la salud en pacientes con SII.

Mejora en el Índice de Sensibilidad Visceral (FIG. 8)

La composición de la presente invención redujo significativamente la sensibilidad visceral específica de síntomas gastrointestinales de sujetos con SII en comparación con el placebo. El efecto estuvo cerca de la significación tras 21 días de tratamiento, y fue claramente significativo después de 42 días de tratamiento ($p < 0.01$, test-T), confirmando de nuevo la utilidad de la composición de la presente invención en el tratamiento de SII. La mejora más

notoria se observó en los ítems del cuestionario relacionados con el malestar y la hinchazón abdominales. Particularmente, la TABLA 10 muestra el número de sujetos que reportaron una mejora significativa relacionada con la hinchazón y la distensión (definidas por el incremento de por lo menos dos puntos en comparación con la línea base en la escala de 6 puntos del cuestionario VSI que evalúa la ansiedad relacionada con la hinchazón y la distensión) al final del tratamiento. La diferencia entre los dos grupos es estadísticamente significativa ($p < 0.05$, test del exacto de Fisher).

TABLA 10. Efecto sobre la ansiedad relacionada con la hinchazón y la distensión abdominales, en base al cuestionario VSI, después de 42 días de tratamiento.

Ansiedad relacionada a la hinchazón y a la distensión	Cápsula que incluye la composición de la invención (n=18)	Placebo (n = 15)
Sujetos que reportan una mejora en comparación con la línea base	7	1
Sujetos que no reportan una mejora en comparación con la línea base	11	14

- 10 A partir de los resultados obtenidos se concluye en consecuencia que la composición de la invención es efectiva en el tratamiento de la distensión y la hinchazón abdominales.

13. Efecto sobre la Hinchazón Abdominal y Movimientos Intestinales Reducidos.

- 15 Una mujer de 25 años sufría de hinchazón abdominal crónica y motilidad intestinal alterada, reportando en ocasiones movimientos intestinales tan escasos como uno por semana. El diagnóstico reveló un estómago hipotónico e hipocinético, sin evidencia de otras alteraciones estructurales en el tracto gastrointestinal.

- 20 La paciente siguió un tratamiento de una cápsula por día (como las descritas en el ejemplo 12). Después de una semana de tratamiento la paciente reportó una reducción significativa de la hinchazón y la distensión abdominales y una normalización de los hábitos intestinales. Los síntomas reaparecieron tras cesar el tratamiento durante unos días. Después de retomar el tratamiento en forma de una cápsula cada dos días, la paciente reportó nuevamente un efecto notable y duradero tanto sobre la hinchazón como sobre los hábitos intestinales.

Este ejemplo sustenta el uso de la composición de la invención para el tratamiento de la hinchazón abdominal y la alteración de la motilidad intestinal en sujetos que no hayan sido clasificados como Síndrome de Intestino Irritable.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., et al. "Basic local alignment search tool", J. Mol. Biol., 1990, vol. 215, p. 403-410.
- 25 Anadón, A., et al. "Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human veterinary importance", The EFSA Journal, 2005, vol. 233, p. 1-12.
- Andreoletti, O., et al. "The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Question no: EFSA-Q-2008-006", The EFSA Journal, 2008, vol. 923, p. 1-48.
- 30 Araya, M., et al. (2002) Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food - Joint FAO/WHO Working Group. FAO/WHO, Ontario, Canada.
- Badia, X., et al. "Adaptación al español del cuestionario IBSQoL para la medición de la calidad de vida en pacientes con síndrome de intestino irritable.", Rev Esp Enferm Dig, 2000, vol. 92, p. 637-643.
- 35 Bories, G., et al. "Update on the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance", The EFSA Journal, 2008, vol. 732, p. 1-15.
- Collado, M., et al. "Probiotic Strains and Their Combination Inhibit In Vitro Adhesion of Pathogens to Pig Intestinal Mucosa", Current Microbiology, 2007, vol. 55, p. 260-265.
- Cooper, H.S., et al. "Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis", Lab Invest., 1993, vol. 69, p. 238-249.
- 40 D'Argenio, G. and Mazzacca, G. "Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer", Adv Exp Med Biol, 1999, vol. 472, p. 149-158.

