

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 828**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A23C 9/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2009 E 09168590 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2289527**

54 Título: **Bifidobacterium longum y trastornos GI funcionales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.04.2018**

73 Titular/es:  
**NESTEC S.A. (100.0%)**  
**Avenue Nestlé 55**  
**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:  
**MCLEAN, PETER;**  
**BERGONZELLI DEGONDA, GABRIELA;**  
**COLLINS, STEPHEN MICHAEL;**  
**BERCIK, PREMYSL y**  
**VERDU DE BERCIK, ELENA**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 664 828 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Bifidobacterium longum y trastornos GI funcionales

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de las bacterias probióticas. En particular, se refiere a Bifidobacterium longum NCC3001 (ATCC BAA-999) posteriormente denominada Bifidobacterium longum ATCC BAA-999, y su uso en composiciones ingeribles. La composición descrita en este documento puede usarse para tratar o prevenir trastornos gastrointestinales (GI) funcionales relacionados con la ansiedad.
- 10 Los trastornos GI funcionales (FGID) son un grupo de trastornos que incluyen el síndrome del intestino irritable (SII) y la dispepsia funcional que son afecciones crónicas asociadas con una alta morbilidad caracterizada por malestar o dolor abdominal, distensión abdominal y en el caso de los hábitos intestinales alterados del SII (diarrea y/o estreñimiento).
- 15 La prevalencia de FGID en la población general es relativamente alta, variando entre el 15% y el 30% con una carga económica sustancial. Se ha sugerido que los costos directos anuales para el SII por sí solos son ahora de alrededor de 41 mil millones de \$ en los 8 países más industrializados con costos indirectos adicionales considerables (por ejemplo, ausentismo laboral, etc.). Los tratamientos actuales para los FGID demuestran, en el mejor de los casos, una eficacia marginal que históricamente se ha relacionado con la escasa comprensión de la patogénesis de la enfermedad.
- 20 La fisiopatología precisa de SII aún no se ha dilucidado.
- Estudios recientes han descrito la inflamación de la mucosa y alteraciones en la microflora intestinal en pacientes con SII y una correlación de la enfermedad con infecciones intestinales.
- 25 El hecho de que algunos probióticos presenten propiedades antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias y que puedan restablecer el equilibrio de la microbiota intestinal sugiere que pueden convertirse en agentes terapéuticos adecuados para el SII.
- 30 Hasta la fecha, se han publicado varios estudios sobre el efecto de diferentes probióticos en sujetos con SII. Estos estudios sugieren que el uso de probióticos puede estar asociado con una mejoría en los síntomas del SII, pero también que no todos los probióticos tienen la misma eficacia en el SII.
- 35 Varios metaanálisis realizados recientemente concluyeron que no hay datos adecuados para comentar sobre la eficacia de otros probióticos (Lynne V McFarland, et al., World J Gastroenterol 2008 7 de mayo; 14 (17): 2650-2661; Nourieh Hoveyda, et al., BMC Gastroenterology 2009, 9:15; E. Corazziari et al., "Approach to the Patient with Disorders of Intestinal Function", NeUroGastroenterologia, vol.12, no.1, 01 de marzo de 2006, p.42- 43).
- 40 En consecuencia, el objetivo de la presente invención era mejorar el estado de la técnica y, en particular, proporcionar a la técnica una composición que comprende una cepa bacteriana alternativa que sea eficaz, fácilmente disponible, de bajo precio y segura de administrar sin efectos secundarios indeseados que pueden usarse para tratar o prevenir trastornos GI funcionales relacionados con la ansiedad.
- 45 Los presentes inventores han abordado esta necesidad. Se sorprendieron al ver que podían lograr este objetivo mediante las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes desarrollan adicionalmente la idea de la presente invención.
- 50 Se descubrió que la eficacia en el tratamiento y/o la prevención de trastornos gastrointestinales funcionales relacionados con la ansiedad depende del género, especie y cepa bacterianos usados.
- En consecuencia, una realización de la presente invención es una composición que comprende Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 para su uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos GI funcionales ligados a la ansiedad seleccionados del grupo que consiste en síndrome de intestino irritable; dispepsia funcional; estreñimiento funcional, diarrea funcional; dolor abdominal funcional; hinchazón funcional, síndrome de dolor epigástrico, síndrome de angustia posprandial o combinaciones de los mismos.
- 55 Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 fue una cepa de la especie Bifidobacterium longum que se encontró que era particularmente efectiva para lograr el objetivo de la presente invención.
- 60 Ventajosamente, Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 está disponible comercialmente y ya se probó y se encontró que era aceptable para la adición a productos alimenticios, por ejemplo. Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 en combinación con un lactobacilo se ha descrito para la profilaxis de la diarrea infecciosa en bebés y niños pequeños (EP1974735 A). La fórmula infantil que comprende Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 y LC-PUFA se ha descrito para fortalecer las defensas inmunológicas naturales en bebés o niños pequeños (documento WO2004/112507). Se ha demostrado que la administración de Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 junto con
- 65

prebióticos FOS/GOS es segura para reducir la incidencia de estreñimiento en recién nacidos (Puccio et al., "Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live Bifidobacterium and prebiotics", Nutrition, Elsevier Inc., US, vol.23, no.1, 22 de diciembre de 2006).

