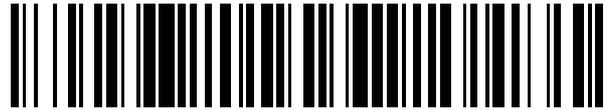


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 578**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2010 E 10813085 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2651423**

54 Título: **Cepas de Lactococcus lactis para uso en la mejora del estado digestivo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LESIC, BILIANA y
CHAMBAUD, ISABELLE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 557 578 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 de *Lactococcus lactis* para uso en la mejora del estado digestivo

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una bacteria de ácido láctico para uso en la mejora de un estado digestivo. En particular, dichas composiciones comprenden una cepa de *Lactococcus lactis* adecuada para tratar y/o prevenir trastornos digestivos.

Las infecciones gastrointestinales son sumamente comunes en todo el mundo. En la gran mayoría de las personas afectadas se produce rápidamente una recuperación completa. Sin embargo, una proporción sustancial de pacientes que padecen gastroenteritis desarrollan síntomas gastrointestinales de larga duración, tal como el síndrome del intestino irritable (SII). De hecho, se estima que del 3,7 al 36% de los individuos desarrollan SII después de gastroenteritis bacteriana o viral (Spiller and Garsed, 2009).

Las infecciones gastrointestinales se encuentran también entre las causas más frecuentes de diarrea. En casos graves, la infección que provoca la diarrea puede causar además inflamación gástrica.

Las infecciones gastrointestinales incluyen también la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), que se denominan colectivamente enfermedades inflamatorias intestinales (EII).

15 Síndrome del intestino irritable (SII)

El SII es un trastorno funcional crónico del colon que se caracteriza por diarrea o estreñimiento, dolor abdominal, distensión abdominal o meteorismo y paso de mocos a las heces.

Se sabe que la inflamación y la infección desempeñan un papel en la generación del SII (Ohman and Simren, 2010). Se observó que la familia de las enterobacterias era más abundante en sujetos con SII en comparación con sujetos sanos (Si *et al.*, 2004). Sin embargo, esta observación no se repitió en otros estudios (Malinen *et al.*, 2005), lo que indicaba que en el caso en el que las bacterias enterobacterias desempeñen un papel en la patogénesis del SII, no es el único factor. Además, se ha demostrado que los sujetos con SII albergan más *Escherichia coli* enteroagregativa (es decir, cepas patógenas de *Escherichia coli*) que los sujetos sanos (Sobieszczanska *et al.*, 2006).

Aunque sólo existe relación entre la cantidad de enterobacterias y el subgrupo de SII, cada vez hay más pruebas de que los miembros de la familia de enterobacterias pueden desencadenar el SII en el caso del SII postinfeccioso (SII-PI) (Ji *et al.*, 2005; Marshall *et al.*, 2010 y Thabane *et al.*, 2010). En estos estudios, se demostró que los sujetos que padecen gastroenteritis causada por las bacterias enterobacterias (*Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Shigella*) presentaron un mayor riesgo de tener SII.

Puesto que recientemente se sugirió que la activación inmunitaria era una patofisiología putativa causa del SII, los investigadores comenzaron a evaluar el uso de agentes anti-inflamatorios como tratamiento del SII (Camilleri, 2010). Por ejemplo, el agente anti-inflamatorio mesalamina mostró resultados muy prometedores en los sujetos con SII (Corinaldesi *et al.*, 2009). En este estudio, se demostró que la mesalamina aliviaba los síntomas del SII mejorando el bienestar general.

Además, está documentado que los probióticos, en particular las cepas de bacterias de ácido láctico, son beneficiosos en el tratamiento y/o prevención del SII. Ejemplos de dichas cepas están descritos en las solicitudes internacionales WO 2007/036230, WO 03/010297 y WO 2009/080800.

Síndrome del intestino irritable postinfeccioso (SII-PI)

El SII-PI es un subgrupo del síndrome del intestino irritable que se desarrolla después de una infección gastrointestinal.

El SII-PI ha sido documentado principalmente en Europa, particularmente en el Reino Unido. No obstante, dos estudios recientes, uno de China y otro de Corea, han documentado que el SII-PI también se da en los países del este con una prevalencia similar a la encontrada en los países occidentales.

