

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 190**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
A61K 35/744 (2015.01)
A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2014 PCT/EP2014/066970**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15018883**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2014 E 14750457 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 3030247**

54 Título: **Probiótico para el llanto infantil excesivo**

30 Prioridad:

09.08.2013 EP 13382324

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.09.2018

73 Titular/es:

AB-BIOTICS S.A. (50.0%)
Parc de recerca UAB-Campus UAB s/n, Edificio Eureka, Bellaterra
08193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona), ES y VENPHARMA LABORATORIOS, S. A. (50.0%)

72 Inventor/es:

CUÑÉ CASTELLANA, JORDI;
LÁZARO MALLÉN, ELISABET y
ESPADALER MAZO, JORDI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 683 190 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

Probiótico para el llanto infantil excesivo

5 La presente invención se refiere a los campos de la medicina, la microbiología y la nutrición y, en particular, a una nueva composición probiótica basada en células de *Pediococcus pentosaceus*. Debido a sus biofuncionalidades, la composición es especialmente útil en la mejora del llanto excesivo en los bebés.

Antecedentes de la invención

10 El llanto excesivo es una de las causas más frecuentes de las visitas al pediatra en los doce primeros meses de vida del bebé. Su tasa de incidencia puede alcanzar valores de hasta 40 %. Los bebés cuyo llanto persiste más de tres meses corren el riesgo de resultados negativos en los años de escolarización, como ansiedad, agresividad, hiperactividad, alergias, trastornos del sueño e incluso riesgo de mala salud mental en los años posteriores. El llanto excesivo no sólo es un problema grave para los bebés, sino también para los padres y, en general, para la calidad de la vida familiar. El llanto excesivo conduce al agotamiento parental y tiene muchas consecuencias perjudiciales incluyendo dificultades para la concentración, pérdida de la paciencia, frustración, sensación de incompetencia, miedo de lesionar al niño, interrupción temprana de la lactancia materna y reducción de la interacción cara a cara con el niño. 15 Por otra parte, en algunos casos la frustración puede dar lugar a algunos tipos de acciones para parar el llanto que son perjudiciales, tales como dar una palmada o sacudir el niño.

20 A pesar de que el llanto infantil se asocia por lo general con enfermedad evidente, el llanto excesivo paroxismal puede manifestarse sin motivo obvio en bebés aparentemente sanos y bien alimentados, como resultado de diferentes condiciones de etiología desconocida (p.ej., cólicos infantiles). Hay poco acuerdo sobre el origen de estas condiciones y cómo deben ser definidas. Sin embargo, se ha propuesto que podrían estar causadas por trastornos gastrointestinales, tales como inmadurez del intestino, colon espástico, hipersensibilidad a los alimentos, alteración de la microbiota intestinal y producción de gas.

25 Tradicionalmente, se han utilizado distintos tratamientos farmacológicos para la reducción del llanto y la agitación, sobre todo en los "bebés con cólicos". Uno de los fármacos más comúnmente usados es la simeticona, pero los resultados de los ensayos clínicos no son concluyentes. Otros tratamientos basados en hidrocloreto de dicitolmina o bromuro de cimetropio, han demostrado ser más efectivos, pero pueden dar lugar a efectos secundarios no deseados, lo que limita su uso, especialmente en los bebés menores de 6 meses de edad.

30 Los remedios a base de hierbas se han propuesto como alternativa, aunque la evidencia científica es escasa. La composición comercialmente disponible ColiMil® (con extractos de plantas de *Matricaria recutita*, *Foeniculum vulgare* y *Melissa officinalis*) ha demostrado reducir el tiempo de llanto en un ensayo clínico doble ciego con placebo. Por el contrario, se ha descrito que extractos de *Mentha piperita* son ineficaces en el tratamiento del cólico infantil. Por otra parte, se han identificado varios efectos adversos, incluyendo vómitos, somnolencia, estreñimiento y pérdida de apetito en varios estudios que evalúan los complementos de hierbas.

35 Se ha visto que las fórmulas infantiles destinadas a superar alergias a los alimentos (es decir, las fórmulas con bajo contenido en lactosa o proteínas de suero de leche parcialmente hidrolizadas) reducen los episodios de llanto. Sin embargo, estas fórmulas quizás benefician a aquellos bebés cuyo llanto excesivo se asocia principalmente a las alergias alimentarias. También se han propuesto como un posible tratamiento fórmulas enriquecidas con fibra o fórmulas con alto contenido en fibra, pero no se han encontrado diferencias significativas en los síntomas cuando se comparan con una fórmula estándar.

40 Basado en la hipótesis de que la microflora intestinal aberrante puede contribuir a las afecciones de llanto excesivo, ha surgido un gran interés en los probióticos como tratamiento prometedor. Los probióticos son definidos como "microorganismos vivos que cuando se ingieren en ciertas cantidades, ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición inherente básica". Varias bacterias del ácido láctico y especies del género *Bifidobacterium* o *Lactobacillus* son probióticas, lo que implica que se ha demostrado que promueven beneficios específicos para la salud. Las bacterias probióticas deben cumplir varios requisitos relacionados con la ausencia de toxicidad, la viabilidad, la adhesión y efectos beneficiosos. Estas características probióticas son dependientes de la cepa, incluso entre las bacterias de la misma especie. Por lo tanto, es importante encontrar aquellas cepas con las funciones probióticas deseadas. 45

50 Para el tratamiento del llanto excesivo se han estudiado pocas composiciones probióticas. Se ha estudiado la eficacia de una fórmula probiótica que comprende *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* LC705, *Bifidobacterium breve* Bbi99 y *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, sin resultados satisfactorios en los patrones de llanto (Mentula, S. et al. "Microbial composition and fecal fermentation end products from colicky infants - A probiotic supplementation pilot", *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008, vol. 20, no. 1, pp. 37-47). Otro estudio evaluó el efecto sobre el cólico de una fórmula enriquecida con alfa-lactoalbúmina y suplementada con probiótico (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium infantis*). La fórmula redujo los efectos secundarios gastrointestinales relacionados con la alimentación, la irritabilidad y agitación, pero no se encontraron diferencias en la duración del llanto (Dupont, C. et al. "A-Lactalbumin-Enriched and Probiotic-Supplemented Infant Formula in Infants with Colic: Growth and Gastrointestinal Tolerance" *European Journal of Clinical Nutrition* 2010, vol. 64, no. 7, pp. 765- 55

767). Los efectos beneficiosos de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 para el tratamiento del llanto excesivo relacionado con el cólico se han descrito en WO2007142596. La eficacia de esta cepa fue ensayada con resultados favorables en llanto infantil (Savino, F. *et al.* "*Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) versus Simethicone in the Treatment of Infantile Colic: A Prospective Randomized Study" *Pediatrics* 2007, vol. 119, no.1: e124-e130; Savino, F. *et al.* "*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial" *Pediatrics* 2010, vol. 126, no. 3: e526-e533; Szajewska, H. *et al.* "*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the Management of Infantile Colic in Breastfed Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", *Journal of Pediatrics* 2012, vol. 162, no. 2, pp. 257-262), pero fue incapaz de mejorar la biodiversidad intestinal (Roos, S. *et al.* "454 Pyrosequencing Analysis on Faecal Samples from a Randomized DBPC Trial of Colicky Infants Treated with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938", *PLoS ONE* 2013, vol. 8, no. 2, e56710 1-5).

En un artículo reciente sobre el estudio de la microbiota intestinal de los lactantes con cólico, se ha propuesto que el llanto excesivo puede ser causado por un aumento de la inflamación debido a un mayor nivel de agentes patógenos y a una reducción de lactobacilos anti-inflamatorios (De Weerth, C. *et al.* "Intestinal Microbiota of Infants With Colic: Development and Specific Signatures" *Pediatrics* 2013, vol. 131, no 2, e550–e558).

15 WO2007142596 describe que la cepa de *Lactobacillus reuteri* DSM17938 es útil en el tratamiento de cólicos infantiles, debido a su capacidad para promover altas cantidades de la citoquina antiinflamatoria IL-10.

Pediococcus pentosaceus y *Pediococcus acidilactici* se utilizan comúnmente en la fermentación de vegetales y carnes y se añaden en piensos como conservantes alimentarios para inhibir el crecimiento de bacterias que estropean los alimentos y de patógenos transmitidos por los alimentos. Sin embargo, se cree que no hay productos en el mercado basados en *Pediococcus pentosaceus* para su uso como probióticos en humanos.

Se ha sido descrito una cepa de *Pediococcus pentosaceus* derivada de una planta como inductora de los niveles de secreción de interferón-gamma y la interleucina IL-12 p70, y supresora de la producción de IL-4 en células de bazo de ratón sensibilizadas con ovoalbúmina. Por lo tanto, las bacterias podían estimular eficazmente las actividades inmunes y mostraron efectos inhibitorios alérgicos debido a la inducción de estas citoquinas pro-inflamatorias (Jonganurakkun, B. *et al.* "*Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2008 vol.106, no 1, pp. 69-73).

En la misma dirección, Igarashi T. 2010 describe que la cepa *Pediococcus pentosaceus* (KKM122) induce fuertemente la producción de la citocina pro-inflamatoria IL-12 (Igarashi T. "Study of the relationship between changes in lactic acid bacterial cell components and stimulation of IL-12 production under salt-stressed conditions", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2010, vol. 74, pp. 2171-2175).

Vitali *et al.* 2012 describen un estudio de 48 cepas de bacterias del ácido láctico pertenecientes a diferentes especies, por su capacidad para modular la síntesis de 27 mediadores inmunológicos (citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento). Entre estos mediadores inmunológicos, el ensayo se preparó para poder detectar IL-10. El ensayo se realizó con células Caco-2 y PBMC estimuladas con LPS. Los resultados indicaron que se estimularon algunas quimiocinas. Mediadores inmunológicos con actividad pro-inflamatoria (IL-17, eotaxina e interferón-gamma) fueron estimulados significativamente por todas las cepas, seguidos de la citoquina IL-1beta, la quimiocina proteína-10 inducida por interferón-gamma (IP-10), la citocina IL-6, y la quimiocina proteína 1alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1alfa). Sólo unas pocas cepas aumentaron la síntesis de citocinas con actividad anti-inflamatoria. Entre las cepas analizadas, una cepa de *Pediococcus pentosaceus* aislada de tomate estimuló las citocinas IL-1beta, IL-4, IL-17, e interferón-gamma, pero no IL-10. Basándose en la actividad de inmuno-modulación de esta cepa no se seleccionó en este estudio para su caracterización adicional como nuevo posible probiótico (Vitali, B. *et al.* "Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables", *Food Microbiology* 2012, vol. 31 no. 1, pp. 116-125).

Por lo tanto, es evidente que el llanto excesivo paroxismal puede tener consecuencias inmediatas y muy graves, tanto para los padres como los bebés. Así pues, se necesitan composiciones y tratamientos seguros y eficaces. En este campo, los probióticos pueden considerarse una alternativa prometedora a las terapias actuales, pero se necesita más investigación.

Compendio de la invención

El problema a resolver por la presente invención es proporcionar nuevas composiciones y remedios útiles en la mejora del llanto excesivo en los bebés.

50 La solución se basa en nuevas cepas de *Pediococcus pentosaceus* que los inventores han encontrado que tienen biofuncionalidades relevantes útiles en la mejora del llanto excesivo en los bebés.

Es importante tener en cuenta en primer lugar que las bacterias más comúnmente utilizadas en las formulaciones probióticas son de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacteria*. Por tanto, el género *Pediococcus* es muy raramente usado como probiótico y aún más inusual en bebés.

55 Como se mencionó anteriormente la técnica anterior ha descrito que el llanto excesivo puede ser causado por un aumento de la inflamación debida a un aumento del nivel de agentes patógenos y por una reducción de lactobacilos

anti-inflamatorios. También se ha descrito que el *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (derivado de *L. reuteri* ATCC 55730) es útil en el tratamiento del cólico infantil por su capacidad para promover altas cantidades de la citocina antiinflamatoria interleucina-10 (IL-10). Por lo tanto, parece que la capacidad de aumentar las cantidades de IL-10 está relacionada con la mejora del llanto.