- Daniel, C., et al. "Selecting Lactic Acid Bacteria for Their Safety and Functionality by Use of a Mouse Colitis Model", *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, vol. 72, p. 5799-5805.
- Dean, B.B., et al. "Impairment in work productivity and health-related quality of life in patients with IBS", *Am J Manag Care.*, 2005, vol. 11, p. S17-26.
- 5 Fitzpatrick, L.R., et al. "Effects of the probiotic formulation VSL#3 on colitis in weanling rats", *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 2007, vol. 44, p. 561-570.
- Fukumoto, S., et al. "Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, vol. 284, p. R1269-1276.
- 10 Grabig, A., et al. "Escherichia coli Strain Nissle 1917 Ameliorates Experimental Colitis via Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Pathways", *Infect. Immun.*, 2006, vol. 74, p. 4075-4082.
- Guarner, F. and Schaafsma, G.J. "Probiotics", *Int J Food Microbiol.*, 1998, vol. 39, p. 237-238.
- Jacobsen, C.N., et al. "Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of Lactobacillus spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans", *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, p. 4949-4956.
- 15 Katz, J., A. "Management of inflammatory bowel disease in adults", *Journal of Digestive Diseases*, 2007, vol. 8, p. 65-71.
- Labus, J.S., et al. "The Visceral Sensitivity Index: development and validation of a gastrointestinal symptom-specific anxiety scale", *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2004, vol. 20, p. 89-97.
- Longstreth, G.F., et al. "Functional Bowel Disorders", *Gastroenterology*, 2006, vol. 130, p. 1480-1491.
- 20 Maslowski, K.M., et al. "Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43", *Nature*, 2009, vol. 461, p. 1282-1286.
- Okayasu, I., et al. "A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mic", *Gastroenterology.*, 1990, vol. 98, p. 694-702.
- 25 Pathmakanthan, S., et al. "Lactobacillus plantarum 299: Beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon", *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2004, vol. 19, p. 166-173.
- Rezaie, A., et al. "Oxidative Stress and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: An Epiphenomenon or the Cause?", *Digestive Diseases and Sciences*, 2007, vol. 52, p. 2015-2021.
- Rodas, A.M., et al. "Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications", *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, vol. 55, p. 197-207.
- 30 Roessner, A., et al. "Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis", *Pathol Res Pract.*, 2008, vol. 204, p. 511-524.
- Sasaki, M., et al. "Reversal of experimental colitis disease activity in mice following administration of an adenoviral IL-10 vector", *Journal of Inflammation*, 2005, vol. 2, p. 13.
- 35 Scheinin, T., et al. "Validation of the interleukin-10 knockout mouse model of colitis: antitumour necrosis factor-antibodies suppress the progression of colitis.", *Clin Exp Immunol*, 2003, vol. 133, p. 38-43.
- Tazoe, H., et al. "Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions", *J Physiol Pharmacol.*, 2008, vol. 59, p. 251-262.
- Tedelind, S., et al. "Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease", *World J Gastroenterol.*, 2007, vol. 13, p. 2826-2832.
- 40 Vanhoutvin, S.A., et al. "The effects of butyrate enemas on visceral perception in healthy volunteers", *Neurogastroenterology & Motility*, 2009, vol. 21, p. 952-e976.
- Wang, Q., et al. "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy", *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, vol. 73, p. 5261-5267.
- 45 Weisburg, W.G., et al. "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *J. Bacteriol.*, 1991, vol. 173, p. 697-703.
- Yamada, Y., et al. "A comparative analysis of two models of colitis in rats", *Gastroenterology*, 1992, vol. 102, p. 1524-1534.

Zhang, L., et al. "Alive and Dead *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Tumor Necrosis Factor- α -Induced Interleukin-8 Production in Caco-2 Cells", *J. Nutr.*, 2005, vol. 135, p. 1752-1756.