En la mayoría de los estudios se han identificado las bacterias patógenas como factores etiológicos implicados en el desarrollo del SII-PI. Las enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Shigella* y *Campylobacter*, estaban entre las bacterias más frecuentemente aisladas. Potencialmente, podrían estar implicadas otras bacterias causantes de la gastroenteritis, tales como *Listeria* o *E. coli* patógena. Estudios recientes indican que también pueden estar implicados otros agentes infecciosos, incluyendo virus (por ejemplo, rotavirus, adenovirus, calcivirus) y parásitos (*Giardia lamblia*, *Blas-tocystis hominis*). Una hipótesis es que la reducción de la incidencia de infecciones intestinales podría reducir en general la incidencia del SII-PI y posiblemente la gravedad de los síntomas del SII-PI.

El mecanismo subyacente del SII-PI no ha sido identificado claramente. Se ha prestado especial atención al papel de la inflamación leve en curso. Spiller and Garsed (2009) encontraron un mayor número de linfocitos intraepiteliales, linfocitos T de la lámina propia, mastocitos y macrófagos positivos a la calprotectina que no pudieron ser eliminados en pacientes que desarrollan SII-PI. Pocas cepas probióticas han demostrado tener propiedades anti-inflamatorias.

El revestimiento epitelial del intestino, que comprende células epiteliales y uniones fuertes, es semipermeable, permite el paso de partículas pequeñas y está implicado en el mantenimiento de la función barrera de la mucosa. Estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que un sistema inmunitario intestinal activado en SII-PI es el resultado de una elevada exposición al antígeno local asociada a un aumento de la permeabilidad de la capa epitelial intestinal. Los pacientes con SII-PI tienen aumentada la permeabilidad en comparación con los sujetos sanos. La disminución de la permeabilidad intestinal podría beneficiar directamente a los síntomas del SII-PI. Aunque varios estudios han mostrado que varias cepas de especies de lactobacilos son capaces de aumentar la integridad de la barrera epitelial, no hay pruebas directas de que cepas de *L. lactis* tengan propiedades similares. En contraste, hay pruebas de que cepas de *L. lactis* modificadas genéticamente pueden ser perjudiciales para el epitelio (Shao and Kaushal, 2004).

10 Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La EII es cualquiera de las dos enfermedades inflamatorias del intestino: la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son trastornos crónicos, idiopáticos mediados inmunológicamente, con influencias genéticas y medioambientales (factores), especialmente influencias microbianas. La enfermedad de Crohn está asociada con frecuencia a diarrea, cólico y pérdida de apetito y de peso con abscesos locales y cicatrización. La colitis ulcerosa está asociada también a diarrea, pero con secreción de mucosidad y sangre, dolor abdominal de tipo cólico, e inflamación y edema de la membrana mucosa con parches de ulceración. La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se producen preferiblemente en zonas con las mayores concentraciones de bacterias predominantemente anaerobias en el íleon distal y colon. Las respuestas serológicas a antígenos microbianos están presentes en el 80% de los pacientes con enfermedad de Crohn y los altos títulos de serologías antibacterianas están asociados a la enfermedad grave (Mow *et al.*, 2004).

Una continua controversia en la enfermedad de Crohn es si un agente patógeno es responsable de la naturaleza recurrente crónica de la respuesta inflamatoria. Numerosas pruebas recientes implican cepas de *E. coli* funcionalmente anómalas (pertenecientes a enterobacterias) en la patogénesis de la enfermedad de Crohn (Sartor, 2008). *E. coli* adherentes/invasivas (ECAI) se adhieren a las células epiteliales y las invaden y persisten dentro de las células epiteliales y los macrófagos intestinales (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998). Los factores de virulencia y los mecanismos moleculares que promueven la adherencia epitelial, la invasión y la persistencia están siendo dilucidado por estudios *in vitro* (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998 y Baumgart *et al.*, 2007).