5 Sin embargo, se cree que la técnica anterior no ha descrito una cepa de *Pediococcus pentosaceus* con esta característica. De hecho, la técnica anterior relevante describe cepas de *Pediococcus pentosaceus* que tienen características que van en la dirección completamente opuesta a la de la presente invención. Por lo tanto, la capacidad de inducir la producción de IL-10 no es una característica intrínseca o inherente de las bacterias *Pediococcus pentosaceus*. Por ejemplo, Igarashi T. 2010 describe una cepa de *Pediococcus pentosaceus* (KKM122) que induce fuertemente la producción de la citocina pro-inflamatoria IL-12, lo que causa inflamación, que es el efecto contrario al de la presente invención. Además, Vitali et al. 2012 describen un extenso estudio que permite la determinación de 27 mediadores inmunológicos incluyendo IL-10. Sin embargo, sólo unas pocas cepas aumentaron la síntesis de citocinas con actividad anti-inflamatoria y aunque una cepa de *Pediococcus pentosaceus* aislada de tomate estimuló las citocinas IL-1beta, IL-4, IL-17 e interferón-gamma, no tuvo ningún efecto sobre IL-10. Es importante mencionar que el ensayo utilizado en Vitali et al. 2012 para determinar la IL-10 es muy similar al descrito en la presente invención, pero sorprendentemente, ninguna cepa de *Pediococcus pentosaceus* con capacidad de inducir IL-10 se identificó en Vitali et al. 2012.

20 En resumen, buscando en el estado de la técnica bacterias que tengan esta propiedad, *Pediococcus pentosaceus* no se encuentra entre las especies bacterianas que tienen esta propiedad. Por lo tanto, se cree que ningún documento del estado de la técnica describe una composición bacteriana que comprenda 10^4 a 10^{12} ufc/g de células de *Pediococcus pentosaceus* que tienen la capacidad de inducir la producción de IL-10 para reducir la inflamación en el tracto intestinal, tal y como se describe en este documento.

25 Sorprendentemente, los inventores han encontrado una cepa de *Pediococcus pentosaceus* que tiene la capacidad de inducir la producción de IL-10. Considerando el estado de la técnica, no podía saberse que las bacterias de *Pediococcus pentosaceus* tienen estas características.

Por lo tanto, en este documento se proporciona la cepa de *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330. Además, por medio del método de cribado descrito aquí en detalle, es plausible identificar y aislar cepas de *Pediococcus pentosaceus* diferentes de la cepa CECT 8330 dentro de un grupo de células de *Pediococcus pentosaceus*, con la misma capacidad para inducir la producción de IL-10.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona como un aspecto, la cepa de *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330. La invención describe ciertas características biológicas en las bacterias que son relevantes para la mejora del llanto excesivo; es decir, la capacidad para inducir la producción de IL-10 como la característica más relevante. Aquí se demuestra por medio de los ejemplos que esta característica se relaciona plausiblemente con la mejora del llanto excesivo en los bebés. Por lo tanto, aunque haya sido identificada una cepa de *Pediococcus pentosaceus* con esta característica (CECT 8330), sin estar limitado a la teoría, no hay razón para limitar el alcance de la invención a dicha cepa porque todas las etapas del método para obtener otras buenas cepas se describen plausiblemente aquí. Por lo tanto, la invención también proporciona un conjunto de cepas de *Pediococcus pentosaceus* diferentes de la cepa CECT 8330 que tienen la misma característica. No todas las cepas pertenecientes a las especies de *Pediococcus pentosaceus* tendrán la capacidad de inducir IL-10. La invención proporciona un método para reconocerlas.

40 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición bacteriana que comprende de 10^4 a 10^{12} ufc/g de células viables de *Pediococcus pentosaceus* que tienen la capacidad de inducir la producción de interleucina-10, donde la producción de interleucina-10 por macrófagos THP-1 en presencia de células de *Pediococcus pentosaceus* expresada como incremento normalizado es superior a la producción de interleucina-10 por el control negativo, que son macrófagos THP-1 en ausencia de células de *Pediococcus pentosaceus*, cuando el incremento normalizado se determina mediante las siguientes etapas:

(a) diferenciar monocitos THP-1 en macrófagos mediante el crecimiento de la línea celular de monocitos THP-1 de la colección de células de Public Health England, número de catálogo 88081201, en medio RPMI 1640 de Roswell Park Memorial Institute con suero bovino fetal (FBS) al 10 %, y con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) hasta una concentración final de 0,16 μ M;

50 (b) crecer los macrófagos THP-1 en medio RPMI 1640 con FBS al 10 % en placas ELISA de 24 pocillos hasta una concentración final de 10^6 macrófagos/pocillo;

(c) incubar durante 2,5 horas los macrófagos THP-1 con lipopolisacárido (LPS) a una concentración final de 10 ng/mL, y lavar los macrófagos THP-1 con el medio solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS);

55 (d) tener preparado un cultivo de células de *Pediococcus pentosaceus* obtenido haciendo crecer las células en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) durante una noche a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5 %;

(e) añadir a cada pocillo ELISA, 500 µL de medio RPMI 1640 con FBS al 10 % y una cantidad apropiada de una dilución de células de *Pediococcus pentosaceus* hasta obtener una relación final de 25:1, es decir, $2,5 \times 10^7$ ufc de células de *Pediococcus pentosaceus*: 10^6 macrófagos THP-1;

5 (f) incubar los macrófagos THP-1 con células de *Pediococcus pentosaceus* durante 2,5 horas a 37 °C o sin las células de *Pediococcus pentosaceus* en las mismas condiciones como control negativo;

(g) lavar los macrófagos THP-1 con medio D-PBS para eliminar las células de *Pediococcus pentosaceus*, posteriormente añadir a los macrófagos THP-1, medio RPMI 1640 con FBS al 10 % suplementado con 50 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de ampicilina y 12 µg/mL de cloranfenicol, incubar a 37 °C con CO₂ al 5-7 % y tomar partes alícuotas a las 5 y a las 24 horas;

10 (h) centrifugar las partes alícuotas y ensayar los líquidos sobrenadantes para la cuantificación de interleucina-10 mediante citometría de flujo; y

(i) calcular el incremento normalizado de la concentración de interleucina-10, con la fórmula $(IL_{10_{24h}} - IL_{10_{5h}}) / IL_{10_{5h}}$; donde IL_{10_{5h}} y IL_{10_{24h}} es la concentración de interleucina-10 en pg/mL a 5 y 24 horas, respectivamente.

15 Por lo tanto, basado en el detallado ensayo descrito en este documento (véase el Ejemplo 1 para el ensayo de inducción de IL-10) la persona experta es capaz de repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si el *Pediococcus pentosaceus* de interés cumple con los niveles de IL-10 del primer aspecto de la invención. Dentro de las células de *Pediococcus pentosaceus* que cumplen con los niveles de inducción de IL-10, se proporciona aquí la cepa *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 depositada.

20 La nueva composición bacteriana como se describe en este documento es útil como un complemento probiótico para los humanos y en particular para los bebés. En consecuencia, un segundo aspecto de la invención se refiere a la composición bacteriana como se define en este documento para su uso en la mejora del llanto excesivo en los bebés. En este sentido, se cree que ninguna técnica anterior ha descrito células de *Pediococcus pentosaceus* para usar en la mejora del llanto excesivo en los bebés.

25 Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de una composición bacteriana como se define en el primer aspecto de la invención para la fabricación de un complemento alimenticio, un medicamento, una fórmula infantil, un producto comestible o un producto alimenticio para la mejora del llanto excesivo en los bebés. Esto puede formularse alternativamente como un método para mejorar el llanto excesivo en los bebés, que comprende la administración a dicho bebé de una cantidad efectiva de la composición bacteriana como se define en el primer aspecto de la invención.

30 Otro aspecto de la invención es la composición bacteriana definida aquí para su uso como medicamento.

El término "cantidad efectiva" como se usa aquí es la cantidad de unidades formadoras de colonias (ufc) para cada cepa en la composición que es suficientemente elevada para modificar significativamente la afección a tratar de manera positiva, pero suficientemente baja para evitar efectos adversos graves (en una relación beneficio / riesgo razonable), dentro del alcance del buen juicio médico.

35 Un tercer aspecto de la invención se refiere a la cepa de *Bifidobacterium longum* CECT 7894.

Finalmente, un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para cribar y aislar nuevas células de *Pediococcus pentosaceus*, que comprende las siguientes etapas:

40 (i) ensayar nuevas células de *Pediococcus pentosaceus* de un conjunto de células de *Pediococcus pentosaceus* para determinar su capacidad de inducir la producción de IL-10 siguiendo las etapas del ensayo de inducción de IL-10 como se describen arriba; y

(ii) seleccionar y aislar del conjunto las nuevas células de *Pediococcus pentosaceus* que induzcan una producción de IL-10, expresada como incremento normalizado, superior al incremento normalizado del control negativo, cuando el incremento normalizado se determina siguiendo las etapas del ensayo de inducción de IL-10.

45 Es evidente para la persona experta que una vez que los inventores del presente documento han descrito el ensayo relevante y la cepa depositada CECT 8330, que cumple con los niveles de inducción de IL-10, seleccionar otras nuevas células de *Pediococcus pentosaceus* que cumplan con los criterios del primer aspecto de la invención será un trabajo rutinario para el experto en la materia.

Descripción detallada de la invención

50 El término "composición bacteriana" se entiende según la técnica como una composición que comprende un número de células bacterianas donde de 10^4 a 10^{12} ufc/g son células de *Pediococcus pentosaceus* con la característica de interés de acuerdo con el primer aspecto. La composición bacteriana puede contener aditivos tales como vehículos o excipientes. La composición bacteriana se envasa en un recipiente adecuado.

El término "ufc/g" se refiere al peso en gramos de la composición como tal, incluidos los aditivos relevantes presentes en la composición. No incluye el peso de un recipiente adecuado que se utiliza para envasar la composición bacteriana.

5 El primer aspecto de la invención se refiere a una composición bacteriana que comprende de 10^4 a 10^{12} ufc/g de células de *Pediococcus pentosaceus* que tienen la capacidad de inducir una producción de interleucina-10 por macrófagos THP-1 superior a la producción de interleucina-10 por macrófagos THP-1 en ausencia de células de *Pediococcus pentosaceus*, cuando el incremento normalizado se determina mediante las etapas descritas anteriormente.

10 IL-10, también conocida como factor inhibidor de la síntesis de citocinas humano (CSIF, en inglés), es una citocina antiinflamatoria que inhibe la síntesis de un número de citocinas, incluyendo IFN-gamma, IL-2, IL-3, TNF y GM-CSF producida por macrófagos activados y por células T cooperadoras. El término citocina se refiere a una pequeña molécula de señalización que se utiliza para la señalización celular. Las citocinas se pueden clasificar como proteínas, péptidos o glicoproteínas. En este caso, la IL-10 es una citoquina proteica con propiedades inmunomoduladoras.

15 En una realización particular, la producción de IL-10 por las células THP-1 en presencia de células de *Pediococcus pentosaceus* expresada como incremento normalizado es al menos 2 veces superior a la producción de interleucina-10 por células THP-1 en ausencia de las células de *Pediococcus pentosaceus*, cuando el incremento normalizado se determina mediante las etapas mencionadas anteriormente. En otras realizaciones particulares, el incremento normalizado es al menos 3, 4, 5 o 6 veces superior al control.