WO96/29083

EP 554418

5 EP 415941

US 7195906

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> AB-Biotics S. A.	
5	<120> COMPOSICIÓN PROBIÓTICA PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DE LA INFLAMACIÓN DEL INTESTINO	
	<130> P1509EP00	
10	<160> 4	
	<170> PatentIn version 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador directo Eub27f	
	<400> 1	
	agagtttgat cctggctcag	20
25	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> cebador inverso Eub1492r	
	<400> 2	
35	ggttaccttg ttacgactt	19
	<210> 3	
	<211> 57	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo 357f	
45	<400> 3	
	cgcccgccgc gccccgcgcc cggcccgccg cccccgccc cctacgggag gcagcag	57
50	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> cebador inverso 907r	
	<400> 4	
60	ccgtcaattc cttgagttt	20

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una cantidad efectiva de *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485, y *Pediococcus acidilactici* CECT 7483.
2. Composición como se define en la reivindicación 1, para su uso como probiótico.
- 5 3. Composición como se define en la reivindicación 1, para su uso como medicamento.
4. Composición como se define en la reivindicación 1, para su uso como agente inmunomodulador.
5. Composición como se define en la reivindicación 1, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la inflamación del intestino.
- 10 6. Uso de la composición como se define en la reivindicación 1, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de la inflamación del intestino.
7. Composición según la reivindicación 5 o uso según la reivindicación 6, en la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal.
8. Composición según la reivindicación 1, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del síndrome del intestino irritable.
- 15 9. Composición según la reivindicación 1, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la distensión y la hinchazón abdominales.
10. Producto farmacéutico que comprende una cantidad efectiva de la composición como se define en la reivindicación 1, junto con cantidades apropiadas de excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 20 11. Producto veterinario que comprende una cantidad efectiva de la composición como se define en la reivindicación 1, junto con cantidades apropiadas de excipientes veterinariamente aceptables.
12. Producto comestible que comprende una cantidad efectiva de la composición como se define en la reivindicación 1, junto con cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.
13. Producto comestible según la reivindicación 12, que es un complemento alimenticio.
- 25 14. Cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 7484.
15. Cepa de *Lactobacillus plantarum* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 7485.
16. Cepa de *Pediococcus acidilactici* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número de acceso CECT 7483.
- 30 17. Método para obtener un mutante de *Lactobacillus plantarum* CECT 7484, *Lactobacillus plantarum* CECT 7485, o *Pediococcus acidilactici* CECT 7483, que comprende utilizar la cepa depositada como material de partida y aplicar mutagénesis, donde el mutante obtenido retiene o mejora las actividades anti-inflamatoria, inmunomoduladora, anti-SII o anti-hinchazón abdominal de las cepa depositada original.