5 Se ha informado que Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 tiene propiedades antiinflamatorias (documento WO2007/093619).

Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 (BL999) puede obtenerse comercialmente de proveedores especializados, por ejemplo de Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca BB536.

10 Se puede cultivar Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 (BL999) de acuerdo con cualquier método adecuado. Se puede agregar a los productos en una forma liofilizada o deshidratada, por ejemplo.

15 El término "Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 (BL999)" pretende incluir la bacteria, partes de la bacteria y/o un medio de crecimiento fermentado por la bacteria.

La composición puede ser cualquier composición, pero preferiblemente es una composición que se administra por vía oral, enteral o rectal.

20 Por ejemplo, la composición puede ser una composición comestible.

"Comestible" significa un material que está aprobado para consumo humano o animal.

25 Típicamente, la composición se puede seleccionar del grupo que consiste en una composición alimenticia, una composición alimenticia para mascotas, un suplemento dietético, un nutracéutico, una fórmula nutricional, una bebida, y/o una composición médica.

30 Si la composición de la presente invención es una composición alimenticia, esto tiene la ventaja de que dicha composición se puede distribuir en farmacias, parafarmacias, pero también en supermercados normales, donde las composiciones están fácilmente disponibles para todos.

35 El sabor generalmente agradable de las composiciones alimenticias contribuirá más a la aceptación del producto. En particular, es mucho más probable que los niños pequeños o las mascotas consuman fácilmente composiciones con un sabor que generalmente les gusta.

Ejemplos de productos alimenticios que son aplicables a la presente invención son yogures, leche, leche aromatizada, helado, postres listos para el consumo, polvos para reconstitución con, por ejemplo, leche o agua, bebidas lácteas con chocolate, bebidas de malta, platos preparados, platos instantáneos o bebidas para humanos o composiciones de alimentos que representan una dieta completa o parcial para mascotas o ganado.

40 En consecuencia, en una realización, la composición de acuerdo con la presente invención es un producto alimenticio destinado a humanos, mascotas o ganado.

45 La composición puede estar destinada a animales seleccionados del grupo que consiste en perros, gatos, cerdos, vacas, caballos, cabras, ovejas o aves de corral.

En una realización preferida, la composición es un producto alimenticio destinado a especies adultas, en particular adultos humanos.

50 La composición de la presente invención puede contener además hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales encapsulantes, materiales de pared/corteza, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes de superficie activa, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, rellenos, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, coadyuvantes de elaboración (disolventes), fluidos, enmascarantes del sabor, agentes de ponderación, agentes gelificantes, agentes formadores de geles, antioxidantes y antimicrobianos. La composición también puede contener aditivos farmacéuticos convencionales y adyuvantes, excipientes y diluyentes, que incluyen, pero no se limitan a, agua, gelatina de cualquier origen, gomas vegetales, sulfonato de lignina, talco, azúcares, almidón, goma arábiga, aceites vegetales, polialquilenglicoles, aromatizantes, agentes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsionantes, tampones, lubricantes, colorantes, agentes humectantes, agentes de relleno y similares. En todos los casos, dichos componentes adicionales se seleccionarán teniendo en cuenta su idoneidad para el destinatario previsto.

La composición puede ser una fórmula nutricionalmente completa.

65 La composición de acuerdo con la invención puede comprender una fuente de proteína.

Se puede usar cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo, proteínas animales (tales como proteínas de leche, proteínas de carne y proteínas de huevo); proteínas vegetales (tales como proteína de soja, proteína de trigo, proteína de arroz y proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres; o combinaciones de los mismos. Las proteínas lácteas tales como caseína y suero de leche, y las proteínas de soja son particularmente preferidas.

5 Las proteínas pueden estar intactas o hidrolizadas o una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede ser deseable suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis entre 2 y 20%), por ejemplo para sujetos humanos y/o animales con riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca.

10 Además, las fuentes de proteína prehidrolizadas generalmente se digieren más fácilmente y pueden absorberse por un tracto gastrointestinal deteriorado.

15 Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis se puede llevar a cabo como se desee y como se conoce en la técnica. Puede ser deseable suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (grado de hidrólisis entre 2 y 20%).

20 Por ejemplo, se puede preparar un hidrolizado de proteína de suero hidrolizando enzimáticamente la fracción de suero en una o más etapas. Si la fracción de suero utilizada como material de partida está sustancialmente libre de lactosa, se encuentra que la proteína sufre mucho menos bloqueo de lisina durante el proceso de hidrólisis. Esto permite que el grado de bloqueo de la lisina se reduzca de aproximadamente 15% en peso de lisina total a menos de aproximadamente 10% en peso de lisina; por ejemplo, aproximadamente 7% en peso de lisina, lo que mejora enormemente la calidad nutricional de la fuente de proteína.

25 La composición también puede contener una fuente de carbohidratos y una fuente de grasa.

Si la composición incluye una fuente de grasa, la fuente de grasa proporciona preferiblemente del 5% al 40% de la energía de la composición; por ejemplo, del 20% al 30% de la energía. Se puede obtener un perfil de grasa adecuado usando una mezcla de aceite de canola, aceite de maíz y aceite de girasol de alto contenido de ácido oleico.

