

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 326**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.05.2011 E 11727794 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2575834**

54 Título: **Cepas probióticas para su uso en mejorar la resistencia transepitelial**

30 Prioridad:

**28.05.2010 WO PCT/IB2010/001536**

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

**28.10.2014**

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)  
17, Boulevard Haussmann  
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LEGRAIN-RASPAUD, SOPHIE;  
GROMPONE, GIANFRANCO;  
CAPRONNIER, SANDRINE;  
CHAMBAUD, ISABELLE y  
LESIC, BILIANA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 514 326 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**

Cepas probióticas para su uso en mejorar la resistencia transepitelial

5 **Campo**

La presente solicitud se refiere a composiciones que comprenden cepas de bacterias ácido lácticas para su uso en mejorar la resistencia transepitelial. Tales composiciones son especialmente adecuadas para tratar y/o prevenir estreñimiento y/o enfermedad del intestino irritable.

10

**Antecedentes**

El síndrome del intestino irritable (SII) o colon espástico es un trastorno intestinal funcional caracterizado por dolor abdominal crónico, molestia, hinchazón y alteración de los hábitos intestinales en ausencia de cualquier causa orgánica detectable. Puede predominar la diarrea o el estreñimiento, o pueden alternarse (clasificada como SII-D, SII-E, respectivamente). El SII puede empezar después de una infección (post-infeccioso, SII-PI), un acontecimiento estresante en la vida o comienzo de la madurez sin ningún otro indicador médico. En SII, las pruebas clínicas rutinarias no dan anomalías, aunque los intestinos pueden ser más sensibles a ciertos estímulos, tales como la prueba de inflado de globo.

15

20

El SII es una afección muy común que afecta a aproximadamente el 15 % de la población en cualquier momento. Hay aproximadamente dos veces más mujeres que hombres con esta afección. El SII es una fuente de dolor crónico, fatiga y otros síntomas, y aumenta los costes médicos de un paciente, y contribuye al absentismo laboral. Los investigadores han informado de que la alta prevalencia del SII, conjuntamente con elevados costes, produce una enfermedad con un alto coste social. También se considera una enfermedad crónica y puede afectar espectacularmente la calidad de vida de una persona que la padece.

25

Aunque actualmente no hay cura para el SII, hay tratamientos que intentan aliviar síntomas, que incluyen ajustes dietéticos, medicación e intervenciones psicológicas.

30

Se informa que los probióticos, en particular cepas de bacterias ácido lácticas, son beneficiosos en el tratamiento y/o la prevención de SII. Ejemplos de tales divulgaciones son los documentos WO 2007/036230, WO 03/010297 y WO 2009/080800.

35

Cuando se produce la alteración de la barrera de la mucosa intestinal, hay una fuga de agua y proteína plasmática en la luz y translocalización de bacterias intestinales en la circulación sistémica. Estos factores contribuyen normalmente al desarrollo de inflamaciones locales o incluso peor de septicemia sistémica. El LipoPoliSacárido (LPS) bacteriano es conocido por producir hiperpermeabilidad de la mucosa *in vivo*. Se encontró que el LPS promovía la disfunción de la barrera intestinal mediante un mecanismo oxidativo y conducía a un aumento en la permeabilidad que puede evaluarse midiendo la diferencia de potencial observada desde los lados apical y basal de la monocapa, llamada la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Cada vez más pruebas sugieren que algunas bacterias probióticas y comensales mejoran la alteración de la barrera intestinal (disminuyendo la permeabilidad) *in vitro* (Resta-Lenert y Barrett, 2006; Miyauchi y col., 2008) e *in vivo*, y ayudan a aliviar síntomas de SII y EII. Se analizaron lactobacilos y bifidobacterias para esta propiedad (mediante evaluación de TEER). Surge de este estudio que el aumento de la resistencia de la barrera medido por TEER es dependiente de la cepa. Existe la necesidad de cepas adicionales que favorezcan la integridad de la barrera y/o disminuyan la permeabilidad, normalmente como se muestra por evaluaciones de TEER. Existe la necesidad de cepas que mejoren tales propiedades.

40

45

**Resumen de la invención**

50

La invención trata al menos una de las necesidades anteriores proporcionando una composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias para su uso en aumentar la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de células epiteliales intestinales, en la que dicha cepa está seleccionada del grupo que consiste en DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010).

55

La invención también se refiere a una composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010) para su uso en:

60

- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferentemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de la permeabilidad intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII, EII e infección intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de los trastornos anteriores encontrados en personas ancianas, niños o personas obesas.

65

La invención también se refiere a una composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010) para su uso en la administración a sujetos que padecen un trastorno seleccionado del grupo que consiste en EII y SII.

5 La invención también se refiere a una cepa de bacterias ácido lácticas seleccionada del grupo que consiste en DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010). La invención también se refiere a composiciones que comprenden una cepa tal.