FIG. 1

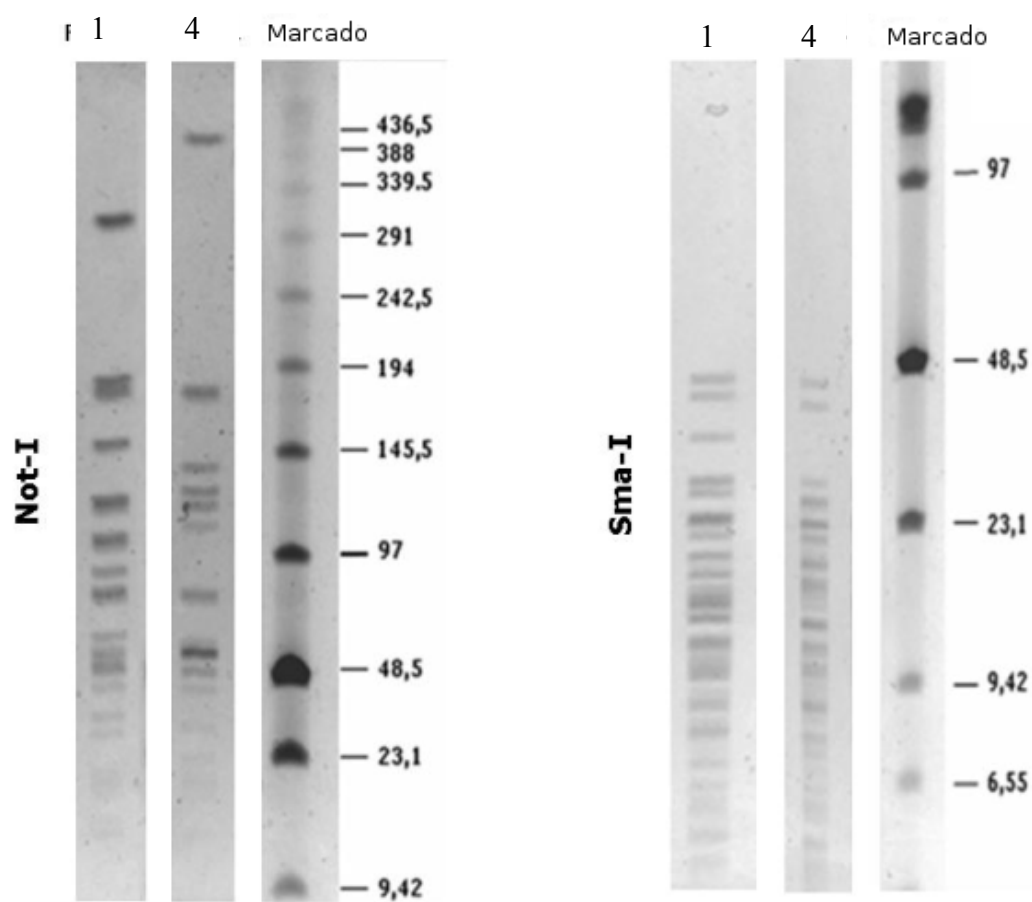


FIG. 1 (Continuación)

