(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 692 660**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013** **PCT/FR2013/053044**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014** **WO14091160**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013** **E 13820807 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2932265**

(54) Título: **Cepas probióticas para el tratamiento y/o la prevención de la diarrea**

(30) Prioridad:

12.12.2012 FR 1261916

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2018

(73) Titular/es:

LESAFFRE ET COMPAGNIE (33.3%)
41, rue Etienne Marcel
75001 Paris, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) (33.3%) y
ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE BORDEAUX-AQUITAINE (BORDEAUX SCIENCES AGRO) (33.3%)

(72) Inventor/es:

KHUONG HUU, MARIE;
FIORAMONTI, JEAN y
URDACI, MARIA

(74) Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 692 660 T3

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

DESCRIPCIÓN

Cepas probióticas para el tratamiento y/o la prevención de la diarrea

Sector de la técnica

La presente invención se refiere al campo de las cepas probióticas, en particular de las cepas probióticas de *Bacillus,* útiles para el tratamiento y/o la prevención de la diarrea. La invención se refiere también a un procedimiento de selección de cepas probióticas que tienen la particularidad de actuar sobre la absorción de agua en el colon.

Estado de la técnica

Durante el funcionamiento normal, En el ser humano, el hombre absorbe aproximadamente un 99 % del agua que entra en su luz, lo que representa aproximadamente 2 litros de agua al día. El colon tiene la capacidad de absorber hasta 4 litros de agua adicionales. No obstante, más allá de 6 litros de agua al día, sus capacidades de absorción se saturan y aparece la diarrea.

La diarrea es un problema frecuente (aproximadamente dos mil millos de casos cada año en el mundo) que se caracterizan por deposiciones de consistencia líquida o blanda, más voluminosas y numerosas que de costumbre (más de 3 deposiciones al día). En los casos más extremos, se pueden perder más de 20 litros de fluido al día.

La diarrea no es una enfermedad, sino un síntoma. Su causa más frecuente es la ingestión de agua o alimentos contaminados; dura en este caso uno o dos días sin necesidad de tratamiento. Pero la propia diarrea puede provocar una deshidratación que puede ser mortal, sobre todo en el lactante donde una pérdida de peso superior al 10 % es una urgencia hospitalaria. Según la Organización Mundial de la Salud, las diarreas son la segunda causa de mortalidad infantil en los países del tercer mundo, y son responsables del 18 % de las muertes de niños menores de 5 años (Bryce et al., Lancet, 2005, 365: 1147-1152).

La deshidratación producida por la diarrea aparece cuando las pérdidas de fluido no se compensan. En situaciones normales, las deposiciones se desecan en el colon. Los fenómenos de reabsorción del agua contenida en las materias ingeridas se producen en las células cólicas mediante una combinación de transportes activos y pasivos de agua y de electrolitos. En las criptas de las invaginaciones del epitelio cólico, se produce una secreción de agua que va desde la sangre hasta el medio exterior. En una persona con buena salud, estos dos fenómenos están compensados y permiten mantener una hidratación conveniente de las deposiciones, lo que favorece el tránsito intestinal y mejora las condiciones de circulación de las moléculas.

Existen numerosas causas posibles de diarrea, entre las que se encuentran las diarreas de origen infeccioso inducidas por un patógeno vírico, bacteriano o parasitario, y las diarreas no infecciosas, como las diarreas inducidas por una intolerancia alimentaria, un régimen de grasas, alcohol, un factor psicológico, la administración de un medicamento, la administración de un procedimiento terapéutico, las diarreas asociadas a una enfermedad o dolencia clínica, o las diarreas asociadas a una abstinencia de un estupefaciente.

Según la duración de los síntomas, se distingue entre diarreas agudas y diarreas crónicas, cuyos síntomas duran respectivamente menos de dos semanas y al menos dos semanas.

Un medicamento clásico para el tratamiento de la diarrea es, por ejemplo, la loperamida, que actúa al mismo tiempo estimulando la absorción de agua y electrolitos y ralentizando la duración del tránsito. No obstante, la ralentización de la duración del tránsito puede ser un problema en caso de infecciones grabes del tipo *Salmonella, Shigella* o *Clostridium difficile,* puesto que la duración de la residencia en el intestino de la bacteria patógena se prolonga.

Los probióticos constituyen una alternativa interesante para el tratamiento y/o la prevención de la diarrea. Los probióticos más utilizados para esta indicación son las bacterias lácticas. En este caso, se describe que los probióticos tienen una acción beneficiosa sobre el sistema inmunitario y sobre el equilibrio de la flora intestinal.