Un área activa de investigación de la EII evalúa la posibilidad de disbiosis, que es la composición o función microbiana anómala, como causa de la inflamación intestinal crónica. La disbiosis puede inducir una inflamación intestinal por diversos mecanismos (Sartor, 2009). La producción defectuosa de butirato y otros ácidos grasos de cadena corta podría afectar profundamente la función epitelial del colon y las características de barrera de la mucosa. El equilibrio relativo entre las bacterias beneficiosas y las perjudiciales puede ser crucial para la inducción de la inflamación frente a la homeostasis de la mucosa. La capacidad de la microbiota entérica para producir metabolitos tóxicos puede estar relacionada con la patogénesis de la colitis ulcerosa. Las bacterias intestinales pueden producir también especies de oxígeno reactivo que pueden causar lesiones tisulares, particularmente en un hospedante con degradación defectuosa de metabolitos de oxígeno.

Varios estudios han documentado marcadas alteraciones en la microbiota intestinal de pacientes con EII (Peterson *et al.*, 2008). Se ha demostrado por técnicas moleculares, una contracción de cierta población bacteriana en la EII, especialmente subconjuntos clostridiales, y la expansión de otros, incluyendo enterobacterias (Sartor, 2009). Swidsinski *et al.* (2009) han observado un mayor nivel de enterobacterias en la microbiota de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

Sin embargo, la definición de las características microbianas asociadas o que inician la EII se complica por la genética del hospedante, el estado de inflamación y la dieta (Peterson *et al.*, 2008). No ha sido posible diseñar estudios prospectivos en la EII humana para identificar las comunidades microbianas que instigan la inflamación, incluso en poblaciones genéticamente sensibles.

En consecuencia, en los últimos años, se han desarrollado varios modelos de muridos con inflamación intestinal crónica que se asemeja a la EII, y han proporcionado información sobre la EII y la desregulación de la microbiota. Una variedad de modelos de ratón con EII, incluyendo animales con defectos genéticamente modificados en su sistema inmunitario o sus glicanos de la mucosa, que han sido criados convencionalmente con una microbiota y luego tratados con antibióticos, o que han sido criados libre de gérmenes y luego colonizados con una microbiota intestinal de un donante sano, demuestran que la presencia de una microbiota es instrumental en la provocación de la patología (Garrett *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008 y Sartor, 2008). Es importante destacar que aunque los modelos de roedores con colitis dependen generalmente de la presencia de microbios intestinales, no todos los microbios provocan la enfermedad (Kim *et al.*, 2007). Estudios en modelos animales demuestran que algunas cepas bacterianas son perjudiciales, mientras que otras tienen efectos protectores, y muchas no son ni agresivas ni beneficiosas (Sartor, 2009).

El grupo de L. Glimcher ha desarrollado un modelo de ratón resistente con colitis ulcerosa cuyas características patológicas y respuesta al tratamiento con anti-TNF se parecen mucho a la enfermedad en seres humanos. Encontraron que la deficiencia de un gen regulador particular en el sistema inmunitario innato (resultante de una doble desactivación de los genes *T-bet* y *RAG2*; denominado TRUC para colitis ulcerosa T-bet RAG2) dio como resultado una colitis ulcerosa

agresiva, espontánea y contagiosa y mayor sensibilidad a la colitis en hospedantes inmunológicamente intactos (Garrett *et al.*, 2007).

5 Estos resultados *in vivo* están de acuerdo con la observación clínica: las especies *Klebsiella* y *Proteus* se observan más frecuentemente en las heces de pacientes con colitis ulcerosa que en las de los sujetos sanos (Dorofeyev *et al.*, 2009). También hay numerosos documentos de títulos elevados de anticuerpos contra las enterobacterias en pacientes con EII (Cooper *et al.*, 1988; Ibbotson *et al.*, 1987 y Tiwana *et al.*, 1998).

En conclusión, el equilibrio entre las especies bacterianas beneficiosas y perjudiciales determina la homeostasis frente a la inflamación. Se demostró la implicación de enterobacterias en estos mecanismos. Este equilibrio puede ser manipulado en particular con probióticos para tratar y prevenir las recaídas de la EII.

10 También se ha demostrado que durante períodos activos de la EII, la inflamación del tracto gastrointestinal provoca un aumento de la permeabilidad del epitelio, lo que conduce a un deterioro de la función de barrera del epitelio (Madsen *et al.*, 2001).