30 Se puede agregar una fuente de carbohidrato a la composición.

35 La fuente de carbohidratos preferiblemente proporciona del 40% al 80% de la energía de la composición. Puede usarse cualquier carbohidrato adecuado, por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas y mezclas de los mismos. También se puede agregar fibra dietética si se desea. La fibra dietética pasa a través del intestino delgado sin digerir por las enzimas y funciona como un agente de relleno natural y laxante. La fibra dietética puede ser soluble o insoluble y, en general, se prefiere una combinación de los dos tipos. Las fuentes adecuadas de fibra dietética incluyen soja, guisante, avena, pectina, goma guar, goma guar parcialmente hidrolizada, goma arábica, fructooligosacáridos, oligosacáridos ácidos, galactooligosacáridos, sialil-lactosa y oligosacáridos derivados de leches animales. Una mezcla de fibras preferida es una mezcla de inulina con fructooligosacáridos de cadena más corta. Preferiblemente, si la fibra está presente, el contenido de fibra está entre 2 y 40 g/l de la composición tal como se consume, más preferiblemente entre 4 y 10 g/l.

45 La composición también puede contener minerales y micronutrientes tales como oligoelementos y vitaminas de acuerdo con las recomendaciones de organismos gubernamentales tales como la USRDA. Por ejemplo, la composición puede contener por dosis diaria uno o más de los siguientes micronutrientes en los rangos dados: 300 a 500 mg de calcio, 50 a 100 mg de magnesio, 150 a 250 mg de fósforo, 5 a 20 mg de hierro, 1 a 7 mg de zinc, 0,1 a 0,3 mg de cobre, 50 a 200 µg de yodo, 5 a 15 µg de selenio, 1000 a 3000 µg de beta caroteno, 10 a 80 mg de vitamina C, 1 a 2 mg de vitamina B1, 0,5 a 1,5 mg de vitamina B6, 0,5 a 2 mg de vitamina B2, de 5 a 18 mg de niacina, de 0,5 a 2,0 µg de vitamina B12, de 100 a 800 µg de ácido fólico, de 30 a 70 µg de biotina, de 1 a 5 mg de vitamina D, de 3 a 10 µg de Vitamina E.

55 Se pueden incorporar uno o más emulsionantes de calidad alimentaria en la composición si se desea; por ejemplo ésteres de ácido diacetil tartárico de mono y diglicéridos, lecitina y mono y diglicéridos. De forma similar, se pueden incluir sales y estabilizantes adecuados.

La composición puede ser administrada por vía oral y/o enteral; por ejemplo, en forma de un polvo reconstituible en leche o agua.

60 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la composición comprende al menos otro tipo de microorganismo de calidad alimentaria.

Los microorganismos de "calidad alimentaria" son microorganismos que son seguros para su uso en alimentos.

65 Los microorganismos de calidad alimentaria son preferiblemente bacterias de calidad alimentaria o levaduras de calidad alimentaria. Las bacterias de calidad alimentaria se pueden seleccionar del grupo que consiste en bacterias

de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de las mismas. Como levadura de calidad alimentaria, pueden usarse por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y/o *Saccharomyces boulardii*.

Las bacterias de calidad alimentaria pueden ser bacterias probióticas.

"Probiótico" significa preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o el bienestar del huésped. (Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999: 10 107-10).

Las bacterias probióticas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de las mismas. Las bacterias probióticas pueden ser cualquier bacteria de ácido láctico o bifidobacteria con características probióticas establecidas. Por ejemplo, también pueden ser capaces de promover el desarrollo de una microbiota intestinal bifidogénica.

Los probióticos adecuados se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* o mezclas de los mismos, en particular seleccionados del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus reuteri* o mezclas de los mismos, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM I-2170), *Bifidobacterium longum* (NCC2705; CNCM I-2618), *Bifidobacterium lactis* (2818; CNCM I-3446), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724), *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB10415) y mezclas de los mismos.

En una realización preferida de la presente invención, la composición contiene además al menos un prebiótico. "Prebiótico" significa sustancias alimenticias destinadas a promover el crecimiento de bacterias probióticas en los intestinos.

Los prebióticos pueden así promover el crecimiento de ciertas bacterias de grado alimentario, en particular de bacterias probióticas, en los intestinos y, por lo tanto, pueden potenciar el efecto de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Además, varios prebióticos tienen una influencia positiva en, por ejemplo, la digestión.

Preferiblemente, el prebiótico se puede seleccionar del grupo que consiste en oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y/o inulina; fibras dietéticas; o mezclas de los mismos

El *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 se puede usar, tanto como bacteria viva como especies bacterianas no replicantes inactivadas.

"No replicante" significa que no pueden detectarse células viables y/o unidades formadoras de colonias mediante métodos de recubrimiento clásicos. Dichos métodos de recubrimiento clásico se resumen en el libro de microbiología: James Monroe Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden. 2005. Microbiología moderna de los alimentos. 7ª edición, Springer Science, Nueva York, N.Y. 790 p. Típicamente, la ausencia de células viables puede mostrarse de la siguiente manera: no hay colonia visible en placas de agar o no hay turbidez en el medio de crecimiento líquido después de la inoculación con diferentes concentraciones de preparaciones bacterianas (muestras "no replicantes") e incubación en condiciones apropiadas (atmósfera aeróbica y/o anaerobia durante al menos 24 h).