Otros estudios han buscado poner de manifiesto novedosas dianas para el tratamiento o la prevención de la diarrea. De este modo, el documento WO 2004/028480 describe compuestos de tipo tiazolidinona que permiten disminuir la eficacia del transporte de iones cloruro mediante la proteína CFTR *(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator [regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis cística])* y su uso en el tratamiento de la diarrea secretora. Bradford et al. (Am. J. Physiol. Gastrointes. Liver Physiol., 2009, 296: G886-G898) se interesaron en los medios para tratar los problemas de obstrucción intestinal y de deshidratación en pacientes afectados de mucoviscidosis (en los que la expresión de CFTR está alterada).

Por otro lado, se ha descrito que la pérdida parcial o total de la proteína NHE3 *(Sodium Hydrogen Exchanger [intercambiador de sodio-hidrógeno]* 3) en ratones afectados de mucoviscidosis reduce la incidencia de obstrucciones intestinales, especialmente aumentando la fluidez intestinal, y concluyen que NHE3 es una diana potencial para regular la fluidez del tracto intestinal en pacientes afectados de mucoviscidosis y en los que la

expresión de CFTR está alterada. Geetu Raheja et al. (Amer. J. Physiol. Gastroint. and Liver Physiol., 2010, 298(3): G395-G401) han mostrado que una cepa probiótica que induce el aumento en la expresión de un transportador (SCL26A3) implicado en la absorción de agua en el colon puede ser beneficioso para el tratamiento de la diarrea.

Por tanto, sigue existiendo necesidad de disponer de novedosas estrategias para el tratamiento y/o la prevención de las diarreas.

Objeto de la invención

De una forma general, la presente invención se refiere a la puesta de manifiesto que, de forma totalmente original, algunas cepas probióticas pueden actuar directamente sobre la diarrea, induciendo una absorción de agua presente en exceso en el colon. De manera sorprendente e inesperada, los inventores han mostrado que algunas cepas probióticas pueden inhibir la expresión de los transportadores implicados en la secreción de agua en el colon y/o estimular la expresión de los transportadores implicados en la absorción de agua en el colon, y se pueden utilizar para el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

De este modo, de forma totalmente original, las cepas probióticas no actúan como inhibidores de los transportadores, es decir, no actúan fijándose a los transportadores, impidiendo así su funcionamiento, pero actúan sobre su expresión y, por tanto, sobre el número de transportadores presentes.

Por otro lado, dichas cepas probióticas que actúan directamente sobre la absorción del agua presente en exceso en el colon tienen la ventaja se poderse utiliza para la prevención y/o el tratamiento de todo tipo de diarreas, especialmente que la diarrea sea de origen infeccioso o no infeccioso y en presencia o no de una disbiosis.

De esta forma, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de selección de una cepa probiótica para el tratamiento y/o prevención de la diarrea, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- medida del efecto de al menos una cepa a estudiar respecto de la expresión de la proteína CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator [regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis cística])* en una muestra biológica, y
- selección de al menos una cepa que induce una disminución de la expresión de la proteína CFTR,

donde la muestra biológica es una muestra de intestino proximal o de los colonocitos.

En determinadas realizaciones, el procedimiento de selección de una cepa probiótica para el tratamiento y/o prevención de la diarrea de acuerdo con la invención, comprende además las etapas de:

- medida del efecto de al menos una cepa a estudiar respecto de la expresión de la proteína NHE3 (*Sodium Hydrogen Exchanger [intercambiador de sodio-hidrógeno]* 3), en una muestra biológica, y
- selección de al menos una cepa que induce un aumento en la expresión de la proteína NHE3,

donde la muestra biológica es una muestra de intestino proximal o de los colonocitos.

En determinadas realizaciones, la cepa a estudiar es una cepa de levadura o una cepa de bacteria. En particular, una cepa de bacteria a someter a ensayo puede ser una cepa de *Bacillus,* preferentemente una cepa de *Bacillus subtilis.*

En determinadas realizaciones, la expresión de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3 se mide por electroforesis, transferencia Western, inmunoensayo, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, espectrometría de masas, RT-PCR o transferencia Northern.

Una cepa probiótica seleccionada según un procedimiento de acuerdo con la invención se puede utilizar en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa probiótica para el tratamiento, o una composición que comprende la cepa probiótica, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la diarrea, donde la cepa probiótica es la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París Cedex 15) el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745.