15 El uso de productos químicos anti-inflamatorios (también llamados biológicos) para tratar las enfermedades inflamatorias intestinales aumentó últimamente y ahora la utilizan actualmente en el cuidado de la EII los gastroenterólogos y médicos (para revisión: Bosani *et al.*, 2009). Alternativamente, los probióticos se utilizaron para aliviar la EII y se sugirió que los mecanismos anti-inflamatorios eran mecanismos de acción (Vanderpool *et al.*, 2008).

Además, cada vez más pruebas sugieren que algunas bacterias probióticas y comensales mejoran el deterioro de la barrera intestinal (disminuyendo su permeabilidad) *in vitro* (Resta-Lenert and Barrett, 2006 y Miyauchi *et al.*, 2008) e *in vivo*, y ayudan a aliviar los síntomas del SII y la EII.

20 Se desprende de lo anterior que los agentes patógenos pueden provocar infecciones gastrointestinales (incluyendo SII, SII-PI y EII) y que los compuestos o probióticos que tienen actividad anti-patogénica pueden prevenir y/o tratar estos trastornos. Además la integridad de la barrera epitelial asociada a una actividad anti-patogénica puede evitar más inflamaciones.

25 Las bacterias *Lactococcus lactis* son bacterias de ácido láctico que se encuentran comúnmente en los productos lácteos, tales como queso o productos lácteos fermentados (incluyendo yogures). Se ha descrito que algunas bacterias *Lactococcus lactis* tienen una actividad contra enterobacterias patógenas, tales como *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* (Olasupo *et al.*, 2003; Gänzle *et al.*, 1999).

30 Los inventores han demostrado *in vitro* que dos cepas de *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, es decir las cepas DN 030066 y DN 030087, mejoran la integridad de la barrera epitelial en comparación con las cepas de bacterias conocidas por sus propiedades anti-inflamatorias, y además que la cepa DN 030066 tiene una excelente actividad antimicrobiana en comparación con las cepas conocidas por su actividad antimicrobiana.

La cepa DN 030066 fue depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 Rue du Docteur Roux, París) el 24 de octubre de 1995, con el número I-1631. Esta cepa está descrita en la solicitud internacional WO 97/16529.

35 La cepa CNCM I-1631 tiene las siguientes características:
 - Morfología: microorganismo gram-positivo, principalmente diplococos de pequeño tamaño
 - Fermentación de los siguientes azúcares (resultados obtenidos en una tira API 50 CH - medio API MRS a 30°C durante 48 horas): ribosa, galactosa, glucosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, trehalosa, almidón, β-gentiobiosa.

40 La cepa DN 030087 fue depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 Rue du Docteur Roux, París) el 19 de febrero de 2002, con el número I-2807.

La cepa CNCM I-2807 tiene las siguientes características:
 - Morfología: microorganismos gram-positivos, principalmente diplococos de pequeño tamaño
 - Fermentación de los azúcares siguientes (resultados obtenidos en una tira API 50 CH - medio API MRS a 37°C durante 72 horas): ribosa, galactosa, glucosa, manosa, manitol, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, trehalosa, almidón, β-gentiobiosa.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una cepa de *Lactococcus lactis* seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN 030066 (CNCM I-1631) y DN 030087 (CNCM I-2807) para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno digestivo.

50 En una realización, dicho uso es para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno, preferiblemente una enterobacteria patógena, y/o mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal.

Dicho microorganismo patógeno se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en el género *Escherichia*, *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Proteus* (por ejemplo, *P. mirabilis*) y *Klebsiella*, preferiblemente del grupo que consiste en las especies *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. enteritidis*.

Dicho trastorno digestivo puede ser, en particular, malestar gástrico o intestinal; infección gástrica o intestinal; diarrea; estreñimiento; SII; SII-PI o EII (es decir, enfermedad de Crohn y/o colitis ulcerosa).

5 La presente invención proporciona también una cepa mutante de *Lactococcus lactis* obtenida de la cepa DN 030066 o de la cepa DN 030087 por su mutagénesis o transformación genética, para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno, preferiblemente una enterobacteria patógena, y/o mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal, en el tratamiento o prevención de un trastorno digestivo, como se ha definido anteriormente.