Se prefiere que al menos una parte de la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, esté viva en la composición y preferiblemente llegue viva al intestino. De esta forma, pueden persistir en el intestino y pueden aumentar su efectividad mediante la multiplicación. También pueden ser efectivos al interactuar con las bacterias comensales y/o el huésped.

Para productos alimenticios o medicamentos estériles especiales, por ejemplo, podría ser preferible que *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 esté presente en una forma no replicante en la composición. Por lo tanto, en una realización de la presente invención, al menos una parte de la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, no se replica en la composición.

En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran en una cantidad suficiente para curar o detener al menos parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "una dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este fin dependerán de una serie de factores conocidos por los expertos en la materia tales como la gravedad de la enfermedad y el peso y el estado general del paciente.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones de acuerdo con la invención se administran a un paciente susceptible o de otra manera en riesgo de una enfermedad particular en una cantidad que es suficiente para reducir al menos parcialmente el riesgo de desarrollar una enfermedad. Tal cantidad se define como "una dosis efectiva

profiláctica". Nuevamente, las cantidades precisas dependen de varios factores específicos del paciente, como el estado de salud y el peso del paciente.

5 Generalmente, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 se administrará en una dosis terapéuticamente efectiva y/o en una dosis profiláctica efectiva.

Si *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está presente en una forma viable, teóricamente es efectiva en cualquier concentración considerando el hecho de que estas bacterias pueden colonizar el intestino y multiplicarse.

10 Para la composición de la presente invención, generalmente se prefiere que una dosis diaria de la composición comprenda entre  $10^4$  y  $10^{12}$  ufc (unidades formadoras de colonias) de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Una dosis diaria adecuada particular de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 es de  $10^4$  a  $10^{11}$  ufc, más preferiblemente de  $10^4$  a  $10^{10}$  ufc.

15 La composición de la presente invención también puede comprender entre  $10^2$  y  $10^{10}$  ufc, preferiblemente  $10^2$  a  $10^9$  unidades formadoras de colonias, más preferiblemente entre  $10^2$  y  $10^8$  ufc de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, por gramo de peso seco de la composición.

20 En el caso de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 inactivado y/o no replicante, generalmente se prefiere que la composición de la presente invención comprenda entre  $10^2$  y  $10^{10}$  células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, por gramo del peso seco de la composición. Una dosis adecuada particular de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 es de  $10^3$  a  $10^8$  células no replicantes, más preferiblemente de  $10^5$  a  $10^8$  células no replicantes por gramo del peso seco de la composición.

25 Obviamente, los microorganismos no replicantes no forman colonias, por lo tanto, el término células se debe entender como la cantidad de microorganismos no replicantes que se obtiene a partir de la cantidad especificada de células bacterianas replicantes. Esto incluye microorganismos inactivados, no viables o muertos o presentes como fragmentos tales como ADN o materiales de la pared celular.

30 La composición de la presente invención se puede proporcionar en forma de polvo que tiene una actividad de agua menor que 0,2, por ejemplo en el intervalo de 0,19-0,05, preferiblemente menor que 0,15. La composición puede ser un polvo estable al almacenamiento. La baja actividad de agua proporciona esta estabilidad de almacenamiento y asegura que el microorganismo probiótico, por ejemplo, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, seguirá siendo viable incluso después de largos tiempos de almacenamiento. La actividad del agua o  $a_w$  es una medida del estado de energía del agua en un sistema. Se define como la presión de vapor del agua dividida por la del agua pura a la misma temperatura; por lo tanto, el agua destilada pura tiene una actividad de agua de exactamente uno. Adicional o alternativamente, el microorganismo probiótico *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 se puede proporcionar en una forma encapsulada. Se ha encontrado que la encapsulación de la bacteria tiene ventajas terapéuticas y técnicas. La encapsulación aumenta la supervivencia de las bacterias y, por lo tanto, la cantidad de bacterias vivas que llegan al intestino. Además, las bacterias se liberan gradualmente permitiendo una acción prolongada de las bacterias sobre la salud del sujeto. Las bacterias pueden estar microencapsuladas, por ejemplo como se describe en FR2443247 (Société des Produits Nestlé). Brevemente, las bacterias pueden congelarse o liofilizarse e incorporarse a un gel. Los presentes inventores se sorprendieron en particular al descubrir que la composición de la presente invención se puede usar con éxito para aumentar significativamente la expresión de BDNF en el hipocampo. BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) es un factor de crecimiento de una familia única de factores de crecimiento polipeptídicos. El BDNF y otros factores neurotróficos, por ejemplo, NGF (factor de crecimiento nervioso), NT-3 (neurotrofina-3) y NT-4 (neurotrofin-4) son esenciales para la salud y el bienestar del sistema nervioso.

50 Este efecto posiblemente podría explicar el efecto observado contra trastornos intestinales funcionales.

El término "trastorno GI funcional" se refiere a un grupo de trastornos intestinales que se caracterizan por molestias abdominales crónicas sin una causa estructural o bioquímica que podría explicar los síntomas.