El presente documento también describe las células obtenidas mediante el cultivo de una cepa probiótica seleccionada según un procedimiento de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la diarrea, en particular, las células de *Bacillus subtilis* obtenidas por el cultivo de la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la diarrea.

El presente documento también describe un método de tratamiento y/o prevención de la diarrea en un paciente que

comprende la administración al paciente de una cantidad eficaz de células obtenida mediante el cultivo de una cepa probiótica seleccionada según un procedimiento de acuerdo con la invención.

La aplicación del método de tratamiento y/o de prevención de la diarrea comprende preferentemente la administración de células de *Bacillus subtilis* obtenidas por cultivo de una cepa probiótica de *Bacillus subtilis,* preferentemente la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745.

Las diarreas que se pueden tratar de forma preventiva y/o curativa de acuerdo con la invención incluyen las diarreas agudas y las diarreas crónicas.

En determinadas realizaciones, la diarrea tratada de acuerdo con la invención es una diarrea de origen infeccioso inducida por un patógeno vírico, bacteriano o parasitario.

En otras realizaciones, la diarrea tratada de acuerdo con la invención es una diarrea de origen no infeccioso.

Una diarrea de origen no infeccioso es, por ejemplo, una diarrea inducida por una intolerancia alimentaria, una diarrea inducida por un régimen de grasas, una diarrea inducida por alcohol, una diarrea inducida por un factor psicológico, una diarrea inducida por la administración de un medicamento, una diarrea inducida por la administración de un procedimiento terapéutico, una diarrea asociada a una enfermedad o dolencia clínica, o una diarrea asociada a la abstinencia de un estupefaciente.

Se proporciona a continuación una descripción más detallada de algunas realizaciones preferidas de la invención.

Descripción detallada de la invención

Como se menciona anteriormente, la presente invención se refiere a la identificación de cepas probióticas capaces de actuar sobre la absorción de agua en el colon por acción directa en los transportadores implicados en la regulación del fluido intestinal, y su uso como medicamentos en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

I - Procedimiento de selección de cepas probióticas

Un procedimiento de selección descrito en el presente documento tiene por objeto identificar una cepa probiótica que sea útil en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

El procedimiento de selección de una cepa probiótica para el tratamiento y/o prevención de la diarrea comprende las etapas de:

- medir el efecto de al menos una cepa a someter a ensayo sobre la expresión de al menos un transportador implicado en la absorción o la secreción de agua en el colon, y
- selección de al menos una cepa que induce una disminución de la expresión de al menos un transportador implicado en la secreción de agua en el colon y/o un aumento en la expresión de al menos un transportador implicado en la absorción de agua en el colon.

Un ejemplo de transportador implicado en la secreción de agua en el colon es la proteína CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator [regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis cística]).*

Un ejemplo de transportador implicado en la absorción de agua en el colon es la protección NHE3 *(Sodium Hydrogen Exchanger [intercambiador de sodio-hidrógeno]*3).

Un procedimiento de selección de acuerdo con la invención se caracteriza por que comprende:

- la medida del efecto de al menos una cepa a estudiar respecto de la expresión de la proteína y/o de la proteína NHE3, et
- la selección de al menos una cepa que induce una disminución de la expresión de la proteína CFTR,

y opcionalmente:

- la medida del efecto de al menos una cepa a estudiar respecto de la expresión de la proteína NHE3, y
- la selección de al menos una cepa que induce un aumento en la expresión de la proteína NHE3.

La cepa seleccionada al finalizar el procedimiento de selección es, por tanto, una cepa probiótica útil en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

Por "cepa probiótica", se entiende diseñar en el presente documento una cepa de un microorganismo vivo que ejerce un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador.

El hospedador es, generalmente, un ser humano, pero se puede considerar que el hospedador sea otro mamífero, como por ejemplo perros, gatos, rumiantes, especialmente corderos, cabras, vacas, vacas, cérvidos, camélido, équidos, suínidos, especialmente cerdos y lechones, lepóridos, múridos y los cávidos.

Cepas a estudiar

La cepa a estudiar según un procedimiento de selección puede ser cualquier cepa de microorganismos.

La cepa a estudiar puede ser una cepa de levadura. Entre las levaduras que se pueden estudiar, se pueden citar, por ejemplo, las levaduras del género *Saccharomyces,* especialmente las especies *Saccharomyces boulardii, Saccharomyces cerevisiae,* las levaduras del género *Kluyveromyces,* especialmente las especies *Kluyveromyces marxianus.*

La cepa a estudiar puede ser una cepa de bacteria.