10 Según un aspecto, la invención se refiere a una composición como se ha mencionado anteriormente para su uso en disminuir la permeabilidad intestinal.

### Descripción detallada

#### 15 Definiciones

En la presente solicitud, el uso de un compuesto o una composición pretende cubrir el propio uso, opcionalmente con la intención conectada, pero también cualquier comunicación asociada al compuesto o composición con consecuencias comerciales o legales, por ejemplo, publicidad, instrucciones o recomendación sobre el envase de las composiciones, instrucciones o recomendación en soporte comercial tal como prospectos, folletos, pósteres, documentación presentada en soporte a registros reglamentarios para fines de seguridad, fines de eficacia o protección del consumidor, por ejemplo, en administraciones tales como la EFSA en Europa.

25 En la presente solicitud, el término “o” no es excluyente.

#### 30 Cepas de bacterias

Las cepas de bacterias de la invención son lactobacilos o bifidobacterias, seleccionadas de DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010).

Todas las cepas bacterianas citadas en el presente documento se han depositado, según el Tratado de Budapest, ante la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, 25 rue du Docteur Roux, París) como autoridad depositaria internacional.

35 La presente invención también engloba el uso de las cepas anteriormente mencionadas, pero también cepas mutantes o cepas genéticamente transformadas derivadas de una cualquiera de las cepas parentales, que preferentemente todavía tienen actividad sobre TEER. Estas cepas mutantes o cepas genéticamente transformadas pueden ser cepas en las que se han mutado uno o más genes endógenos de la cepa parental, por ejemplo, para modificar alguna de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, su capacidad para fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia al transporte en el tubo gastrointestinal, su post-acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa parental por uno o más genes de interés, por ejemplo, con el fin de dar a dicha cepa características fisiológicas adicionales, o para permitir que exprese proteínas de interés terapéutico o para vacunas que se desean administrar mediante dichas cepas.

#### 45 Composiciones

En las composiciones de la invención, dichas cepas pueden usarse en forma de bacterias completas que pueden estar vivas o no. Alternativamente, pueden usarse en forma de un lisado bacteriano o en forma de fracciones bacterianas; las fracciones bacterianas adecuadas para este uso pueden elegirse, por ejemplo, probando sus propiedades sobre TEER. Preferentemente, las células bacterianas están presentes como células viables vivas.

50 Las composiciones de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para administración, en particular administración por vía oral. Esto incluye, por ejemplo, sólidos, semi-sólidos, líquidos y polvos. Las composiciones líquidas se prefieren generalmente para administración más fácil, por ejemplo, como bebidas.

La composición puede comprender, por ejemplo, al menos  $10^5$  ufc, preferentemente al menos  $10^6$  ufc, por g de peso seco, de al menos una cepa de bacterias, preferentemente de cepas de bacterias como se han mencionado anteriormente. Éstas se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias.

60 Si las bacterias están en forma de bacterias vivas, la composición puede comprender normalmente  $10^5$  a  $10^{13}$  unidades formadoras de colonias (ufc), preferentemente al menos  $10^6$  ufc, más preferentemente al menos  $10^7$  ufc, todavía más preferentemente al menos  $10^8$  ufc, y lo más preferentemente al menos  $10^9$  ufc por g de peso seco de la composición. En el caso de una composición líquida, esto se corresponde generalmente con  $10^4$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de colonias (ufc), preferentemente al menos  $10^5$  ufc, más preferentemente al menos  $10^6$  ufc, todavía más preferentemente al menos  $10^7$  ufc, y lo más preferentemente al menos  $10^9$  ufc/ml.

Ejemplos de las composiciones de la invención son composiciones nutricionales, que incluyen productos alimenticios y en particular productos lácteos.

5 La composición puede ser, por ejemplo, un producto lácteo, preferentemente un producto lácteo fermentado. La administración en forma de un producto lácteo fermentado tiene la ventaja adicional de bajos niveles de lactosa, que es adicionalmente beneficioso para el SII. Opcionalmente, pueden estar presentes otras cepas de bacterias ácido lácticas. El producto fermentado puede estar presente en forma de un líquido o presente en forma de un polvo seco obtenido secando el líquido fermentado. Preferentemente, el producto fermentado es un producto fresco. Un producto fresco, que no se ha sometido a etapas de tratamiento térmico extremo, tiene la ventaja de que las cepas bacterianas presentes están en la forma viva. Preferentemente, el producto fermentado es un producto lácteo, más preferentemente leche fermentada y/o suero de la leche fermentado. Preferentemente, la composición nutricional es un yogurt, o una leche fermentada en forma cuajada, batida o bebible. Preferentemente, el producto fermentado es un queso. Preferentemente, el producto fermentado es una verdura fermentada, tal como soja fermentada, cereales y/o frutas en formas cuajadas, batidas o bebibles.