55 Los trastornos funcionales GI son bien conocidos por los expertos en la técnica y, por lo tanto, se describen y definen como trastornos gastrointestinales funcionales con síntomas atribuibles al tracto gastrointestinal medio o inferior por Longstreth et al., En GASTROENTEROLOGY 2006; 130: 1480 -1491, por ejemplo.

60 El trastorno GI funcional puede seleccionarse del grupo que consiste en el síndrome del intestino irritable; dispepsia funcional; estreñimiento funcional, diarrea funcional; dolor abdominal funcional; hinchazón funcional, síndrome de dolor epigástrico, síndrome de angustia posprandial o combinaciones de los mismos.

Los trastornos GI funcionales que pueden tratarse o prevenirse mediante el objeto de la presente invención son trastornos GI funcionales relacionados con la ansiedad.

65 La ansiedad es un estado psicológico y fisiológico que da como resultado una sensación desagradable que típicamente se asocia con inquietud, miedo o preocupación. La ansiedad es, por ejemplo, una reacción normal al

estrés. Puede ayudar a una persona a lidiar con una situación difícil en el trabajo o en la escuela, pero cuando ocurre un exceso de ansiedad, un grupo de los cuales son trastornos GI funcionales relacionados con la ansiedad.

5 Los inventores, sin pretender imponer ninguna teoría, creen en la actualidad que el mecanismo subyacente mediante el cual las composiciones de la presente invención son efectivas se relaciona con la modulación del eje bidimensional del cerebro microbiano-intestinal, posiblemente asociado significativamente con factores psicológicos.

Las características y ventajas adicionales de la presente invención resultan de los siguientes ejemplos y figuras:

10 La figura 1 muestra el resultado de una prueba de caja oscura/caja iluminada: tiempo total pasado en caja iluminada, latencia para volver a ingresar en la caja iluminada y latencia para bajarse en ratones infectados con *Trichuris muris* (Tm). Tm-medio y Tm-B. longum son ratones infectados con Tm tratados con medio fresco (control negativo) y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, respectivamente; un grupo de Tm se trató con la cepa de *L. rhamnosus* (L. rh) que se muestra para comparación.

15 La Figura 2 muestra los resultados de la hibridación in situ en la región del hipocampo del cerebro de ratones infectados con *Trichuris muris* (Tm). Tm-B. longum son ratones infectados con Tm tratados con *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; un grupo de ratones Tm se trató con la cepa de *L. rhamnosus* que se muestra para comparación. La cuantificación de las señales 35S se realizó por autorradiografía y análisis de imágenes (panel superior derecho).

20 La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en la inflamación colónica medida por ensayo de actividad de mieloperoxidasa (panel izquierdo) e infiltración de células mononucleares (panel derecho) en ratones infectados con *Trichuris muris* (Tm). Tm-medio y Tm-B. longum son ratones infectados con Tm tratados con medio fresco (control negativo) y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; un grupo de ratones Tm se trató con la cepa de *L. rhamnosus* se muestra para comparación.

#### Ejemplos:

30 Material y métodos

Condiciones de cultivo bacterianos

35 Los probióticos (*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 y *L. rhamnosus* NCC4007 para comparación) se cultivaron en condiciones anaerobias en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, BioMerieux) (bifidobacterias con 0,5% de cisteína). Después de 24 ha 37 °C, se estimó el número de bacterias midiendo la densidad óptica a 600 nm (1 DO600 = 10<sup>8</sup> bacterias/ml). Las células bacterianas se sedimentaron por centrifugación a 5000 X g durante 15 minutos a 4 °C y se resuspendieron adicionalmente a una concentración de 10<sup>10</sup>/ml en su medio de cultivo agotado. Alícuotas de 1 mL se mantuvieron congeladas hasta su uso.

40 Animales:

45 Se adquirieron ratones BALB/c o AKR machos (Harlan, Canadá) a la edad de 6-8 semanas y se alojaron en una nidad libre de patógenos convencional en el estabulario de la Universidad McMaster. Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación del comité de cuidado de animales de la Universidad McMaster.

Diseño:

50 Infección crónica por *T. muris*:

Ratones AKR machos fueron cebados con *T. muris* (300 huevos/ratón) (n = 26) o con placebo (n = 9). Los ratones infectados se sometieron a una administración forzada diaria de *L. rhamnosus*, *B. longum* o MRS fresco desde el día 30 durante 10 días. Los ratones no infectados se inocularon con MRS fresco diariamente desde el día 30 hasta el día 40. Al final de la administración de probióticos o placebo, los ratones se sometieron a pruebas de caja oscura/caja iluminada y bajada del escalón. Los ratones se sacrificaron a continuación y se obtuvieron muestras de tejido. Las muestras de colon se fijaron en formalina para análisis histológico o se congelaron rápidamente para la determinación de MPO. Los cerebros se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron para la hibridación in situ.