20 Además de la capacidad de inducir la producción de IL-10, las células de *Pediococcus pentosaceus* tienen interesantes propiedades de antagonismo frente a miembros indeseables de las especies bacterianas comúnmente abundantes en los bebés con llanto excesivo (véase el Ejemplo 2). El término "antagonismo" se entiende aquí como la inhibición o reducción del crecimiento bacteriano. Por consiguiente, en otra realización particular, las células de *Pediococcus pentosaceus* de la composición bacteriana tienen la capacidad de antagonizar bacterias intestinales Gram positivas y Gram negativas. Particularmente, las bacterias Gram positivas comprenden bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Clostridium difficile* y *Enterococcus faecalis*. En otra realización particular, las bacterias Gram negativas comprenden bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* y *Bacteroides vulgatus*. En otra realización particular, las células de *Pediococcus pentosaceus* tienen la capacidad de antagonizar *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* y *Bacteroides vulgatus*, donde la capacidad de antagonizar se determina por las siguientes etapas:

(i) sembrar uniformemente cepas patógenas en placas con medio Oxoid y dejar crecer hasta confluencia en una incubadora con CO₂ a las temperaturas y % de CO₂ apropiados para el crecimiento de cada patógeno;

35 (ii) poner dos secciones cilíndricas de 6 mm de diámetro de una placa de agar confluyente sembrada uniformemente de células de *Pediococcus pentosaceus*, en contacto con la placa sembrada de patógeno, confrontando (a) la cara donde han crecido las células de una sección cilíndrica contra la placa sembrada de patógeno; y (b) la cara donde no han crecido las células de la otra sección cilíndrica contra la placa sembrada de patógeno; e incubar durante una noche a 37 °C;

(iii) medir al día siguiente las zonas de inhibición poniendo la placa de agar sobre una regla plana; y

40 (iv) calcular la actividad inhibidora de crecimiento restando el diámetro del cilindro (CD) del diámetro de la zona de inhibición (IZD) medido en centímetros y dividir esta diferencia entre 2, siguiendo la fórmula $GI = (IZD - CD) / 2$.

En una realización particular, las células de *Pediococcus pentosaceus* son de *Pediococcus pentosaceus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8330.

***Pediococcus pentosaceus* CECT 8330**

45 Una muestra de la nueva cepa de *Pediococcus pentosaceus* se ha depositado en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia (España) por el depositante AB-Biotics, S.A., domiciliado en el Edificio Eureka, oficina P1M1.1, Campus UAB, Bellaterra-08193 (España). La cepa fue depositada bajo el número de acceso CECT 8330 con una fecha de depósito de 30 de abril de 2013. El depósito se hizo bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines del Procedimiento en materia de Patentes. La referencia de identificación asignada por el depositante fue F3403.

50 Como se muestra en los siguientes ejemplos, *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 muestra las siguientes propiedades interesantes para la mejora del llanto excesivo en los bebés:

- Capacidad de inducir la producción de IL-10 como se muestra en la Tabla 1, Ejemplo 1.

- Actividad inhibidora contra todo el espectro de patógenos estudiados (Tabla 2, Ejemplo 2). La cepa es eficaz para inhibir no solo las bacterias Gram positivas, sino también las Gram negativas. Esto es de gran interés, ya que proporciona protección contra las bacterias tales como *E. coli*, *Klebsiella* y *Clostridium spp.* que son anormalmente abundantes en los bebés que presentan llanto excesivo.

- 5 • No produce etanol ni CO₂, por tanto, no causa malestar a los bebés en este sentido.

Además, la cepa CECT 8330 tiene la ventaja de ser particularmente útil como probiótico. Las bacterias probióticas deben cumplir varios requisitos relacionados con la ausencia de toxicidad, la viabilidad, la adhesión y efectos beneficiosos. Las propiedades de cada cepa bacteriana son únicas y no pueden ser extrapoladas a otras cepas de la misma especie. Por lo tanto, es importante encontrar aquellas cepas que tengan un mejor rendimiento en todos los requisitos de un probiótico. Para asegurarse que la cepa CECT 8330 era capaz de superar el tracto gastrointestinal (GI), se desarrolló un protocolo *in vitro* imitando las condiciones del tracto gastrointestinal. Se cuantificó la supervivencia después del tratamiento con lisozima, peróxido de hidrógeno, ambiente ácido y sales biliares. Se trata de un experimento confirmatorio ya que las cepas se aislaron a partir de heces humanas utilizando diluciones muy altas y su presencia en las heces es alta. Los resultados indican que la cepa es capaz de sobrevivir al paso por el tracto GI.

La cepa CECT 8330 también se ensayó para determinar su capacidad para colonizar el tracto intestinal. Este es un punto crítico ya que asegura que las biofuncionalidades observadas pueden ser desarrolladas por la cepa. En el desarrollo experimental se utilizaron células de mucus intestinal y Caco-2, que imitan los sitios de anclaje al colon de las cepas probióticas. Se midió la capacidad de adhesión de la cepa mediante contador de centelleo de timidina marcada con tritio y se comparó con los de la cepa *Lactobacillus reuteri* utilizada como control. La adhesión a las células del mucus y a Caco-2 fue $1,40 \times 10^6$ y $4,5 \times 10^6$ ufc/cm² respectivamente (*L. reuteri*: $6,58 \times 10^6$ y $1,01 \times 10^6$ ufc/cm²). Por lo tanto, los resultados indican que CECT 8330 tiene una buena adhesión al epitelio intestinal, comparable a la de *L. reuteri*, que le permite permanecer en el tracto intestinal y ejercer sus efectos probióticos.

La cepa CECT 8330 tiene un buen crecimiento en medio industrial.

Además, la cepa CECT 8330 pertenece a una especie bacteriana que tiene estatus QPS (Andreoletti, O. *et al.* "The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Question no: EFSA-Q-2008-006", *The EFSA Journal* 2008 vol. 923, pp. 1-48). QPS ("Qualified Presumption of Safety", en inglés) es un sistema desarrollado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para conceder este estatus a unidades taxonómicas con una amplia historia probada de uso aparentemente seguro.

30 ***Bifidobacterium longum* CECT 7894**

En otra realización particular, la composición bacteriana además comprende de 10^4 a 10^{12} ufc/g de células de *Bifidobacterium longum* CECT 7894.

Una muestra de la nueva cepa de *Bifidobacterium longum* se ha depositado en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de València, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia (España) por el depositante AB-Biotics, S.A., domiciliado en el Edifici Eureka, oficina P1M1.1, Campus UAB, Bellaterra-08193 (España). La cepa fue depositada bajo el número de acceso CECT 7894 con una fecha de depósito de 30 de marzo de 2011. El depósito se hizo bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines del Procedimiento en materia de Patentes. La referencia de identificación asignada por el depositante fue Bif F2.

La cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7894 tiene también propiedades interesantes para la mejora del llanto excesivo en los bebés, como se muestra en los Ejemplos:

- Capacidad de inducir la producción de IL-10 como se muestra en la Tabla 1, Ejemplo 1.
- Actividad inhibidora contra todo el espectro de patógenos estudiados (Tabla 2, Ejemplo 2). La cepa es eficaz para inhibir no solo las bacterias Gram positivas, sino también las Gram negativas. Véanse los comentarios para la cepa CECT 8330.
- No produce etanol ni CO₂, por tanto, no causa malestar a los bebés en este sentido.

Como con la cepa *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330, *Bifidobacterium longum* CECT 7894 también se ensayó para determinar su capacidad para superar el tracto gastrointestinal (GI). Los resultados indicaron que la cepa es capaz de sobrevivir al paso por el tracto GI.

La cepa CECT 7894 también se ensayó para determinar su capacidad para colonizar el tracto intestinal, siguiendo el ensayo antes mencionado para *Pediococcus pentosaceus*. Para la cepa CECT 7894, la adhesión a células del mucus y a células Caco-2 fue $1,21 \times 10^5$ y $1,18 \times 10^6$ ufc/cm², respectivamente (*L. reuteri*: $6,58 \times 10^6$ y $1,01 \times 10^6$ ufc/cm²). Por lo tanto, los resultados indican que CECT 7894 tiene una buena adhesión al epitelio intestinal, comparable a la de *L. reuteri*, que le permite permanecer en el tracto intestinal y ejercer sus efectos probióticos.

La cepa CECT 7894 tiene también un buen crecimiento en medio industrial.

Por lo tanto, ambas cepas, *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 y *Bifidobacterium longum* CECT 7894 comparten varias propiedades funcionales que las hace adecuadas para su uso en la mejora del llanto excesivo en los bebés, mediante el uso de las cepas por separado o juntas en una única fórmula. Entre otras propiedades, los dos tienen la capacidad de inducir la producción de IL-10, y son eficaces inhibiendo el crecimiento de bacterias intestinales (Gram positivas, pero también Gram negativas).

Además, las cepas tienen la ventaja de que no producen gases. Las bacterias heterofermentativas producen CO₂ y etanol, así como ácido láctico, por fermentación de la glucosa. El etanol podría influir en la motilidad intestinal produciendo la distensión abdominal característica de los bebés con cólicos. El CO₂ puede producir meteorismo (acumulación de gases) y flatulencia, también típicos de los bebés con cólicos. Se ha descrito una mayor presencia de cepas heterofermentativas en bebés con cólicos. Por el contrario, las cepas de la invención no producen etanol ni CO₂, por tanto, no causan malestar a los bebés en este sentido.

Como será evidente para el experto en la técnica, *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 y *Bifidobacterium longum* CECT 7894 son eficaces cuando se usan por sí mismas o cuando se combinan en una única composición. También pueden administrarse en dos composiciones diferentes administradas simultáneamente, secuencialmente o por separado después de un cierto período de tiempo.

Teniendo en cuenta las propiedades descritas anteriormente, la composición bacteriana ejerce una mejora fisiológica en las causas antes mencionadas del llanto que conduce a una mejoría de algunos de los síntomas clínicos relacionados con el llanto excesivo. En consecuencia, la composición bacteriana de la invención es especialmente útil en la mejoría del llanto excesivo en los bebés. El término "llanto excesivo" se entiende aquí como un llanto intenso, persistente e inconsolable, problemático para el normal funcionamiento de la unidad familiar, que implica por lo menos 60 minutos al día (en 3 o más episodios) observados durante al menos 1 semana.

El término "infante" se entiende en esta descripción como relacionado con los descendientes más jóvenes de un ser humano o animal. Cuando se aplica a los seres humanos, el término se considera sinónimo al término "bebé". El término "niño" se refiere a un ser humano entre las etapas del nacimiento y la pubertad. "Niño" también describe una relación con un progenitor, como sinónimo de "hijo" e "hija". Sin embargo, en esta descripción, los términos "infante", "bebé" y "niño" se consideran sinónimos y se usan indistintamente.

En una realización particular, la composición bacteriana de la invención es útil en la mejora del llanto excesivo asociado al cólico infantil. El término "cólico infantil" se entiende aquí como un llanto inexplicable e inconsolable ("agitación"), que causa angustia a los padres. El término "agitación" ("fussy", término original en inglés) es una medida muy subjetiva debido a la dificultad por parte de los padres y los médicos para clasificar el tipo de llanto. Además, el comportamiento de llanto excesivo (fácil de calmar o no) puede ser indicativo de un cólico. Por consiguiente, uno de los criterios de inclusión más citados en bebés con cólicos se basa en una regla de tiempo (es decir, basada en los criterios de Wessel) como: más de 3 horas de llanto al día durante al menos 1 semana (Savino, F. *et al.* 2010 *supra*).

En otra realización de la invención, los bebés tienen una edad de entre tres semanas y doce meses.

Para evaluar la eficacia y la seguridad de un producto basado en una mezcla de las cepas CECT 8330 y CECT 7894, se llevó a cabo un ensayo clínico piloto con 20 bebés (véase el Ejemplo 7). El placebo y la mezcla de las cepas fueron administrados una vez al día (5 gotas/día) durante 14 días. Como se puede observar en la FIG. 3, la fórmula probiótica causó una mayor reducción en el tiempo de llanto medio diario y en la duración de cada episodio. No se observaron efectos adversos en el grupo placebo ni en el del probiótico, confirmando que la fórmula probiótica puede considerarse segura. Por lo tanto, la mezcla de las cepas es útil para mejorar los patrones de llanto.

Dadas las relevantes propiedades de la composición bacteriana explicadas más arriba, se deriva que la administración de la composición bacteriana, también es útil para tratar otras afecciones caracterizadas por trastornos gastrointestinales asociados a la inflamación como consecuencia de la inmadurez del sistema inmune; para tratar la hipersensibilidad intestinal y para equilibrar el exceso de bacterias indeseables en el intestino.