10 Dicha cepa mutante de *Lactococcus lactis* se puede obtener por mutación de uno o más genes endógenos de la cepa DN 030066 o de la cepa DN 030087, por ejemplo con el fin de modificar algunas de sus propiedades (por ejemplo, su capacidad para fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia en el transporte por el tracto gastrointestinal o su postacidificación). Puede ser también una cepa mutante que resulte de la transformación genética de la cepa DN 030066 o de la cepa DN 030087 por uno o más genes de interés, por ejemplo con el fin de conferir a dicha cepa características fisiológicas adicionales.

Dichas cepas se pueden utilizar en forma de bacterias enteras que pueden estar muertas o vivas, preferiblemente vivas.

15 La presente invención proporciona también una composición que comprende:
 - una cepa de *Lactococcus lactis* seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN 030066 (CNCM I-1631) y DN 030087 (CNCM I-2807) como se ha definido anteriormente, o
 - una cepa mutante de *Lactococcus lactis* como se ha definido anteriormente
 20 para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno, preferiblemente una enterobacteria patógena, y/o mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal, para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno digestivo, como se ha definido anteriormente.

Dicha composición puede comprender al menos otra cepa de *Lactococcus lactis* diferente de las cepas definidas anteriormente y/o al menos una bacteria de ácido láctico de una especie diferente de *Lactococcus lactis*, tales como bacterias de ácido láctico del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*.

25 Dicha composición puede estar en cualquier forma adecuada para su administración, en particular para administración oral. Dicha forma incluye, por ejemplo, sólidos, semisólidos, líquidos y polvos. Generalmente se prefiere una composición líquida para su administración más fácil, por ejemplo, como bebidas.

30 Dicha composición puede comprender de 10^5 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc) de al menos una cepa de *L. lactis* o cepa mutante de *L. lactis* como se ha definido anteriormente, preferiblemente al menos 10^6 ufc, más preferiblemente al menos 10^7 ufc, incluso más preferiblemente al menos 10^8 ufc, y lo más preferiblemente al menos 10^9 ufc por gramo de peso seco de la composición. En el caso de una composición líquida, esto corresponde generalmente de 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos 10^5 ufc, más preferiblemente al menos 10^6 ufc, incluso más preferiblemente al menos 10^7 ufc, y lo más preferiblemente al menos 10^9 ufc/mL.

Dicha composición puede ser un producto alimenticio o un producto farmacéutico.

35 Dicha composición también puede ser un producto lácteo o un producto fermentado, preferiblemente un producto lácteo fermentado, tal como un producto de leche fermentada o producto de suero de leche fermentado.

El producto fermentado puede estar presente en forma de un líquido o presente en forma de un polvo seco obtenido secando el líquido fermentado.

40 La administración en forma de un producto lácteo fermentado tiene la ventaja adicional de niveles bajos de lactosa, lo cual es además beneficioso para la mejora de un trastorno digestivo, como se ha definido anteriormente.

Dicho producto fermentado puede ser un producto fresco. Un producto fresco, que no ha experimentado etapas de tratamiento térmico intensas, tiene la ventaja de que las cepas bacterianas presentes están en forma viva.

Dicho producto de leche fermentada puede ser yogurt, o leche fermentada en forma coagulada, agitada o bebible o como queso.

45 Dicho producto fermentado puede ser también un producto vegetal fermentado, tal como soja fermentada, cereales y/o frutas en forma sólida, agitada o bebible.

En otra realización, dicha composición es un alimento para bebés, una fórmula de leche para niños o una fórmula relacionada con la infancia.

En otra realización, dicha composición es un nutracéutico o un suplemento nutricional.

50 Composiciones nutricionales de la invención incluyen también suplementos alimenticios y alimentos funcionales.

Como se usa en la presente invención, un "complemento alimenticio" se refiere a un producto hecho a partir de componentes utilizados usualmente en productos alimenticios, pero que está en forma de comprimidos, polvos, cápsulas,

porciones o cualquier otra forma no asociada generalmente con los alimentos, y que tiene efectos beneficiosos para la salud.