60 Pruebas de comportamiento:

Caja oscura/caja iluminada:

65 El comportamiento de ansiedad se evaluó individualmente en ratones usando una caja oscura/caja iluminada como se describe en la bibliografía. Brevemente, cada ratón se colocó en el centro de la caja iluminada (30x30 cm) conectada por una abertura (10x3 cm) a una caja oscura más pequeña (30x15 cm). El comportamiento locomotor de

5 cada ratón en la caja iluminada fue grabado durante 10 minutos por una cámara de video digital y almacenado en una computadora para un análisis fuera de línea. Varios parámetros fueron evaluados por un observador ciego incluyendo el tiempo total pasado en la caja iluminada, latencia para volver a ingresar en la caja iluminada (tiempo pasado en la caja oscura después de la primera entrada) y número de cruces (número de cruces de caja oscura a caja iluminada).

Prueba de bajada del escalón:

10 El comportamiento de ansiedad se evaluó usando la prueba de bajada tal como se describe en la bibliografía. Brevemente, cada ratón se colocó en el centro de una plataforma elevada (7,5 cm de diámetro, 3 cm de alto) colocada en el centro de un suelo negro. La latencia para bajar del escalón se midió con un cronómetro; la duración máxima de la prueba fue de 5 min.

15 Histología:

Las muestras de colon se fijaron en formalina al 10% y luego se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los portaobjetos se examinaron con microscopio óptico para evaluar el infiltrado inflamatorio agudo y crónico.

20 Ensayo de actividad mieloperoxidasa:

Para evaluar la inflamación intestinal aguda, se realizó un ensayo de actividad de mieloperoxidasa (MPO) en tejidos congelados como se describió previamente. La actividad MPO se expresa en unidades por mg de tejido, donde una unidad de MPO se define como una cantidad de la enzima capaz de convertir 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno en agua en 1 minuto a temperatura ambiente.

25 Hibridación in situ en el SNC:

30 Se evaluaron los niveles de BDNF en el hipocampo y de CRH en el hipotálamo (núcleo paraventricular) mediante hibridaciones in situ usando sondas de ARN marcadas con <sup>35</sup>S en secciones de cerebro congeladas como se describió previamente (Whitfield et al., 1990; Foster et al., 2002). Brevemente, los cerebros se retiraron y se congelaron rápidamente por inmersión en 2-metilbutano a -60 °C, y se almacenaron a -70 °C. Las secciones coronales cortadas con criostato de 12  $\mu$ m se montaron sobre láminas gelatinizadas, se secaron y almacenaron a -35 °C. Las secciones de tejido se fijaron con formaldehído al 4%, se acetiló con anhídrido acético al 0,25% en trietanolamina-HCl 0,1 M, pH 8,0, se deshidrató y se deslipidó con cloroformo. La sonda de ribonucleótido BDNF antisentido (regalo del Dr. J. Lauterborn y el Dr. C. Gall, Universidad de California Irvine) y la sonda de ribonucleótido CRH antisentido (regalo del Dr. James Herman, Universidad de Cincinnati) se transcribieron a partir de plásmido linealizado usando el Sistema Riboprobe (Promega Biotech, Burlington, ON) con  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-UTP (actividad específica > 1000 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA) y polimerasas T3 y T7, respectivamente. Las sondas radiomarcadas se diluyeron en un tampón de hibridación (0,6 M NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0, sulfato de dextrano al 10%, ADN de esperma de salmón cizallado 0,01%, ARN total de levadura 0,05%, tipo XI, ARNt de levadura 0,01% , solución de Denhardt 1X) y se aplica a las secciones cerebrales (aproximadamente 500.000 CPM/sección). Los portaobjetos se incubaron durante la noche a 55 °C en una cámara humidificada. Para reducir la unión no específica de la sonda, los portaobjetos se lavaron en 20  $\mu$ g/ml de solución de RNasa durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de 1 hora cada uno en 2XSSC a 50 °C, 0,2XSSC a 55 ° y 60 °C. Los portaobjetos se deshidrataron y se secaron al aire para autorradiografía. Los portaobjetos y estándares de plástico <sup>14</sup>C se colocaron en casetes de rayos x, encima de una película (BioMax MR, Eastman Kodak, Rochester, NY) durante 5 días y se revelaron (Kodak Medical X-Ray Processor). Las imágenes de la película autorradiográfica de las secciones cerebrales y los estándares se digitalizaron con una cámara de estado sólido con lente Nikon de 60 mm utilizando el software QCapture (Qicam; Quorum Technologies Inc., Guelph, ON) y un sistema de análisis de imágenes Macintosh con software Image ( <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). La transmitancia de la luz a través de la película se midió perfilando la estructura en el monitor. Para el ARNm de BDNF, la transmitancia se convirtió a niveles de radiactividad usando la curva de Rodbard aplicada a los estándares. Para el ARNm de CRH, la característica de corte de densidad se utilizó para medir tanto la transmitancia de la luz como el área de la señal de ARNm. Los DPM calculados se multiplicaron por área para producir una medición de densidad integrada. Las ilustraciones se hicieron directamente a partir de las imágenes capturadas.