Teniendo en cuenta las propiedades mencionadas anteriormente, las cepas CECT 8330 y 7894 tienen un mejor rendimiento para los parámetros estudiados que son relevantes para el llanto excesivo en comparación con cepas comerciales conocidas en la técnica. Como se muestra a continuación en los ejemplos, la cepa CECT 8330 mostró un mejor incremento normalizado en relación con la inducción de la producción de IL-10, en comparación con la de la cepa de *Lactobacillus reuteri*. Además, las cepas de la invención muestran actividad inhibitoria frente a todo el espectro de agentes patógenos estudiados. Las cepas de la invención fueron efectivas inhibiendo no solo bacterias Gram positivas sino también Gram negativas. Este no fue el caso de *L. reuteri* que fue ineficaz inhibiendo el crecimiento de *E. coli* y *B. vulgatus*. Esto es de gran interés ya que cantidades anormales de bacterias tales como *E. coli* se presentan comúnmente en bebés que presentan llanto excesivo. También cabe destacar que, en general, CECT 8330 y especialmente CECT 7894, fueron más eficaces inhibiendo el crecimiento de casi todas las bacterias patógenas en comparación con *L. reuteri*. Por otra parte, las cepas CECT 8330 y CECT 7894 no produjeron gases, mientras que *L. reuteri* produjo gases.

Ensayo para medir la inducción en la producción de IL-10

El Ejemplo 1 de este documento proporciona una descripción detallada de un ensayo adecuado para medir la inducción de la producción de IL-10, como se refiere en las etapas (a)-(i) del primer aspecto de la presente invención. Es importante observar que las descripciones y las condiciones del ensayo de inducción de IL-10 descritos en las etapas (a)-(i) del primer aspecto y en el Ejemplo 1, no limitan el alcance de la invención. Dicho ensayo es un ensayo adecuado para poner a prueba la capacidad de las células de *Pediococcus pentosaceus* para inducir la producción de IL-10. Las condiciones detalladas de este Ejemplo 1 representan un ensayo preferido para determinar si las células de *Pediococcus pentosaceus* de interés cumplen con los criterios del primer aspecto.

Por consiguiente, en base al ensayo detallado que se describe en este documento la persona experta es capaz de repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si células de *Pediococcus pentosaceus* de interés cumplen con la inducción en la producción de IL-10 del primer aspecto.

Cuando se utiliza el ensayo descrito, de acuerdo con el primer aspecto, los niveles de IL-10 producidos por las células THP-1 en presencia de células de *Pediococcus pentosaceus* expresados como incremento normalizado son superiores al control. El control tal como se entiende en este documento y de acuerdo con el primer aspecto es el incremento normalizado de la IL-10 producida por las células THP-1 en ausencia de las células de *Pediococcus pentosaceus*. En una realización particular, los niveles de IL-10 producidos por las células THP-1 en presencia de *Pediococcus pentosaceus* son al menos 2 veces el nivel del control. En otras realizaciones particulares, el incremento normalizado es al menos 3, 4, 5 o 6 veces mayor que el del control.

Ensayo para medir la capacidad antagonista contra bacterias intestinales

El Ejemplo 2 de este documento proporciona una descripción detallada de un ensayo adecuado para medir la capacidad de las células de *Pediococcus pentosaceus* para antagonizar bacterias intestinales, como se refiere en una realización de la invención. Es importante observar que las descripciones y las condiciones del ensayo descritas en el Ejemplo 2 no limitan el alcance de la invención. El ensayo es uno adecuado para poner a prueba la capacidad de las células de *Pediococcus pentosaceus* para antagonizar bacterias intestinales.

Por consiguiente, en base a la descripción detallada del ensayo en este documento la persona experta es capaz de repetir rutinariamente este ensayo para determinar objetivamente si células de *Pediococcus pentosaceus* de interés cumplen con el espectro bacteriano detallado más arriba, es decir, son capaces de antagonizar *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* y *Bacteroides vulgatus*.

Composiciones y formas de administración

En una realización particular de la invención, la composición bacteriana como se define anteriormente está en una forma seleccionada del grupo que consiste en un complemento alimenticio, un medicamento, una fórmula infantil, un producto comestible y un producto alimenticio.

La composición bacteriana de la invención puede prepararse en cualquier forma adecuada que no afecte negativamente a la viabilidad de las células bacterianas que forman la composición de la invención. La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para la formulación en vista del propósito particular de la composición está dentro del alcance de las personas expertas en la técnica con conocimientos ordinarios de la tecnología farmacéutica y alimentaria.

La composición bacteriana de acuerdo con la invención se puede formular en una forma en la que las células bacterianas sean el único agente activo o estén mezclados con uno o más de otros agentes activos y/o estén mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables o aditivos o ingredientes adecuados en el caso de un producto alimenticio. En una realización particular de la invención, la composición adicionalmente contiene uno o más agentes activos adicionales. Preferiblemente, el agente o agentes activos adicionales son otras bacterias probióticas que no son antagonistas para las células bacterianas que forman la composición de la invención. Dependiendo de la formulación, las células bacterianas se pueden añadir como bacterias purificadas, como un cultivo bacteriano, como parte de un cultivo bacteriano, como un cultivo bacteriano que ha sido post-tratado, y solo o junto con vehículos o ingredientes adecuados. También se pueden añadir prebióticos.

La composición bacteriana puede estar en forma de un producto farmacéutico. El término "producto farmacéutico" se entiende en esta descripción en su sentido amplio, incluyendo cualquier composición que comprende un ingrediente activo - en este caso, las células bacterianas- junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "producto farmacéutico" no se limita a medicamentos. El término "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa aquí se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, humano) sin una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Los vehículos, excipientes, etc., adecuados. se pueden encontrar en los textos farmacéuticos convencionales.

El producto farmacéutico puede adoptar diferentes formas o nombres dependiendo de la ruta de aprobación del producto y también en función del país. Por ejemplo, un medicamento es un producto farmacéutico particular. Un alimento médico se considera en esta descripción como otro producto farmacéutico particular. Los términos "alimento médico" o "alimentos para usos médicos especiales" se utilizan en algunos países para referirse a un alimento especialmente formulado y destinado al tratamiento dietético de una enfermedad que tiene necesidades nutricionales distintivas que no pueden ser satisfechas sólo por la dieta normal. Se definen en normativas tales como la The Food and Drug Administration's 1988 Orphan Drug Act Amendments en los Estados Unidos, y la Directiva de la Comisión 1999/21/CE en Europa. Los alimentos médicos son distintos de la categoría más amplia de complementos alimentarios y de los alimentos tradicionales que tienen asociados una declaración de propiedades saludables. Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención es un alimento médico.

A menudo, las composiciones bacterianas probióticas, tales como la descrita aquí, se consideran complementos alimenticios. Un complemento alimenticio, también conocido como complemento dietético o complemento nutricional se considera otro producto farmacéutico particular. Esta es una preparación destinada a complementar la dieta y proporcionar nutrientes o ingredientes beneficiosos que generalmente no se ingieren en la dieta normal o no pueden ser consumidos en cantidades suficientes. Los complementos alimenticios son sobre todo considerados como productos alimenticios, pero a veces se definen como fármacos, productos naturales para la salud, o productos nutracéuticos. En el sentido de la presente invención, los complementos alimenticios incluyen también nutracéuticos. Los complementos alimenticios se venden generalmente "*over the counter*", es decir, sin receta médica. Si el complemento alimenticio adopta la forma de una píldora o una cápsula, entonces comprende excipientes que son los mismos que los utilizados en medicamentos. Un complemento alimenticio, sin embargo, también puede adoptar la forma de un producto alimenticio que está enriquecido con algunos nutrientes (por ejemplo, una fórmula infantil).

Así, en una realización particular la composición de la invención es un complemento alimenticio y más particularmente un complemento alimenticio para bebés.

La composición de acuerdo con la invención puede administrarse como tal, o mezclarse con un líquido o sólido comestibles adecuados, estar liofilizada en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas, gránulos, polvos, suspensiones, sobres, jarabes o generalmente en forma de una dosis unitaria. También puede estar en forma de monodosis de una composición liofilizada que se presenta acompañada de un recipiente separado de líquido para ser mezclados antes de la administración.

En el contexto de los bebés de muy corta edad, la administración se limita a unas pocas formas de administración. Por lo tanto, en una realización preferida, la composición bacteriana de la invención está en forma de una suspensión oleosa para ser administrada sola o mezclada con un líquido. La suspensión oleosa comprende al menos un aceite comestible, tal como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de linaza, aceite de girasol o aceite de arroz. El aceite está presente en una cantidad de al menos 70 % peso/peso. En una realización particular, la suspensión oleosa comprende también al menos un excipiente que es un agente emulsionante, estabilizador o antiapelmazamiento, en una cantidad de 0,1-15 % peso/peso. Los agentes adecuados son dióxido de silicio, gel de sílice, sílice coloidal, sílice precipitada, talco, silicato de magnesio, lecitina, pectina, almidón, almidones modificados, goma konjac, goma de xantano, goma gellan, carragenano, alginato de sodio, mono- o di-glicéridos de ácidos grasos, tal como monoestearato de glicerol o monooleato de glicerol y ésteres de ácido cítrico de mono- o di-glicéridos.

La suspensión oleosa se prepara de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica y el uso de maquinaria conocida. Una determinada cantidad de aceite se introduce en un recipiente provisto de medios de agitación y calentamiento. Posteriormente, el al menos un excipiente se añade bajo agitación y, si es necesario, con ligero calentamiento hasta una temperatura comprendida entre 20 y 50 °C para evitar la formación de grumos y aglomeraciones hasta homogeneización completa. La suspensión se enfría hasta la temperatura ambiente y las células bacterianas en forma sólida se añaden poco a poco con agitación hasta completa homogeneización de la suspensión.

En particular, la composición bacteriana de la invención está en forma de un complemento alimenticio para bebés, en la forma de suspensión oleosa. En una realización particular, la suspensión oleosa comprende aceite de girasol y sílice coloidal, preferiblemente al 1 % en peso, y las células bacterianas.

En otra realización, la suspensión oleosa comprende aceite de girasol y un agente seleccionado entre lecitina, mono- o di-glicéridos de ácidos grasos, carragenano y alginato de sodio, y las células bacterianas.

La composición bacteriana de la invención también se puede incluir en una variedad de productos alimenticios o productos comestibles, tales como los productos lácteos en el caso de bebés. El término "producto comestible" se usa aquí en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que pueda ser ingerido por un animal; es decir, un producto organolépticamente aceptable. El término "producto alimenticio" se entiende como producto comestible que además proporciona nutrientes para el cuerpo. Productos alimenticios particularmente interesantes son los complementos alimenticios y las fórmulas para bebés. El producto alimenticio preferentemente comprende un material de soporte tal como gachas de harina de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, hidratos de carbono, proteínas y proteínas glicosiladas. En una

realización particular, las células bacterianas de la invención se homogeneizan con otros ingredientes, tales como cereales o leche en polvo para constituir una fórmula para bebés.

5 Por lo tanto, ha de entenderse que la composición bacteriana de la invención es útil en la gestión del llanto excesivo en los bebés, independientemente de la forma de la composición, es decir, independientemente de ser un producto farmacéutico, un medicamento, un producto alimenticio, un producto comestible, un complemento alimenticio o un alimento médico.

Crecimiento de células bacterianas, mutantes y dosis

10 Las bacterias se hacen crecer mediante su cultivo en un medio adecuado y bajo condiciones adecuadas. Las células bacterianas de la invención se pueden cultivar solas para formar un cultivo puro, o como un cultivo mixto junto con otros microorganismos, o mediante el cultivo de bacterias de diferentes tipos por separado y luego combinándolas en las proporciones deseadas. Después del cultivo, la suspensión celular se recupera y se utiliza como tal o tratada de la manera deseada, por ejemplo, mediante concentración, deshidratación, secado por pulverización o liofilización, para ser posteriormente empleados en la preparación de productos farmacéuticos o alimenticios. A veces, la preparación probiótica se somete a un proceso de inmovilización o encapsulación con el fin de mejorar la vida útil. En el estado de la técnica se conocen diversas técnicas para la inmovilización o la encapsulación de bacterias.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a la nueva cepa descrita en este documento o a "un mutante de la misma". Es evidente que usando la cepa depositada como material de partida, el experto en la materia puede de manera rutinaria, por técnicas de mutagénesis convencional o de re-aislamiento, obtener más mutantes o derivados de la cepa que al menos mantengan las características relevantes descritas en este documento y las ventajas de la cepa que forma la composición de la invención. En consecuencia, el término "un mutante de la misma" se refiere a cepas mutantes obtenidas mediante el uso de la cepa depositada como material de partida. En una realización, el mutante se obtiene mediante el uso de tecnología de ADN recombinante. En otra realización del primer aspecto de la invención, el mutante es obtenido por mutagénesis aleatoria. En una realización particular del primer aspecto de la invención, la variante es una variante que se produce naturalmente. Esto se puede formular alternativamente como un método para obtener una cepa, que comprende el uso de una de las cepas depositadas de este documento como cepa de partida, obtener mutantes de la cepa depositada y aislar una nueva cepa en la que el mutante ha conservado las propiedades esenciales de la cepa depositada.