15 Preferentemente, la presente composición nutricional es un alimento infantil, una leche de inicio o una leche de continuación. Preferentemente, la presente composición es un producto nutricional o farmacéutico, un suplemento nutricional o alimento médico.

20 Las composiciones nutricionales de la invención también incluyen complementos alimenticios, y alimento funcional. Un "complemento alimenticio" designa un producto preparado a partir de compuestos normalmente usados en alimentos, pero que está en forma de comprimidos, polvo, cápsulas, poción o cualquier otra forma normalmente no asociada a alimentos, y que tiene efectos beneficiosos para la salud. Un "alimento funcional" es un alimento que también tiene efectos beneficiosos para la salud. En particular, los complementos alimenticios y el alimento funcional pueden tener un efecto fisiológico - protector o curativo - contra una enfermedad, por ejemplo, contra una enfermedad crónica.

**EJEMPLO 1- EVALUACIONES DE TEER DE ALGUNAS CEPAS DE BACTERIAS**

30 Las suspensiones de cultivo se lavaron con PBS. Posteriormente, se añadieron las bacterias (100 ufc/ célula) al lado apical de las monocapas de células T84. Se probaron 96 cepas en el ensayo, que incluyen 64 bifidobacterias y 32 lactobacilos. Después de 2 h de incubación se añadió LPS (L4516, - EPEC - 0127: B8) sobre el lado apical a 40 ng/ml o no se añadió. Entonces, después de 2 h y 4 h de incubación, el valor de TEER se midió para evaluar la función de la barrera epitelial. Todos los experimentos se realizaron tres veces independientemente y por triplicado en presencia y en ausencia de LPS. El valor de T84 a t=0 se fijó al 100 %. En ausencia de LPS, TEER en T4 fue el 98,7 % y en T6 el 100,2 %. En presencia de LPS, T84 de control en T4 fue el 56,2% en comparación con t=0; en T6 el control de T84 fue el 46,7 %.

40 Los resultados mostraron que las cepas que aumentan significativamente la integridad epitelial como se mide por TEER tanto en presencia como en ausencia de LPS dañino fueron muy raras. Se identificó que una *L. rhamnosus*, DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010), además de una *B. bifidum*, DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010), presentaron propiedades de TEER mejoradas. Puntos de referencia tales como NCC2705 y BB536 no mostraron mejoras significativas.

45 Tabla 1: Resultados de TEER de bacterias seleccionadas que muestran los mejores resultados (en condiciones dañinas)

Cepa		TEER T4/TEER T0 en condiciones dañinas (LPS)		TEER T6/TEER T0 en condiciones dañinas (LPS)	
		Significancia	Media empírica	Significancia	Media empírica
Control de T84			56,20		46,76
DN_116_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>L. rhamnosus</i>	**	56,25	**	55,36
NCC2705 (descrita en el documento US 7183101)	<i>B. longum</i>	No significativo	56,25	No significativo	43,8
BB536	<i>B. longum</i>	***	50,59	*	42,02
DN_154_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>B. bifidum</i>	***	85,04	***	75,40

\*\*\* valor de p < 0,01; \*\* valor de p < 0,05; \* valor < 0,1

Tabla 2: Resultados de TEER de bacterias seleccionadas que muestran los mejores resultados (en condiciones no dañinas)

Cepa		TEER T6 / TEER T0 en condiciones no dañinas (sin LPS)	
		Significancia	Media empírica
T84			100
DN_116_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>L. rhamnosus</i>	***	110
DN_154_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>B. bifidum</i>	***	134
*** valor de $p < 0,05$			

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias para su uso en el aumento de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de células epiteliales intestinales, en la que dicha cepa está seleccionada del grupo que consiste en DN\_116\_0044 (CNCM 1-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010).
- 10 2. Composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010) para su uso en:
- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferentemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de la permeabilidad intestinal, o
  - 15 - tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII, EII e infección intestinal.
- 20 3. Composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010) para su uso en la administración a sujetos que padecen un trastorno seleccionado del grupo que consiste en EII y SII.
- 25 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en disminuir la permeabilidad intestinal.
5. Cepa de bacterias ácido lácticas seleccionada del grupo que consiste en DN\_116\_0044 (CNCM I-4316 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN\_154\_0062 (CNCM I-4319 presentada el 19 de mayo de 2010).
- 30 6. Composición que comprende al menos una cepa de la reivindicación 5.
7. Composición o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6, en la que la composición es un producto lácteo, preferentemente un producto lácteo fermentado.
- 35 8. Composición o composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 o 7, en la que la composición comprende al menos  $10^5$  ufc, preferentemente al menos  $10^6$  ufc, de al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias, por g de peso seco.
9. Composición según la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de dichos trastornos en personas ancianas, niños o personas obesas.