Como se usa en la presente invención, un "alimento funcional" es un alimento que tiene también efectos beneficiosos para la salud. En particular, los complementos alimenticios y los alimentos funcionales pueden tener un efecto fisiológico - protector o curativo - contra una enfermedad, por ejemplo, contra una enfermedad crónica.

Dicha composición está destinada preferentemente para uso en seres humanos, incluyendo en particular niños, ancianos y personas que padecen desregulación metabólica, por ejemplo, sujetos obesos.

La presente invención proporciona también un método para obtener una cepa mutante de *Lactococcus lactis* capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno, preferiblemente una enterobacteria patógena, y/o mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal, que comprende una etapa de mutagénesis o de transformación genética de una cepa de *Lactococcus lactis* seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN 030066 (CNCM I-1631) y DN 030087 (CNCM I-2807).

Los métodos de mutagénesis o transformación genética de una cepa de *Lactococcus lactis* son muy conocidos por los expertos en la técnica.

La presente invención proporciona también una cepa de *Lactococcus lactis*, caracterizada porque es la cepa depositada en la CNCM con el número I-2807.

Dicha cepa es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno, preferiblemente una enterobacteria patógena como se ha definido anteriormente, y/o mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal.

La presente invención proporciona también una composición que comprende la cepa de *Lactococcus lactis* CNCM I-2807.

La presente invención proporciona también la cepa de *Lactococcus lactis* CNCM I-2807 o una composición que comprende dicha cepa para uso como medicamento.

La presente invención proporciona también un método para tratar o prevenir un trastorno digestivo, como se ha definido anteriormente, en un sujeto que lo necesite, que comprende administrar una cepa de *L. lactis* o una composición como se ha definido anteriormente a dicho sujeto.

Además de las características anteriores, la invención comprende otras características que surgirán de la siguiente descripción, que se refiere a ejemplos que ilustran la actividad anti-patogénica y de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de las cepas DN 030066 y DN 030087.

Ejemplo 1: Evaluación de las actividades anti-patogénicas de la cepa de *L. lactis* DN 030066

La actividad antimicrobiana contra *Salmonella enteritidis* B1241, *Listeria* y *E. coli* patógena se determinó en ensayos de superposición. En este ensayo se evaluaron tres cepas de *Lactococcus lactis*: la cepa de acuerdo con la presente invención DN 030066, *Lactococcus lactis* subespecie *lactis* DSMZ 20729 y *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* DSMZ 4645, descritas anteriormente como cepas productoras de bacteriocinas (respectivamente nisina y lacticina) (Bartoloni *et al.*, 2004 y Park *et al.*, 2003).

Las cepas de *L. lactis* se transfirieron desde existencias congeladas hasta placas de agar-agar frescas utilizando un sello. Las placas se cultivaron durante una noche hasta que se observaron colonias visibles. Luego se vertió sobre placas de agar-agar un agar-agar de superficie que contenía caldo de infusión de cerebro-corazón y una dilución de los agentes patógenos seleccionados. Las placas se incubaron a 37°C. Al día siguiente, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición de los agentes patógenos.

La puntuación 1 corresponde a un diámetro entre 1 y 3 mm, la puntuación 2 a un diámetro entre 4 y 6 mm y la puntuación 3 a un diámetro superior a 6 mm. Los experimentos se realizaron en tres medios diferentes: MRS (De Man Rogosa and Sharpe), Elliker y TGV (triptona-glucosa-extracto de carne). Cada experimento se realizó de forma independiente por triplicado. Las puntuaciones obtenidas para cada medio se sumaron, obteniéndose para cada cepa y cada agente patógeno una puntuación específica. A continuación, se sumaron las puntuaciones obtenidas para cada agente patógeno, obteniéndose para cada cepa, una puntuación global de la actividad antimicrobiana. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus lactis* seleccionadas.