55 Análisis estadístico:

60 Los datos se presentan como media  $\pm$  desviación estándar o medianas con intervalos intercuartiles según fuera apropiado. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de dos colas, prueba o prueba t no apareada, según corresponda. Un valor p de <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados:

65 Los ratones infectados crónicamente con el parásito *Trichuris muris* mostraron un aumento en el comportamiento similar a la ansiedad en dos pruebas de comportamiento: 1) En la prueba de caja oscura/caja iluminada, los

animales infectados mostraron una disminución en el tiempo pasado en la caja iluminada y un aumento de la latencia para volver a entrar en la caja iluminada; 2) En la prueba de bajada del escalón, la infección aumentó la latencia para bajar del escalón (Fig. 1). El tratamiento con *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 pero no con *L. rhamnosus* NCC4007 indujo una reducción del comportamiento similar a la ansiedad hacia la normalidad. El efecto sobre el comportamiento se correlacionó con una normalización de la disminución mediada por *Trichuris muris* en los niveles de BDNF en el hipocampo solo por *B. longum* (figura 2). Por el contrario, el tratamiento con *B. longum* y con *L. rhamnosus* dio como resultado una reducción de la actividad mieloperoxidasa e infiltración mononuclear previamente inducida por la infección por *Trichuris muris* (figura 3), lo que indica que la normalización del comportamiento era independiente del efecto antiinflamatorio del bacterias.

10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 para uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos gastrointestinales (GI) funcionales relacionados con la ansiedad, en donde el trastorno funcional GI se selecciona del grupo que consiste en síndrome de intestino irritable; dispepsia funcional; estreñimiento funcional, diarrea funcional; dolor abdominal funcional; hinchazón funcional, síndrome de dolor epigástrico, síndrome de angustia posprandial o combinaciones de los mismos.
- 10 2. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición se selecciona del grupo que consiste en una composición alimenticia, una composición alimenticia para mascotas, un suplemento dietético, un nutracéutico, una fórmula nutricional, una bebida y/o un medicamento. composición.
- 15 3. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, donde la composición comprende adicionalmente al menos otro tipo de otra bacteria de calidad alimentaria, en donde las bacterias de calidad alimentaria se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de las mismas.
- 20 4. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición contiene además al menos un prebiótico.
- 25 5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el prebiótico se selecciona del grupo que consiste en oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y/o inulina; fibras dietéticas; o mezclas de los mismos.
- 30 6. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, más preferido al menos 15% de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 son viables en la composición.
- 35 7. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 no se replican en la composición.
- 40 8. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende entre  $10^4$  y  $10^{10}$  células de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por dosis diaria.
9. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición comprende entre  $10^2$  y  $10^8$  células de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por g del peso seco de la composición.
10. Una composición de acuerdo con una o más de las reivindicaciones precedentes que contiene además una fuente de proteína que comprende proteína de suero hidrolizada.
11. Una composición de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores en forma de polvo que tiene una actividad de agua menor que 0,2, por ejemplo en el intervalo de 0,19-0,05, preferiblemente menor de 0,15.