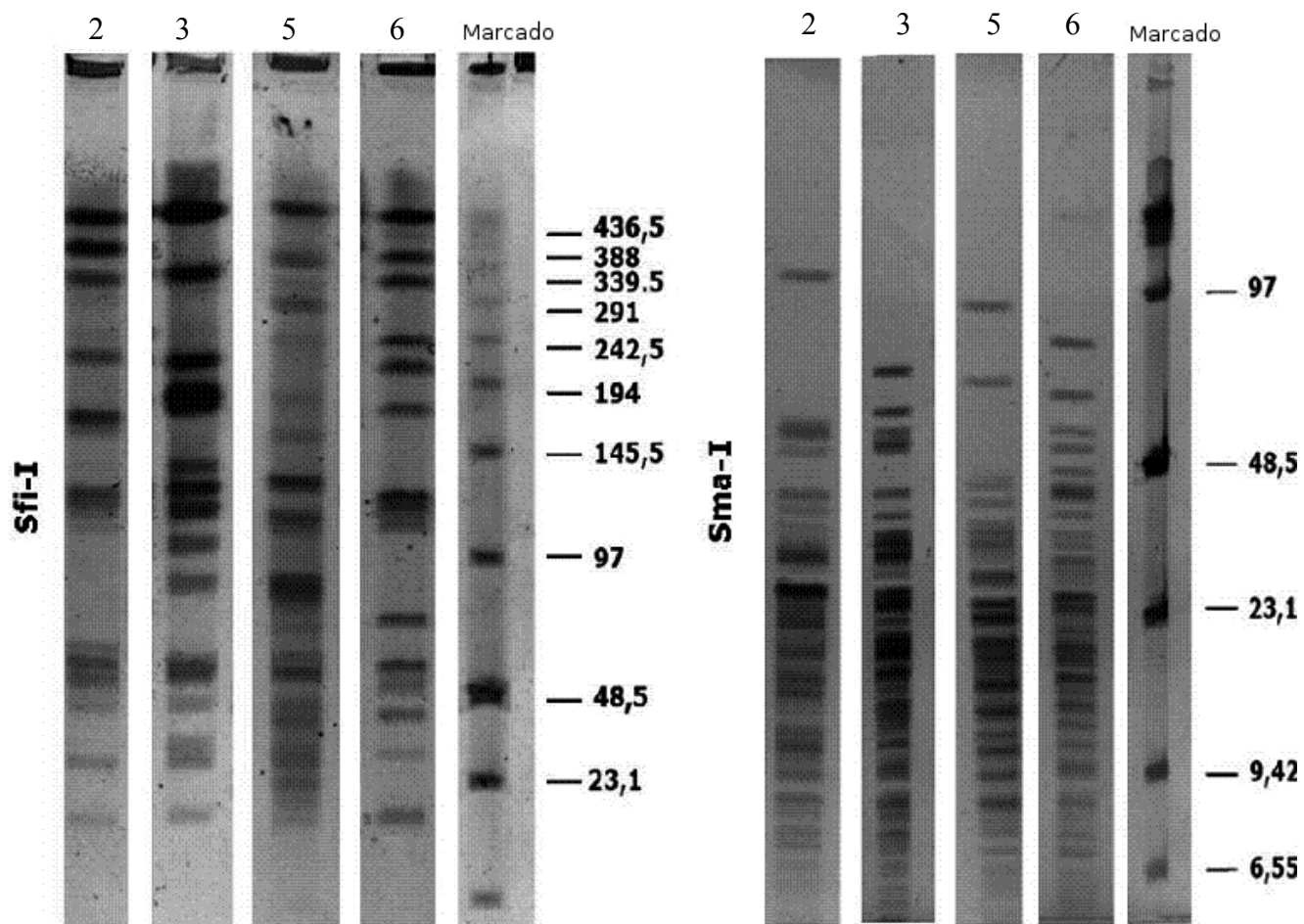


FIG. 2

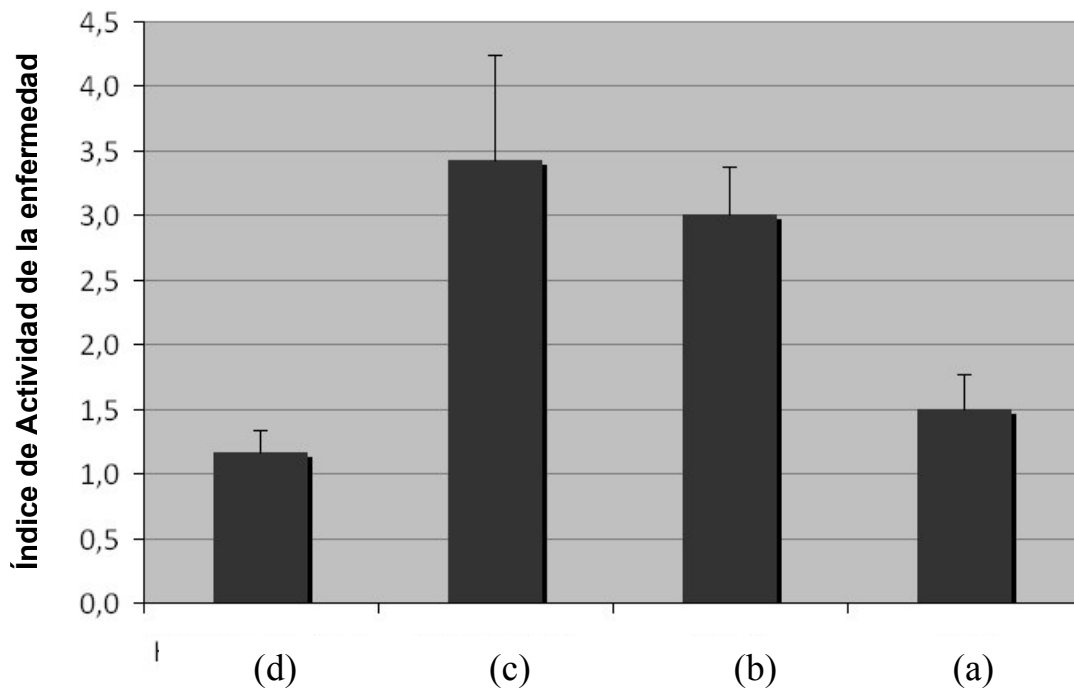