20 La cantidad eficaz de las células bacterianas será determinada por el experto en la técnica y variará en función del objetivo particular a conseguir, la edad y la condición física del paciente que se está tratando, la gravedad de la enfermedad subyacente y la formulación final. Cuando se administran por vía oral, las cepas de la invención están presentes en la composición en una cantidad que proporciona una dosis diaria eficaz de 10^7 a 10^{12} ufc, de acuerdo con la legislación vigente, preferiblemente de 10^9 a 10^{11} ufc. La expresión "unidad formadora de colonias" ("ufc") se define como el número de células bacterianas determinado por los recuentos microbiológicos en placas de agar. Cuando se utilizan en la forma de la composición de la invención, las diferentes cepas están, preferiblemente, en una relación de concentración de 1:1.

30 El uso general de las cepas de la invención es en forma de células viables. Sin embargo, también puede extenderse a células no viables tales como cultivos muertos o lisados celulares (por ejemplo, obtenidos por exposición a pH alterado, ultrasonidos, a radiación, a temperatura o a presión, entre otros medios de matar o lisar las bacterias) o composiciones que contienen factores beneficiosos producidos por las cepas de la invención.

40 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en este documento. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo ilustrativo, y sin intención de ser limitativos para la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Patrones de electroforesis en gel de campo pulsado de ADN genómico digerido con *Sma*-I (izquierda) y *Not*-I (derecha), de izquierda a derecha: *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 (8330), dos cepas de *Pediococcus acidilactici* como controles (1, 2) y el marcador molecular (M).

50 FIG. 2. Patrones de electroforesis en gel de campo pulsado de ADN genómico digerido con *Xba*-I (izquierda) y *Spe*-I (derecha), de izquierda a derecha: *Bifidobacterium longum* CECT 7894 (7894), *Bifidobacterium longum* CECT 4551 (4551), y el marcador molecular (M).

55 FIG. 3. Reducción en el tiempo de llanto medio diario y en la duración de cada episodio. A) Reducción en el tiempo de llanto medio diario (total de minutos llorados por día). B) Reducción en la duración media de cada episodio (minutos por episodio). Resultados expresados como media \pm error estándar de la media (SEM) para n=9 en el grupo placebo y n=11 en el grupo de la fórmula probiótica. PLA corresponde al grupo de placebo. PRO corresponde con el grupo probiótico.

Ejemplos

La cepa de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 se utilizó como control en algunos experimentos.

Ejemplo 1. Evaluación *in vitro* de la capacidad de inducir la producción de IL-10 en un modelo de mucosa intestinal

5 Se estudió la capacidad inmunomoduladora de las cepas bacterianas, resultante de su interacción con el sistema inmune del tracto digestivo (denominado a menudo tejido linfoide asociado al intestino, GALT). Más específicamente, se pretendía comprobar si las cepas bacterianas tienen la capacidad de inducir la producción de IL-10 anti-inflamatoria para reducir el tracto intestinal inflamatorio. La base molecular es la interacción de los receptores de superficie celular de los probióticos con TLR-2 y TLR-4 (del inglés, Toll like receptor) que se pueden encontrar en las células dendríticas presentes en las placas de Peyer.

Línea celular THP-1

15 El modelo seleccionado fue la línea celular THP-1, que expresa TLR-2 y TLR-4. Este modelo es sensible a componentes bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) (como inductor de la respuesta inflamatoria), y es susceptible de modular la producción de citocinas cuando hay moléculas para la inducción de la producción de un patrón de citocina anti-inflamatoria en el medio adecuado.

El término "línea celular THP-1" de acuerdo con la técnica se refiere a una línea celular de monocitos humanos derivados de un paciente con leucemia monocítica aguda. Se utiliza para ensayar las líneas celulares de leucemia en análisis inmunocitoquímico de la interacción proteína-proteína e inmunohistoquímica.

20 La línea celular THP-1 se obtuvo de la colección de células de Public Health England (número de catálogo 88081201). En la fecha de presentación de la presente solicitud, el catálogo de productos de 88081201 del proveedor Public Health England (www.hpacultures.org.uk) dice en relación con las células THP-1: "Leucemia monocítica humana. Derivada de la sangre periférica de un varón de 1 año de edad con leucemia monocítica aguda".

Medios y LPS

25 Se cultivaron monocitos THP-1 en medio 1640 de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) + suero bovino fetal (FBS) al 10 %. RPMI era un medio estándar disponible comercialmente (RPMI 1640, ref. 61870-010 de Gibco). FBS también era de Gibco.

Se diferenciaron monocitos THP-1 en macrófagos mediante la adición al medio de crecimiento de 5 mg de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, ref. P8139 de SIGMA) a una concentración final de 0,16 μ M e incubación durante aproximadamente 72 horas.

30 Las cepas bacterianas se cultivaron en medio MRS. Era un medio estándar comercialmente disponible de Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Broth Oxoid ref. CM0359).

35 Los macrófagos THP-1 fueron estimulados con LPS para inducir una respuesta inflamatoria. Los lipopolisacáridos (LPS) también conocidos como lipoglicanos, son moléculas grandes que consisten en un lípido y un polisacárido unidos por un enlace covalente; se encuentran en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, actúan como endotoxinas y provocan fuertes respuestas inmunitarias en los animales. El LPS utilizado en este estudio fue un lipopolisacárido estándar disponible comercialmente (ref. L4391 de Sigma).

Crecimiento, incubaciones y medición de IL-10

40 Los macrófagos THP-1 fueron cultivados en medio RPMI 1640 + FBS al 10 % en placas ELISA de 24 pocillos hasta una concentración final de 10^6 macrófagos/pocillo. La concentración final de células se calculó mediante el uso de colorante azul tripán y una cámara contadora de Neubauer.

Los macrófagos THP-1 fueron co-incubados con LPS (concentración final de 10 ng/mL) durante 2,5 horas. Seguidamente, las células se lavaron con el medio solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS, ref. 14190-094 de Gibco). Quinientos μ L de medio RPMI 1640 + FBS al 10 % se añadieron a cada pocillo de la placa ELISA.

45 Las cepas bacterianas se cultivaron previamente durante la noche en medio MRS a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las cepas bacterianas debidamente diluidas para obtener una relación final de 25:1 (2,5 x 10⁷ ufc de bacterias:10⁶ macrófagos THP-1) se añadieron a cada pocillo. La concentración se calculó utilizando una cámara contadora de Neubauer.

50 Los macrófagos THP-1 se incubaron a continuación durante 2,5 horas a 37 °C con o sin (control negativo) cepas bacterianas. Posteriormente, los macrófagos se lavaron dos veces con medio D-PBS para eliminar las cepas bacterianas. A continuación, se añadió medio RPMI 1640 + FBS al 10 % suplementado con gentamicina (50 μ g/mL),

ampicilina (10 µg/mL) y cloranfenicol (12 µg/mL), se incubó a 37 °C con CO₂ al 5-7 %, y se tomaron partes alícuotas a las 5 y a las 24 horas.

5 Las partes alícuotas se centrifugaron y se analizó la IL-10 de los líquidos sobrenadantes por citometría de flujo utilizando el kit comercial Human IL-10 Flex Set (Bead B7, número de ref. 558274 de BD Biosciencias) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cálculos

10 No se usaron los valores absolutos para la interpretación de los resultados. El valor más informativo es la evolución de las citocinas, en este caso la concentración de IL-10, expresada como incremento normalizado a partir de los valores a las 5 y 24 h. Esto refleja lo que ocurre en el intestino y proporciona un valor estándar que permite una comparación transversal entre los experimentos. El incremento normalizado se calcula siguiendo la siguiente fórmula, en la que IL-10_{5h} y IL-10_{24h} es la concentración de IL-10 en pg/mL a las 5 y a las 24 horas, respectivamente:

$$(IL10_{24h} - IL10_{5h}) / IL10_{5h}$$

Resultados

15 Cuanto más alto es el valor, mayor es la inducción de IL-10. Como se muestra en la Tabla 1, los macrófagos THP-1 inducidos por LPS inducen la producción de IL-10 en presencia de las cepas bacterianas, siendo la inducción de IL-10 especialmente elevada en presencia de la cepa CECT 8330. La inducción causada por CECT 8330 es ligeramente superior a la causada por *L. reuteri*.

Tabla 1. Incrementos normalizados de IL-10 en macrófagos THP-1 inducidos por LPS. El "Control negativo" corresponde a macrófagos THP-1 incubados sin cepas bacterianas

	IL-10 _{5h} en pg/mL	IL-10 _{24h} en pg/mL	Incremento normalizado
CECT 8330	30,83	140,18	3,54
CECT 7894	23,87	57,43	1,40
<i>L. reuteri</i>	30,31	122,17	3,03
Control negativo	27,56	43,24	0,56

20

Ejemplo 2. Capacidad antagonista contra bacterias intestinales

El objetivo fue evaluar la capacidad de las cepas bacterianas para antagonizar miembros indeseables de especies comúnmente abundantes en bebés con llanto excesivo.

25 Para la detección y evaluación de esta capacidad antagonista se utilizó el protocolo conocido como protocolo de Campbell. Esta técnica consiste en la incubación de las bacterias a antagonizar en placas Petri con secciones cilíndricas de la placa de agar confluyente de la cepa probiótica sembrada de manera uniforme. Se mide el halo de inhibición del crecimiento alrededor de la sección cilíndrica.

Medio

Las cepas de patógenos se cultivaron en medio Oxoid estándar disponible comercialmente (Oxoid CM0359).

30 *Incubación y medición*

35 Las cepas patógenas se sembraron de manera uniforme en las placas que contenían medio Oxoid y se hicieron crecer hasta confluencia en una incubadora con CO₂ a las temperaturas y % de CO₂ apropiados para el crecimiento de cada patógeno. Entonces, dos secciones cilíndricas de 6 mm de diámetro de una placa de agar confluyente sembrada uniformemente de las cepas probióticas a ensayar se pusieron en contacto con la placa sembrada con el patógeno, confrontando la placa sembrada con el patógeno con la cara crecida de una de las secciones cilíndricas y con la cara sin crecimiento de la otra sección cilíndrica e incubando durante una noche a 37 °C.

Cálculos

40 Al día siguiente, las zonas de inhibición se midieron mediante la colocación de la placa de agar sobre una regla plana. A continuación, la actividad inhibidora del crecimiento (GI) fue calculada, restando del diámetro de la zona de inhibición (IZD) medido en centímetros, el diámetro de los cilindros (CD) y dividiendo la diferencia por 2, de acuerdo con la fórmula GI = (IZD-CD) / 2. Las capacidades de inhibición de las cepas de la invención se compararon con la de

la cepa comercial de *L. reuteri*. La actividad final inhibidora se calculó como la media de los valores de GI para las dos secciones cilíndricas mencionadas anteriormente, para cada cepa.

Resultados

5 Tabla 2: Actividad inhibidora del crecimiento (GI) de las cepas probióticas. Resultados expresados en cm; "n.i." indica sin inhibición

<i>Cepa patógena</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> CECT 8330	<i>Bifidobacterium longum</i> CECT 7894	<i>Lactobacillus reuteri</i>
Bacterias Gram negativas			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10538	0,30	> 0,6	n.i
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0,08	> 0,6	0,08
<i>Klebsiella oxytoca</i> KT 801	0,54	> 0,6	0,13
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	0,21	> 0,6	n.i
Bacterias Gram positivas			
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,35	> 0,6	0,08
<i>Clostridium difficile</i> ATCC 9689	0,25	0,29	0,38

10 Las cepas mostraron actividad inhibidora frente a todo el espectro de agentes patógenos estudiados. Por lo tanto, las cepas fueron eficaces no solo inhibiendo bacterias Gram positivas sino también Gram negativas. Este no fue el caso de *L. reuteri* que fue ineficaz inhibiendo el crecimiento de *E. coli* y *B. vulgatus*. Esto es de gran interés ya que cantidades anormales de bacterias tales como de *E. coli* se presentan comúnmente en bebés que presentan llanto excesivo (De Weerth, C. *et al.* 2013 *supra*; Lehtonen, L. *et al.* "Intestinal Microflora in colicky and noncolicky infants: Bacterial Cultures and Gas-Liquid Chromatography", *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1994, vol. 19, pp. 310-314). También cabe destacar que, en general, CECT 8330, y especialmente CECT 7894, fueron más eficaces inhibiendo el crecimiento de casi todas las bacterias patógenas en comparación con *L. reuteri*. Además, también es importante que ambas cepas de la invención proporcionan protección contra *Klebsiella* y *Clostridium*, que también son abundantes en el intestino de los bebés que presentan llanto excesivo (De Weerth, C. *et al.* 2013 *supra*; Lehtonen, L. *et al.* 1994 *supra*).