Especies	Referencia	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enteritidis</i>	Puntuación antimicrobiano global
<i>L. lactis</i> subespecie <i>lactis</i> DN 030066	Solicitud PCT WO 97/16529	3	8	4	15
<i>L. lactis</i> subespecie <i>lactis</i> DSMZ 20729	Harris <i>et al.</i> , 1992	3	7	2	2
<i>L. lactis</i> subespecie <i>cremoris</i> DSMZ 4645	Ryan <i>et al.</i> , 1996	1	1	2	14

5 Los resultados anteriores muestran que la cepa de acuerdo con la presente invención DN 030066 tiene una actividad antimicrobiana superior a la de las dos cepas de *Lactococcus lactis* que se sabe que tienen actividades anti-patogénicas.

Ejemplo 2: Evaluaciones de TEER de las cepas de *L. lactis* DN 030066 y DN 030087

10 La integridad de la barrera intestinal se puede evaluar midiendo la diferencia de potencial observada entre los lados apical y basal de una monocapa de células T84. Este modelo experimental se denomina resistencia eléctrica transepitelial (abreviadamente en lo sucesivo TEER por la expresión inglesa *Trans Epitelial Electrical Resistance*) (Hirovani *et al.*, 2008).

15 Suspensiones de cultivo de diferentes cepas de bacterias se lavaron con PBS. A continuación, se añadieron las bacterias (100 ufc/célula) al lado apical de las monocapas de células T84. Se analizaron en el ensayo 96 cepas, incluyendo 64 bifidobacterias, 32 lactobacilos y 2 *Lactococcus lactis* (DN 030066 y DN 030087). Después de 4 horas y 6 horas de incubación con las diferentes bacterias, se midió el valor de TEER para evaluar la función de la barrera epitelial. Todos los experimentos se realizaron tres veces independientemente y por triplicado. Se estableció en 100% el valor de las células T84 a t = 0. Los resultados para las 7 cepas que tenían el valor más alto de TEER se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2: evaluación de la TEER de cepas de bacterias seleccionadas

Cepas	Referencia	TEER (%) a t = 4 h	TEER (%) a t = 6 h
<i>L. lactis</i> DN 030066	Solicitud PCT WO 97/16529	110,90	113,94
<i>L. lactis</i> DN 030087	Presente invención	108,54	102,79
<i>L. rhamnosus</i> LGG ATCC 53103	Patente de EE.UU. 4.839.281	96,94	101,43
<i>L. acidophilus</i> LA1	Link-Amster <i>et al.</i> , 1994	93,29	100,78
Células T84 (control)		100	100,49
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC2705	Solicitud PCT WO 2002/074798	99,83	94,87
<i>Bifidobacterium longum</i> W11	Patente EP 1609852	100,81	87,68
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	Solicitud de patente JP 2006081429	87,50	77,89

20 Los resultados anteriores muestran que las cepas de acuerdo con la presente invención DN 030066 y DN 030087 mejoran la integridad de la barrera epitelial en comparación con las cepas conocidas (que comprenden cepas que tienen una actividad anti-inflamatoria).