FIG. 3

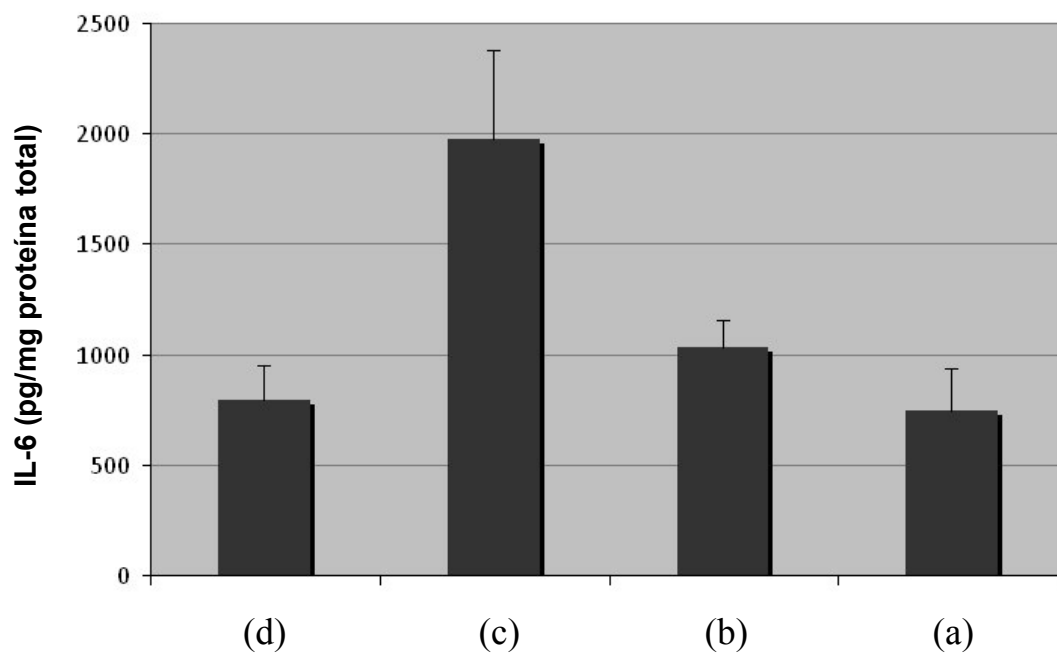


FIG. 4

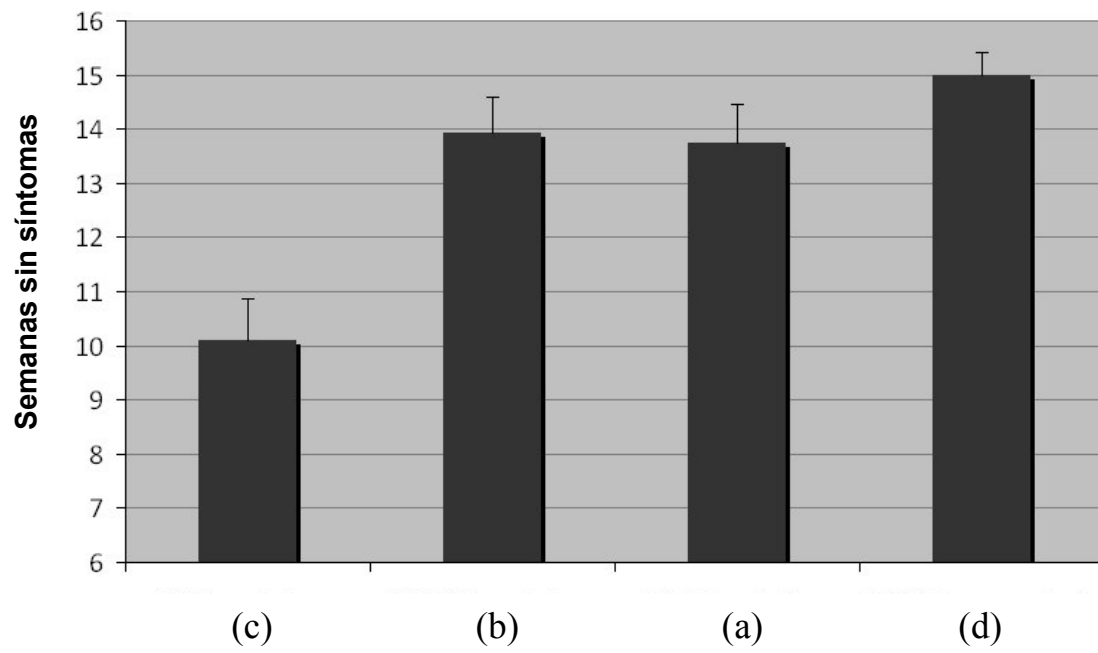