Ejemplo 3. Sin producción de gases

20 Las bacterias heterofermentativas producen CO₂ y etanol, así como ácido láctico, por fermentación de la glucosa siguiendo la ruta metabólica:



25 Se determinó la producción de CO₂ por las cepas. Como se muestra en la fórmula, la producción de CO₂ es también informativa de la producción de etanol. La producción de CO₂ se determinó usando la técnica de tubos Durham, que se basa en la incubación de la cepa probiótica en caldo de heterofermentación en tubos que contienen tubos boca abajo más pequeños en el interior, donde se acumula el gas producido (Pilone, G.J., *et al.*, "Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine" *Am J Enol Vitic* 1991, vol. 42, pp. 153-157).

Las cepas CECT 8330 y CECT 7894 no produjeron gases. *L. reuteri*, usado como control, produjo gases.

Ejemplo 4. Ensayos de toxicidad

30 A diferencia de las bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, *Pediococcus pensotaceous* no se usa comúnmente como probiótico para el consumo humano. Por lo tanto, aunque la cepa probiótica CECT 8330 de la presente invención pertenece a una especie que tiene el status QPS se llevaron a cabo ensayos de toxicidad adicionales para evitar cualquier problema de seguridad.

Dada la elevada sensibilidad de los bebés por su inmaduro tracto digestivo, se desarrolló un modelo de toxicidad aguda más apropiado utilizando ratas neonatales Wistar Han IGS CrI:WI (10 días después del nacimiento con un intervalo de peso corporal al inicio del experimento de 18-23 g), con el fin de garantizar la seguridad completa de las cepas en los bebés.

5 Se recibieron las hembras embarazadas en el día 19 de gestación. Después del nacimiento, las camadas se ajustaron a 4 machos y 4 hembras, mezclando cachorros de todas las madres con el fin de evitar los efectos maternos y lograr camadas de igual tamaño. Cada madre se colocó con 4 machos y 4 hembras. Las madres fueron alimentadas con dieta SAFE A03 y agua *ad libitum*.

10 El procedimiento experimental comprendió 4 grupos: VEHÍCULO-translocación, VEHÍCULO-signos clínicos, CECT 8330-translocación y CECT-8330-signos clínicos.

15 Cada grupo estaba compuesto por una jaula con una hembra lactante y una camada de 4 machos y 4 hembras. El producto CECT 8330 se preparó diariamente a una concentración final de $0,5 \times 10^{10}$ ufc/mL de formulación. El grupo VEHÍCULO recibió agua en lugar de probiótico. A todas las ratas neonatales les fueron administrados los tratamientos VEHÍCULO o CECT 8330 durante 5 días (del día 0 al día 4 del estudio) por sonda oral con una cánula orogástrica a un volumen fijo de 5 mL/kg ($2,5 \times 10^{10}$ ufc/kg en el caso CECT 8330). La vía oral fue elegida para el estudio debido a que es la vía de administración prevista en humanos.

Las observaciones durante el experimento fueron: morbilidad/mortalidad; peso corporal; signos clínicos (aspecto del cachorro incluyendo la hidratación y la condición corporal; respuesta a un estímulo; actividad natural - habilidad para escabullirse si se pone en posición supina - y color de la piel).

20 Los animales fueron sacrificados después de dos períodos de tiempo diferentes:

- Los grupos de "translocación" fueron sacrificados en el día 4 del experimento (último día del tratamiento de 5 días)
- Los grupos de "signos clínicos" fueron sacrificados en el día 11 del estudio (una semana después de la última dosis oral).

25 Los cachorros fueron sacrificados por decapitación y la necropsia se llevó a cabo incluyendo el examen del animal intacto y todos sus tejidos superficiales, seguido de un examen interno de las cavidades torácica y abdominal. En los animales pertenecientes al grupo de "translocación", inmediatamente después del sacrificio, se recogió el hígado de los animales y se mantuvo a 2-4 °C hasta el análisis de la translocación bacteriana. Aproximadamente 5 mg de cada muestra de hígado se homogeneizó en 1 mL de PBS con 0,01 % de gelatina. Cien µL de este homogeneizado se sembró en placas de McConkey o placas de MRS. Se contaron las colonias después de incubación a 37 °C durante 30 48 h.

35 No se observó ninguna mortalidad espontánea o signos clínicos relacionados con toxicidad durante el estudio. No se detectaron diferencias en el peso corporal entre el control (vehículo) y CECT 8330 y el comportamiento de todos los animales fue normal. Además, no se observaron diferencias entre el control y los grupos de CECT 8330 en el número de animales en los que se observó translocación ya sea de bacterias del ácido láctico o de enterobacterias en el hígado.

Ejemplo 5. Aislamiento de las cepas

40 Se recogieron heces recientes de niños 0-9 años de edad, y se disolvieron en tampón de PBS (pH 7,4), se hicieron partes alícuotas y se sembraron en MRS suplementado con diversas combinaciones de antibióticos. Las cepas se cultivaron en condiciones de microaerofilia (CO₂ al 5 %) a 37 o 30 °C. El tiempo de incubación dependió de la tasa de crecimiento, pero normalmente fue de 24 horas a 3 días. Se llevó a cabo una tinción de Gram para obtener una primera identificación. Una vez cultivadas, las cepas aisladas se almacenaron por liofilización en PBS 0,1 x con 15 % de leche desnatada en polvo. Las cepas se cultivaron en agar MRS suplementado con 10 µg/mL de vancomicina. El examen microscópico reveló que *Bifidobacterium longum* CECT 7894 son bacilos Gram-positivos, y *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 son cocos Gram-positivos.

45 La identificación de género y especie se realizó mediante amplificación del gen ARNr 16S como se ha descrito previamente (Bosch, M. *et al.*, Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children. *Lett App. Microbiol*, 2012 vol. 54, pp. 240-6). La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia ARNr 16S de *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 y la SEQ ID NO: 2 a la secuencia de ARNr 16S de *Bifidobacterium longum* CECT 7894.

50 La genotipación de cepa se llevó a cabo mediante digestión genómica y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

Pediococcus pentosaceus CECT 8330 se sometió a un protocolo descrito previamente (Rodas, A.M., *et al.*, Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005 vol. 55, no. 1, pp. 197-207) con ligeras modificaciones. Puesto que no había cepas comerciales de *Pediococcus pentosaceus* disponibles para su

uso como controles, se incluyeron en el ensayo dos cepas comerciales de *Pediococcus acidilactici* (1 y 2 en la FIG. 1). Las cepas se cultivaron en placas de agar MRS y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 18 h. Las células se recogieron y se lavaron 3 veces en 8 mL de PET (Tris 10 mM, pH 7,6, NaCl 1 M), después se centrifugaron a 6.000 rpm durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en 700 mL de tampón de lisis (Tris 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, SLS al 0,5 %, ácido desoxicólico al 0,2 %; 1 mg/mL de lisozima; 40 U/mL de mutanolisina ; 20 mg/mL de ARNasa). Un volumen equivalente de agarosa de bajo punto de fusión al 1,6 % (FMC BioProducts, Rockland, ME, Estados Unidos) se añadió a las células resuspendidas y se permitió la solidificación a 4 °C durante 1 h. Los insertos se transfirieron a 2 mL de tampón de lisis II (EDTA 0,5 M, pH 9,2, N-lauril-sarcosina al 1 % y 1 mg/mL de pronasa) y se incubaron a 50 °C durante 48 h. Después, los insertos se lavaron a temperatura ambiente con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). Se digirió separadamente el ADN total mediante las enzimas de restricción *Sma*-I y *Not*-I (Roche Diagnostics). Se llevó a cabo una electroforesis en gel de campo pulsado usando un aparato CHEF DRIII (BioRad Laboratories). Los insertos se cargaron en un gel de agarosa al 1 % (agarosa SeaKem ME, FMC BioProducts, ME, Estados Unidos). La Tabla 3 describe las condiciones de electroforesis para cada enzima. Los marcadores de peso molecular de ADN fueron el marcador Lambda ladder PFG y el marcador Low Range PFG (New England Biolabs). Después de la electroforesis, se tiñeron los geles con bromuro de etidio y UV usando GelDoc System (BioRad).

Tabla 3. Condiciones de electroforesis

Enzima	Bloque	Pulso inicial (s)	Pulso final (s)	Tiempo (horas)
<i>Not</i> -I	1	2	25	18
<i>Sma</i> -I	1	0,5	5	16

Bifidobacterium longum CECT 7894 se caracterizó mediante PFGE usando *Xba* I y *Spe* I como enzimas de restricción tal y como se describe en Briczinski, E.P. *et al.* "Technical note: a rapid pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of bifidobacteria" *J. Dairy Sci.* 2006, vol. 89, pp 2424-2427. Los patrones obtenidos fueron comparados con los de *B. longum* CECT 4551.

Los resultados se muestran en las FIG. 1 y FIG. 2. Los patrones de restricción con *Not*-I y *Sma*-I de las electroforesis en gel de campo pulsado fueron diferentes para la cepa *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 y las cepas de control comerciales pertenecientes a especies *Pediococcus acidilactici* (1 y 2). No fue posible incluir cepas de *Pediococcus pentosaceus* como controles debido a que no estaban disponibles comercialmente. La PFGE permite distinguir entre cepas de la misma especie, y por lo tanto puede usarse para identificar de forma única una cepa bacteriana dada dentro de una especie bacteriana (Rodas, A.M., *et al.* 2005 *supra*).

Ejemplo 6. Preparación de una suspensión oleosa

Cuatrocientos mL de aceite de girasol se introdujeron en un recipiente provisto de medios de agitación. Se añadieron lentamente 9,5 g de sílice coloidal con agitación (150 rpm) para evitar la formación de grumos y aglomeraciones hasta homogeneización completa. Se añadieron al recipiente bajo agitación lenta (50 rpm) hasta dispersión completa, 13,3 g de *Pediococcus pentosaceus* CECT 8330 que contenían 5×10^{12} ufc. A continuación, 42,75 g de *Bifidobacterium longum* CECT 7894 que contenían 5×10^{12} ufc se añadieron al recipiente bajo agitación lenta (50 rpm) hasta dispersión completa. Finalmente, la suspensión se completó hasta 1.000 ml con aceite de girasol y se agitó para homogeneizar la suspensión final. La suspensión se mantuvo a temperatura ambiente.

Ejemplo 7. Estudio clínico

Diseño del estudio

Se llevó a cabo un ensayo clínico piloto para evaluar la eficacia y seguridad de la fórmula probiótica combinando *P. pentosaceus* CECT 8330 y *B. longum* CECT 7894. El estudio se diseñó como un estudio clínico prospectivo, doble ciego, controlado con placebo, aleatorizado con dos brazos paralelos que implicó un total de 8 centros participantes procedentes de Cataluña (España). El protocolo del estudio fue aprobado por los Comités de Ética de IDIAP Jordi Gol (Barcelona, España) y de la Fundació Unió Catalana d'Hospitals (Barcelona, España), en cumplimiento con la Declaración de Helsinki.