**Figura 1**  
Comportamiento similar a la ansiedad

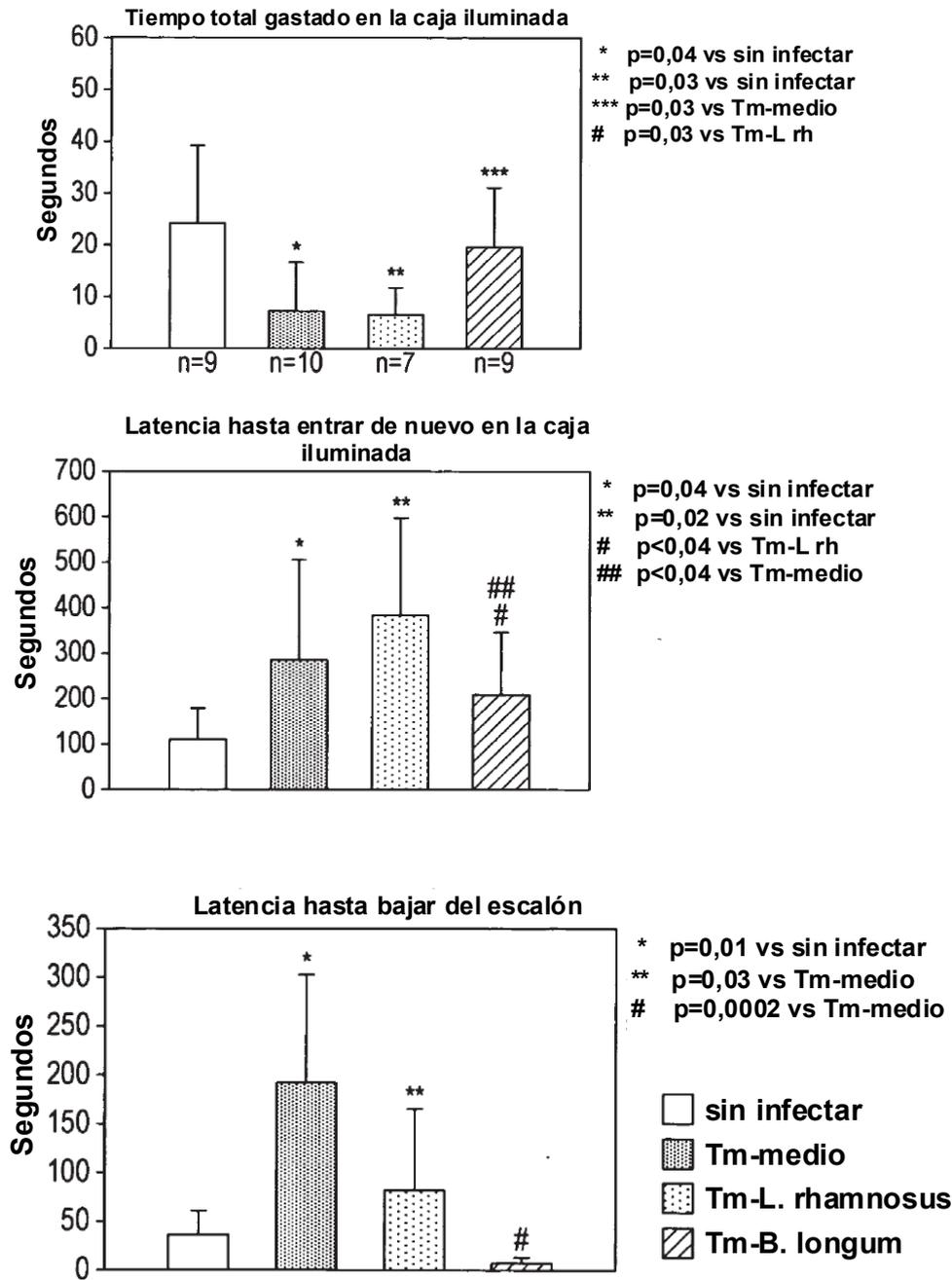
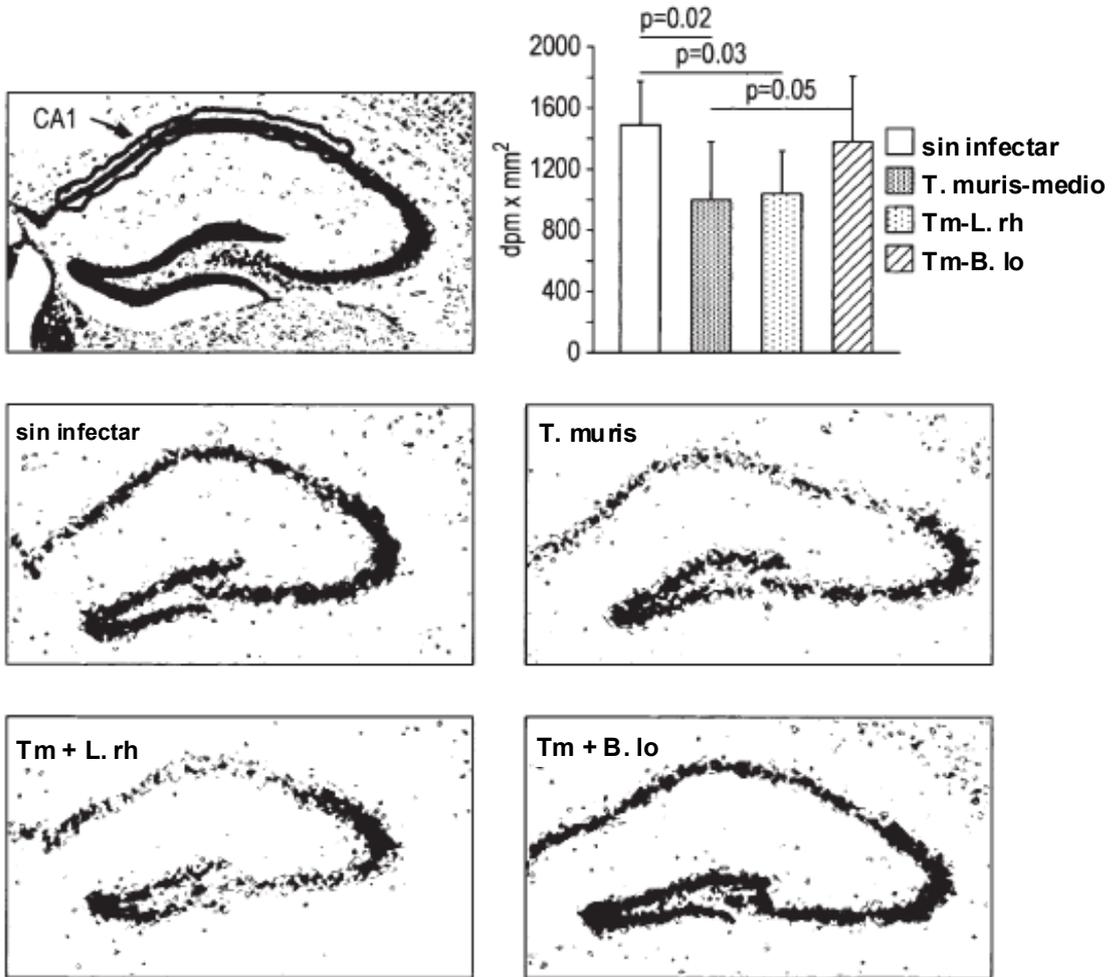


FIG. 2



**Figura 3**  
**Inflamación del colon**