FIG. 5

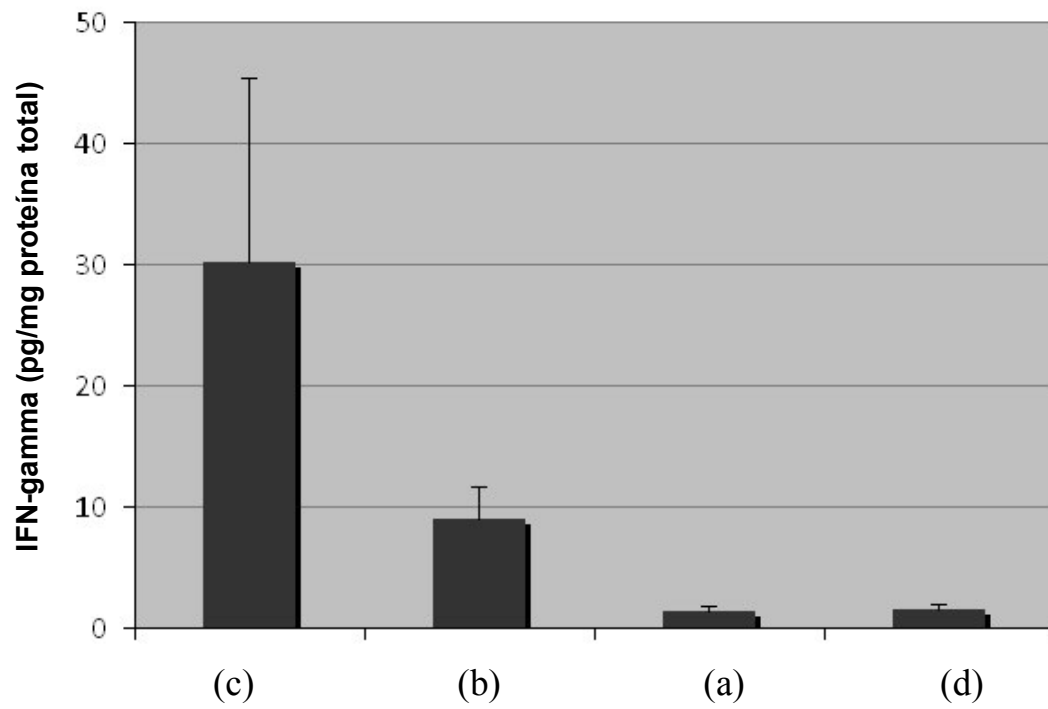