Se reclutaron recién nacidos a su tiempo sanos de ambos sexos que cumplieran con todos los siguientes criterios de inclusión: de 21 a 120 días de edad; peso al nacer mínimo 2,5 Kg; ya sea alimentados con leche materna o con fórmula infantil (hidrolizada o fórmula de inicio); llanto excesivo y agitación de acuerdo con la definición de "llanto intenso, persistente e inconsolable, problemático para el funcionamiento normal de la unidad familiar, lo que implica por lo menos 60 minutos al día en 3 o más episodios en 3 o más días observados durante al menos 1 semana, previamente descartando una etiología orgánica, como la invaginación intestinal u otras". Los criterios de exclusión fueron: bebés prematuros (nacidos antes de 37 semanas); enfermedad crónica; antecedentes de trastornos gastrointestinales (no relacionados con cólico); bebés inmunodeprimidos; intervenciones quirúrgicas anteriores o

esperadas; haber tomado probióticos o antibióticos una semana antes del reclutamiento; bebés cuyos padres o representantes no pudieron seguir adecuadamente los requisitos del estudio. Los sujetos fueron asignados al azar al grupo de tratamiento con probiótico o al grupo con placebo. El tratamiento consistió en una composición como se describe en el Ejemplo 6. El placebo consistió en la misma suspensión oleosa sin probiótico. Las composiciones se administraron 30 minutos antes de la alimentación (5 gotas/día) durante 14 días. Durante el estudio, se pidió a los padres que llenasen cuestionarios que registraban la adhesión al tratamiento, la evolución del llanto y los efectos adversos.

Los datos se analizaron con el programa IBM® SPSS Statistic v20 para Windows y los resultados se expresaron como valores medios y errores estándar. Se calculó la reducción media en el tiempo de llanto diario durante el estudio clínico como la diferencia entre la media del número total de minutos por día de llanto durante los 3 últimos días del estudio (días 12, 13 y 14) y la media de número total de minutos por día de llanto durante los primeros 3 días del estudio (días 1, 2 y 3). Se calculó la reducción media de la duración de cada episodio como la diferencia entre la media del número de minutos que dura cada episodio durante los últimos 3 días del estudio (días 12, 13 y 14) y la media de minutos que dura cada episodio durante los 3 primeros días del estudio (días 1, 2 y 3).

15 *Resultados*

Al comienzo del ensayo clínico se confirmó que n=9 bebés pertenecientes al grupo con placebo y n=11 pertenecientes al grupo con fórmula probiótica cumplían con la definición propuesta de tiempo de llanto y por lo tanto se les permitió continuar el estudio. El tiempo medio de llanto de esta población en el inicio del estudio varió desde 60 hasta 240 minutos. Durante el estudio tanto el placebo como la fórmula probiótica fueron bien tolerados y no se observaron efectos adversos relacionados con su administración. Además, como se muestra en la FIG. 3, el tiempo de llanto se redujo tanto en el grupo con placebo como con el grupo probiótico durante el estudio. Sin embargo, el consumo de probióticos causó una mayor reducción en el tiempo medio de llanto. Se observó una tendencia similar para la duración de cada episodio.

El efecto clínico observado da soporte a las propiedades probióticas observadas *in vitro*. Estos resultados son de interés relevante puesto que este estudio presenta solidez en comparación con otros estudios en los que se han utilizado probióticos para tratar el cólico. Por ejemplo, el estudio incluyó tanto bebés alimentados con leche materna, como alimentados con fórmula, que es de interés relevante ya que las fórmulas probióticas actuales no han podido mostrar ninguna mejoría en las subpoblaciones alimentadas con fórmula. Por otra parte, los bebés participantes fueron reclutados en base a una definición clínica de cólico infantil más realista de acuerdo con la práctica clínica diaria y el periodo de tratamiento (14 días) fue menor que la de muchos otros ensayos clínicos (21-28 días).

Referencias bibliográficas

- Andreoletti, O. *et al.* "The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed. Question no: EFSA-Q-2008-006", *The EFSA Journal* 2008, vol. 923, pp. 1-48.
- Bosch, M. *et al.*, "Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children". *Lett App. Microbiol*, 2012. 54, 240–6.
- Briczinski, E.P. *et al.* "Technical note: a rapid pulsed-field gel electrophoresis method for analysis of bifidobacteria" *J. Dairy Sci.* 2006, vol. 89, pp. 2424-2427.
- De Weerth, C. *et al.* "Intestinal Microbiota of Infants with colic: Development and specific signatures" *Pediatrics* 2013, vol. 131, no. 2, e550-e558.
- Dupont, C. *et al.* "A-Lactalbumin-Enriched and Probiotic-Supplemented Infant Formula in Infants with Colic: Growth and Gastrointestinal Tolerance". *European Journal of Clinical Nutrition.* 2010, vol. 64, no. 7, pp. 765-767.
- Igarashi T. "Study of the relationship between changes in lactic acid bacterial cell components and stimulation of IL-12 production under salt-stressed conditions", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 2010, vol. 74, pp. 2171-2175
- Jonganurakkun, B. *et al.* "*Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2008 vol. 106, no. 1, pp. 69-73
- Lehtonen, L. *et al.* "Intestinal Microflora in colicky and noncolicky infants: Bacterial Cultures and Gas-Liquid Chromatography", *Journal of pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1994, vol. 19, pp. 310-314.
- Mentula, S. *et al.* "Microbial composition and fecal fermentation end products from colicky infants - A probiotic supplementation pilot", *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2008, vol. 20, no. 1, pp. 37-47.
- Roos, S. *et al.* "454 Pyrosequencing Analysis on Faecal Samples from a Randomized DBPC Trial of Colicky Infants Treated with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938", *PLoS ONE* 2013, vol. 8, no. 2, e56710 1-5
- Savino, F. *et al.* "*Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) Versus Simethicone in the Treatment of Infantile Colic: A Prospective Randomized Study" *Pediatrics* 2007, vol. 119, no.1, e124-e130.

Savino, F. *et al.* "*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial". *Pediatrics* 2010, vol 126, no. 3, e526-e533.

Szajewska, H. *et al.* "*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the Management of Infantile Colic in Breastfed Infants: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial", *Journal of Pediatrics* 2012, vol. 162, no. 2, pp. 257-262.

5 Vitali, B. *et al.* "Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables", *Food Microbiology* 2012, vol. 31, no. 1, pp. 116-125

Pilone, G.J., *et al.*, "Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine" *Am J Enol Vitic* 1991, vol. 42, pp. 153-157

WO2007142596

10 Listado de secuencias

<110> AB-Biotics, S.A. Venpharma Laboratorios, S.A.

<120> Probiótico para el llanto infantil excesivo

<130> P2765PC00

<150> EP13382324

15 <151> 09-08-2013

<160> 2

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 1502

20 <212> ADN

<213> *Pediococcus pentosaceus*

<220>

<221> source

<222> 1..1502

25 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar /nota="ARN16s" /organismo="Pediococcus pentosaceus"

ES 2 683 190 T3

```

<400> 1
ggatgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgaa cgaacttccg ttaattgatt      60
atgacgtact tgtactgatt gagattttaa cacgaagtga gtggcgaacg ggtgagtaac      120
acgtgggtaa cctgcccaga agtaggggat aacacctgga aacagatgct aataccgtat      180
aacagagaaa accgcatggt tttcttttaa aagatggctc tgctatcact tctggatgga      240
cccgcggcgt attagctagt tggtgaggta aaggctcacc aaggcagtga tacgtagccg      300
acctgagagg gtaatcggcc acattgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc      360
agcagtaggg aatcttccac aatggacgca agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtgaa      420
gaagggtttc ggctcgtaaa gctctgttgt taaagaagaa cgtgggtaag agtaactgtt      480
taccagtgga cggtatTTAA ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggta      540
atacgtaggt ggcaagcgtt atccggattt attgggcgta aagcgagcgc aggcggctct      600
ttaagtctaa tgtgaaagcc ttcggctcaa ccgaagaagt gcattgaaa ctgggagact      660
tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg gaaatgcgta gatatatgga      720
agaacaccag tggcgaaggc ggctgtctgg tctgcaactg acgctgaggc tcgaaagcat      780
gggtagcgaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatga ttactaagtg      840
ttggaggggt tccgcccttc agtgctgcag ctaacgcatt aagtaatccg cctggggagt      900
acgaccgcaa ggttgaaact caaaagaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg      960
tggtttaatt cgaagctacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcttc tgacagtcta     1020
agagattaga ggttcccttc ggggacagaa tgacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc     1080
gtgtcgtgag atggtggggt aagtcccgca acgagcgcaa cccttattac tagttgccag     1140
cattaagttg ggcaactctag tgagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggacgac     1200
gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg atggtacaac     1260
gagtcgcgaa accgcgaggt taagctaatc tcttaaaacc attctcagtt cggactgtag     1320
gctgcaactc gcctacacga agtcggaatc gctagtaatc ggggatcagc atgcccgggt     1380
gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgagagttt gtaacacca     1440
aagccgggtg ggtaaccttt taggagctag ccgtctaagg tgggacagat gattagggtg     1500
aa                                                                              1502

```

- 5 <210> 2
 <211> 1461
 <212> ADN
 <213> Bifidobacterium longum
- 10 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1461
 <223> /mol_tipo="ADN sin asignar /nota="ARN16s" /organismo="Bifidobacterium longum"

ES 2 683 190 T3

<400> 2
 tggctcagga tgaacgctgg cggcgtgctt aacacatgca agtcgaacgg gatccatcag 60
 gctttgcttg gtggtgagag tggcgaacgg gtgagtaatg cgtgaccgac ctgccccata 120
 caccggaata gctcctggaa acgggtggta atgccggatg ctccagttga tcgcatggtc 180
 ttctcggaaa gctttcgcgg tatgggatgg ggtcgcgtcc tatcagcttg acggcgggg 240
 aacggccac cgtggcttcg acgggtagcc ggctgagag ggcgaccggc cacattggga 300
 ctgagatagc gccagactc ctacgggagg cagcagtggg gaatattgca caatggggc 360
 aagcctgatg cagcgacgcc gcgtgagggg tggaggcctt cgggttghaa acctcttta 420
 tcggggagca agcgagagtg agtttaccg ttgaataagc accggctaac tacgtgccag 480
 cagccgcggt aatacgtagg gtgcaagcgt tatccggaat tattggcggt aaagggctcg 540
 taggcgggtc gtcgcgtccg gtgtgaaagt ccatcgctta acgggtggatc cgcgccgggt 600
 acggcggggc ttgagtgcgg taggggagac tggaaattcc ggtgtaacgg tggaatgtgt 660
 agatatcggg aagaacacca atggcgaagg caggctctctg ggccgttact gacgctgagg 720
 agcgaagcgg tggggagcga acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaaccggtg 780
 gatgctggat gtggggcccg ttccacgggt tccgtgtcgg agctaaccgg ttaagcatcc 840
 cgctggggga gtacggccgc aaggctaaaa ctcaaagaaa ttgacggggg cccgcacaag 900
 cggcggagca tgcggattaa ttcgatgcaa cgcgaagaac cttacctggg cttgacatgt 960
 tcccgaocggc cgtagagata cggcttccct tcggggcggg ttcacaggtg gtgcatggtc 1020
 gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgc accctcggcc 1080
 cgtgttgcca gcgattatg ccgggaactc acgggggacc gccgggggta actcggagga 1140
 aggtggggat gacgtcagat catcatgccc cttacgtcca gggcttcacg catgctacaa 1200
 tggcgggtac aacgggatgc gacgcggcga cgcggagcgg atccctgaaa accggtctca 1260
 gttcggatcg cagtctgcaa ctcgactgcy tgaaggcggg gtcgctagta atcgcgaatc 1320
 agcaacgtcg cggatgatgc gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca agtcatgaaa 1380
 gtgggcagca cccgaagccg gtggcctaac cccttgtggg atggagccgt ctaaggtgag 1440
 gctcgtgatt gggactaagt c 1461

REIVINDICACIONES

1. Una composición bacteriana que comprende de 10^4 a 10^{12} ufc/g de células viables de *Pediococcus pentosaceus* que tienen la capacidad de inducir la producción de interleucina-10,

5 donde la producción de interleucina-10 por macrófagos THP-1 en presencia de células de *Pediococcus pentosaceus* expresada como incremento normalizado es superior a la producción de interleucina-10 por el control negativo, que son macrófagos THP-1 en ausencia de células de *Pediococcus pentosaceus*, cuando el incremento normalizado se determina mediante las siguientes etapas:

10 (a) diferenciar monocitos THP-1 en macrófagos mediante el crecimiento de la línea celular de monocitos THP-1 de la colección de células de Public Health England, número de catálogo 88081201, en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) hasta una concentración final de 0,16 μ M;

(b) dejar crecer los macrófagos THP-1 en medio RPMI 1640 con FBS al 10% en placas ELISA de 24 pocillos hasta una concentración final de 10^6 macrófagos/pocillo;

15 (c) incubar durante 2,5 horas los macrófagos THP-1 con lipopolisacárido (LPS) a una concentración final de 10 ng/mL, y lavar los macrófagos THP-1 con el medio solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS);

(d) tener preparado un cultivo de células de *Pediococcus pentosaceus* obtenido haciendo crecer las células en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) una noche a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5 %;

20 (e) añadir a cada pocillo ELISA 500 μ L de medio RPMI 1640 con FBS al 10 % y una cantidad apropiada de una dilución de células de *Pediococcus pentosaceus* hasta obtener una relación final de 25:1, es decir, $2,5 \times 10^7$ ufc de células de *Pediococcus pentosaceus*: 10^6 macrófagos THP-1;

(f) incubar los macrófagos THP-1 con las células de *Pediococcus pentosaceus* durante 2,5 horas a 37 °C o sin las células de *Pediococcus pentosaceus* en las mismas condiciones como control negativo;

25 (g) lavar los macrófagos THP-1 con medio D-PBS para eliminar las células de *Pediococcus pentosaceus*, posteriormente añadir a los macrófagos THP-1 medio RPMI 1640 con FBS al 10 % suplementado con 50 μ g/mL de gentamicina, 10 μ g/mL de ampicilina y 12 μ g/mL de cloranfenicol, incubar a 37 °C con CO₂ al 5-7 %, y tomar partes alícuotas a las 5 y 24 horas;

(h) centrifugar las partes alícuotas y ensayar los líquidos sobrenadantes para la cuantificación de interleucina-10 mediante citometría de flujo; y

30 (i) calcular el incremento normalizado de la concentración de interleucina-10, con la fórmula $(IL-10_{24h} - IL-10_{5h}) / IL-10_{5h}$; donde $IL-10_{5h}$ y $IL-10_{24h}$ es la concentración de interleucina-10 en pg/mL a 5 y 24 horas, respectivamente.

35 2. La composición bacteriana según la reivindicación 1, donde la producción de interleucina-10 por los macrófagos THP-1 en presencia de células de *Pediococcus pentosaceus* expresada como incremento normalizado es al menos 2 veces superior a la producción de interleucina-10 por los macrófagos THP-1 en ausencia de las células de *Pediococcus pentosaceus*, cuando el incremento normalizado se determina mediante las etapas (a)-(i) como se definen en la reivindicación 1.

3. La composición bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde las células de *Pediococcus pentosaceus* tienen la capacidad de antagonizar bacterias intestinales Gram positivas y Gram negativas.

4. La composición bacteriana según la reivindicación 3, donde las bacterias Gram positivas comprenden bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Clostridium difficile* y *Enterococcus faecalis*.

40 5. La composición bacteriana según la reivindicación 3, donde las bacterias Gram negativas comprenden bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* y *Bacteroides vulgatus*.

45 6. La composición bacteriana según la reivindicación 3, donde las células de *Pediococcus pentosaceus* tienen la capacidad de antagonizar *Clostridium difficile*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxytoca* y *Bacteroides vulgatus*, donde la capacidad de antagonizar se determina por las siguientes etapas:

(i) sembrar uniformemente cepas patógenas en placas con medio Oxoid y dejar crecer hasta confluencia en una incubadora con CO₂ a las temperaturas y % de CO₂ apropiados para el crecimiento de cada patógeno;

50 (ii) poner dos secciones cilíndricas de 6 mm de diámetro de una placa de agar confluyente sembrada uniformemente de células de *Pediococcus pentosaceus*, en contacto con la placa sembrada de patógeno, confrontando (a) la cara donde han crecido las células de una sección cilíndrica contra la placa sembrada de patógeno; y (b) la cara donde no han

crecido las células de la otra sección cilíndrica contra la placa sembrada de patógeno; e incubar durante una noche a 37 °C;

(iii) medir al día siguiente las zonas de inhibición poniendo la placa de agar sobre una regla plana; y

5 (iv) calcular la actividad inhibidora de crecimiento restando el diámetro del cilindro (CD) del diámetro de la zona de inhibición (IZD) medido en centímetros y dividiendo esta diferencia entre 2, siguiendo la fórmula $GI = (IZD-CD) / 2$.

7. La composición bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el *Pediococcus pentosaceus* es el *Pediococcus pentosaceus* depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número de acceso CECT 8330.

10 8. La composición bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que además comprende de 10^4 a 10^{12} ufc/g de células de *Bifidobacterium longum* CECT 7894.

9. Una composición bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para uso en la mejora del llanto excesivo de bebés.

10. La composición bacteriana según la reivindicación 9, para uso en la mejora del llanto excesivo asociado al cólico infantil.

15 11. La composición bacteriana según la reivindicación 9, donde los bebés tienen una edad de entre tres semanas y doce meses.

12. La composición bacteriana según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que está en una forma seleccionada del grupo que consiste en un complemento alimenticio, un medicamento, una fórmula infantil, un producto comestible y un producto alimenticio.

20 13. La composición bacteriana según la reivindicación 12, que está en forma de un complemento alimenticio infantil en forma de suspensión oleosa.

14. Un método para cribar y aislar nuevas células de *Pediococcus pentosaceus*, que comprende las siguientes etapas:

25 (i) ensayar nuevas células de *Pediococcus pentosaceus* de un conjunto de células de *Pediococcus pentosaceus* para determinar su capacidad de inducir la producción de interleucina-10 siguiendo las etapas que se describen en la reivindicación 1; y

(ii) seleccionar y aislar las nuevas células de *Pediococcus pentosaceus* del conjunto que induzcan una producción de interleucina-10, expresada como incremento normalizado, superior a la producción de interleucina-10 por el control negativo, cuando el incremento normalizado se determina siguiendo las etapas de la reivindicación 1.

FIG. 1

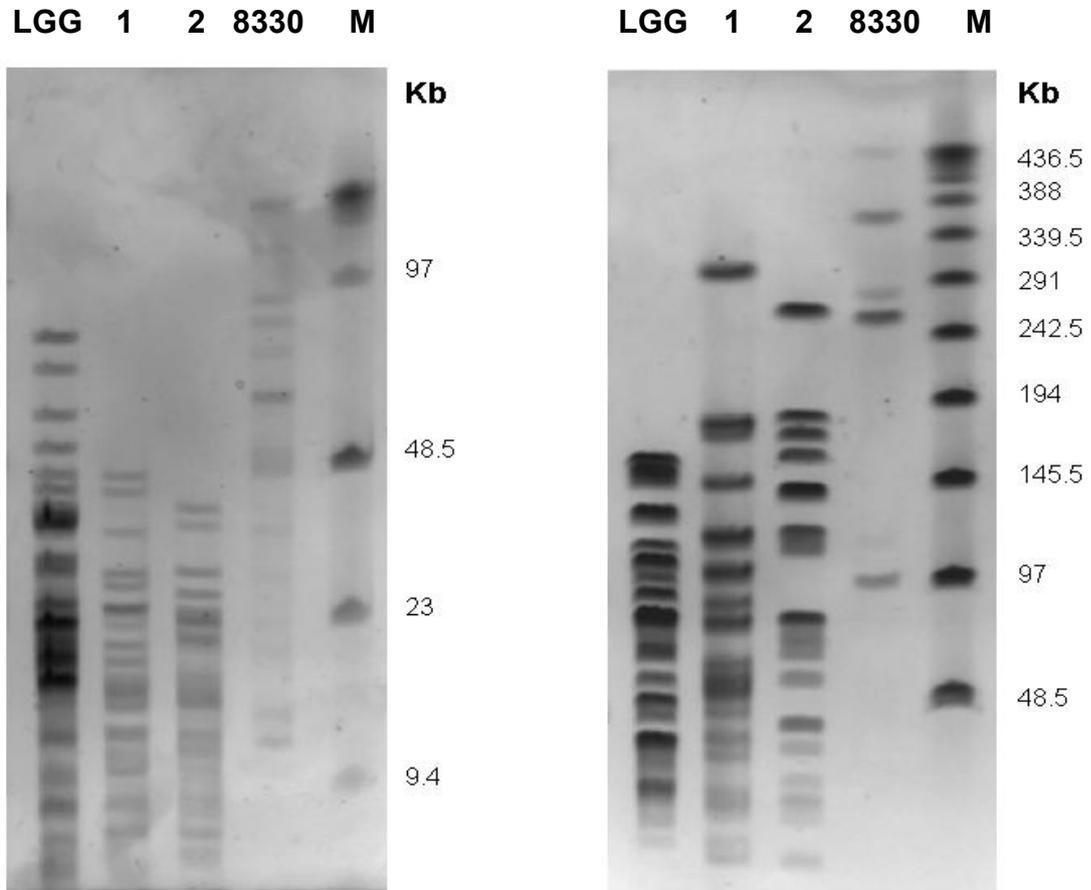


FIG. 2

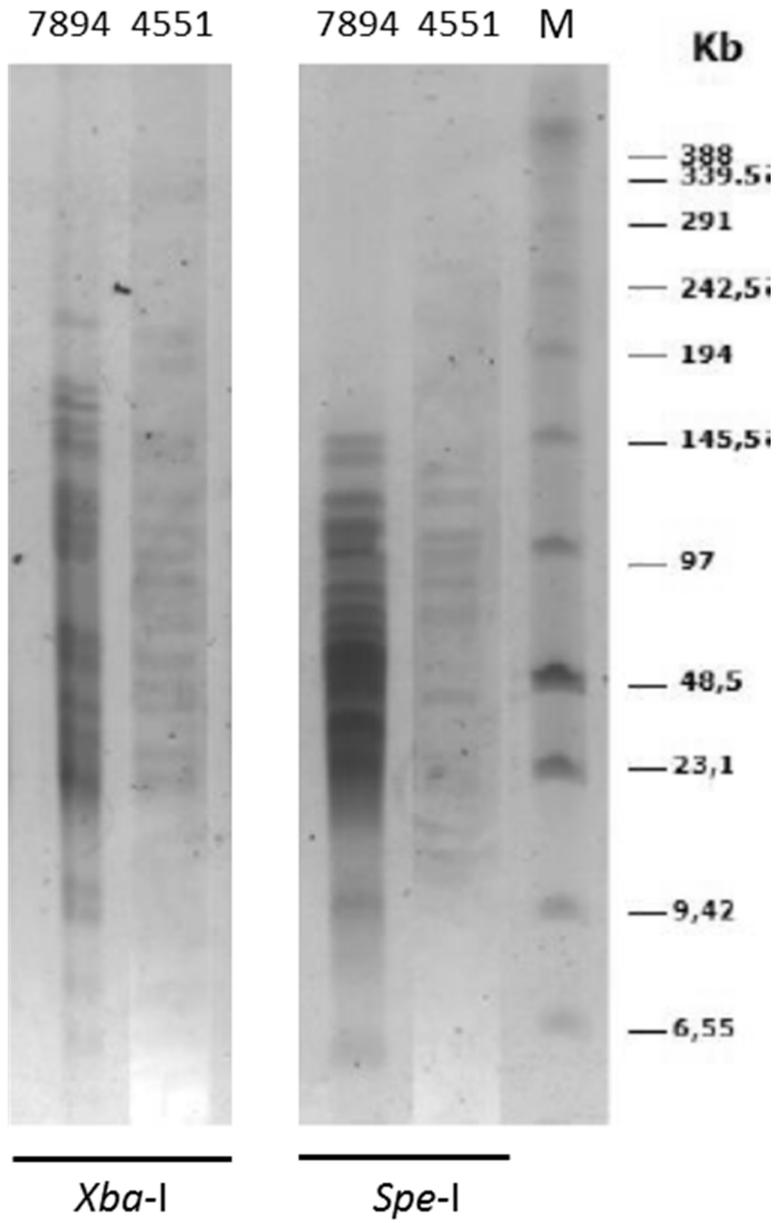


FIG. 3