Referencias

- Bartoloni, A. *et al.* (2004) *J. Chemother.* **16**: 119-121.
- Baumgart, M. *et al.* (2007) *ISME J.* **1**: 403-418.
- Bosani, M. *et al.* (2009) *Biologics* **3**: 77-97.
- 5 Camilleri, M. (2010) *Aliment Pharmacol Ther.* **31**: 35-46.
- Cooper, R. *et al.* (1988) *Br Med J.* **296**: 1432-1434.
- Corinaldesi, R. *et al.* (2009) *Aliment Pharmacol Ther.* **30**: 245-252.
- Darfeuille-Michaud, A. *et al.* (1998) *Gastroenterology* **115**: 1405-1413.
- Dorofeyev, A. E. *et al.* (2009) *Dig Dis.* **27**: 502-510.
- 10 Gänzle, M.G. *et al.* (1999) *International Journal of Food* **48**: 37-50.
- Garrett, W.S. *et al.* (2007) *Cell* **131**: 33-45.
- Harris, L. J. *et al.* (1992) *Appl Environ Microbiol.* **58**: 1477-1483.
- Hirotoni, Y. *et al.* (2008) *Yakugaku Zasshi* **128**: 1363-1368.
- Ibbotson, J. P. *et al.* (1987) *Eur J Clin Microbiol.* **6**: 286-290.
- 15 Ji, S. *et al.* *J Gastroenterol Hepatol.* **20**: 381-386.
- Kang, S. S. *et al.* (2008) *PLoS Med.* **5**: e41.
- Kim, C. S. *et al.* (2007) *Inflamm Bowel Dis.* **13**: 1457-1466.
- Link-Amster, H. *et al.* (1994) *FEMS Immunol Med Microbiol.* **10**: 55-63.
- Madsen, K. *et al.* (2001) *Gastroenterology* **121**: 580-591.
- 20 Malinen, E. *et al.* (2005) *Am. J. Gastroenterol.* **100**: 373-382.
- Marshall, J. K. *et al.* (2010) *Gut* **59**: 605-611.
- Miyachi, E. *et al.* (2009) *J. Dairy Sci.* **92**: 2400-2408.
- Mow, W.S. *et al.* (2004) *Gastroenterology* **126**: 414-424.
- Ohman, L. and Simren, M. (2010) *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **7**: 163-173.
- 25 Olasupo, N.A. *et al.* (2003) *Letters in Applied Microbiology* **36**: 448-451.
- Park, S.H. *et al.* (2003) *Curr Microbiol.* **46**: 385-388.
- Peterson, D. A. (2008) *Cell Host Microbe* **3**: 417-427.
- Resta-Lenert, S. and Barrett, K. E. (2006) *Gastroenterology* **130**: 731-746.
- Ryan, M.P. *et al.* (1996) *Appl Environ Microbiol.* **62**: 612- 619.
- 30 Sartor, R.B. (2008) *Gastroenterology* **134**: 577-594.
- Sartor, R.B. (2009) *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **64**: 121-132; discussion 132-127, 251-127.
- Shao, J. and Kaushal G. (2004) *Int J Pharm.* **286**: 117-124.
- Si, J. M. *et al.* (2004) *World J Gastroenterol.* **10**: 1802-1805.
- Sobieszczanska, B.M. *et al.* (2006) *J. Med. Microbiol.* **55**: 325-330.
- 35 Spiller, R. and Garsed, K. (2009) *Gastroenterology* **136**: 1979-1988.
- Swidsinski, A. *et al.* (2009) *J Physiol Pharmacol. Suppl* **6**: 61-71.
- Thabane, M. *et al.* (2010) *Am J Gastroenterol.* **105**: 933-939.
- Tiwana, H. *et al.* (1998) *Br J Rheumatol.* **37**: 525-531.
- Vanderpool, C. *et al.* (2008) *Inflamm Bowel Dis.* **14**: 1585-1596.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactococcus lactis* seleccionada del grupo que consiste en las cepas DN 030066 (CNCM I-1631) y DN 030087 (CNCM I-2807) para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno digestivo.
- 5 2. Una cepa de *Lactococcus lactis* para uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque dicho uso es para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno y/o mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal.
3. Una cepa de *Lactococcus lactis* para uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque dicho microorganismo patógeno es una enterobacteria patógena.
- 10 4. Una cepa de *Lactococcus lactis* para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque dicho trastorno digestivo se selecciona del grupo que consiste en un trastorno intestinal, diarrea, estreñimiento, síndrome del intestino irritable (SII), síndrome del intestino irritable postinfeccioso (SII-PI) y enfermedades inflamatorias intestinales (EII).
- 15 5. Una cepa mutante de *Lactococcus lactis* obtenida a partir de la cepa DN 030066 o de la cepa DN 030087 por su mutagénesis o transformación genética, para inhibir el crecimiento de un microorganismo patógeno y/o mejorar la integridad de la barrera epitelial intestinal, para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno digestivo.
- 20 6. Una cepa mutante de *Lactococcus lactis* para uso de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizada porque dicho microorganismo patógeno está definido en la reivindicación 3 y/o porque dicho trastorno digestivo está definido en la reivindicación 4.
7. Una cepa de *Lactococcus lactis* caracterizada porque es la cepa depositada en la CNCM con el número I-2807.
8. Una composición que comprende la cepa de *L. lactis* de acuerdo con la reivindicación 7.
9. La cepa de *L. lactis* de acuerdo con la reivindicación 7 o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para uso como medicamento.