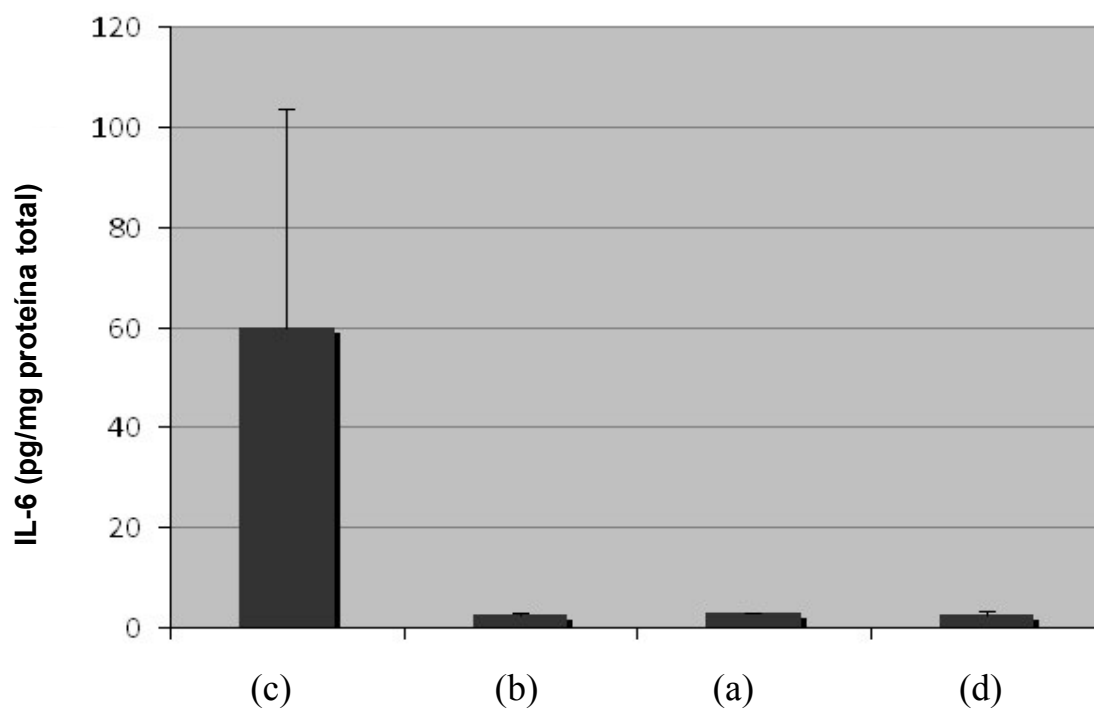
FIG. 6

FIG. 7

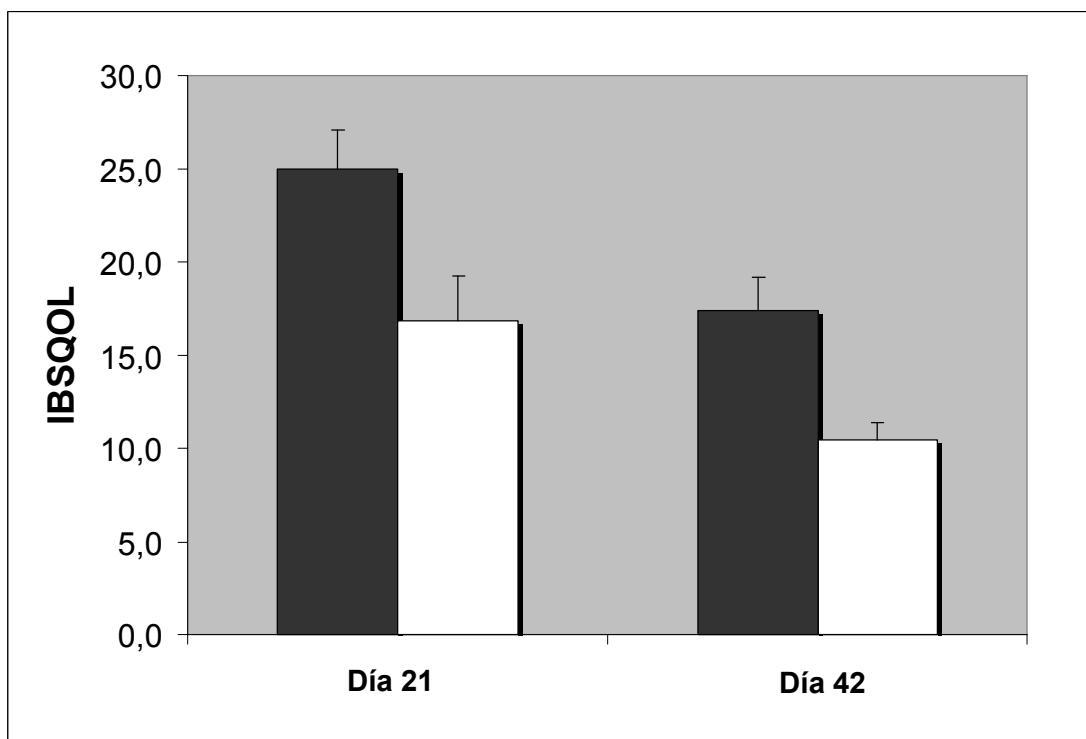


FIG. 8