La cepa a estudiar se selecciona preferentemente entre las bacterias reconocidas por no representar un peligro para el ser humano y/o los animales.

Entre las bacterias que se pueden estudiar, se pueden citar, por ejemplo, las bacterias del género *Bifidobacterium,* especialmente las especies *Bifidobacterium animalis, Bifidobacterium bifidum, Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium lactis, Bifidobacterium longum,* y *Bifidobacterium brevis*; las bacterias del género *Lactobacillus,* especialmente las especies *Lactobacillus reuteri, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus casei, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus rhamnosus,* y *Lactobacillus salivarius*; las bacterias del género *Weisella,* especialmente las especies *Weisella cibaria, Weisella kimchii, Weisella thailandensis*; las bacterias del género *Bacillus,* especialmente las especies *Bacillus subtilis, Bacillus coagulans, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis, Bacillus cereus* et *Bacillus clausii*; las bacterias del género *Lactococcus,* especialmente las especies *Lactococcus lactis*; las bacterias del género *Enterococcus,* especialmente las especies *Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis*; las bacterias del género *Streptococcus,* especialmente las especies *Streptococcus thermophilus*; las bacterias del género *Escherichia,* especialmente las especies *Escherichia coli.*

Expresión de CFTR y/o NHE3

Un procedimiento de selección descrito en el presente documento comprende la medida del efecto de la cepa a estudiar sobre la expresión de al menos un transportador implicado en la absorción o la secreción de agua en el colon, especialmente sobre la expresión de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3.

En el presente documento, se entiende por "proteína CFTR", la proteína que en la especie humana está codificada por el gen *CFTR* (por "*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*" [regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis cística]") que se encuentra en el locus 7q31.2, en la región q31.2 del brazo largo del cromosoma 7. El gen CFTR está muy conservado entre las especies. En el ser humano, la proteína CFTR tiene por ejemplo la secuencia polipeptídica con número de orden GenBank NP_00483 que tiene una longitud de 1480 aminoácidos.

La proteína CFTR forma un canal permeable a los iones cloruro y tiocianato de las células epiteliales.

La proteína CFTR se expresa en el polo apical de las células epiteliales de los canales pancreáticos, biliares, las criptas intestinales, del árbol traqueobronquial, los túbulos renales, el aparato genital y las glándulas sudoríparas.

Se ha demostrado que los inhibidores de CFTR, como la tiazolidinona, son de aplicación en el tratamiento y/o la prevención de diarreas (Verkman et al., Curr. Pharm. Des., 2006, 12: 2235-2247).

En un procedimiento de selección de acuerdo con la invención, una cepa estudiada que induce una disminución de la expresión de la proteína CFTR puede ser útil, por tanto, en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

En el presente documento, se entiende por "proteína NHE3", la proteína que en la especie humana está codificada por el gen *NHE3* (por "*Sodium-Hydrogen Exchanger [intercambiador de sodio-hidrógeno]* 3», también conocido con el nombre *SLC9A3* por "*Soluté Carrier Family 9 Member 3 [miembro 3 de la familia del transportador en solución 9]*"), que se encuentra en el cromosoma 13. En el ser humano, la proteína NHE3 tiene por ejemplo la secuencia polipeptídica con número de orden GenBank NP_004165 que tiene una longitud de 834 aminoácidos.

La proteína NHE3 se expresa en la nefrona del riñón y en la membrana apical de las células endoteliales del intestino, donde es principalmente responsable del mantenimiento del equilibrio del sodio.

Se ha mostrado que ratones genéticamente modificados para inactivar el gen *NHE3* padecen diarrea (Schultheis et al., 1998, Nat. Genet 19: 282-285).

En un procedimiento de selección de acuerdo con la invención, una cepa estudiada que induce un aumento de la expresión de la proteína NHE3 puede ser útil, por tanto, en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

La medida del efecto de la cepa a estudiar sobre la expresión de un transportador implicado en la absorción o la secreción de agua en el colon, especialmente sobre la expresión de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede realizar utilizando cualquier método conocido del experto en la materia (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratories Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY), la naturaleza del método utilizado no es un elemento crítico o limitante.

En general, el índice de expresión de una proteína se puede determinar por un método directo, tal como por un método de electroforesis, por un método de transferencia Western, por un método de inmunoensayo, por un método de inmunohistoquímica, por un método de inmunocitoquímica, por un método de espectrometría de masas.

También es posible determinar el índice de expresión de una proteína por un método indirecto.

Un método indirecto puede consistir en medir la tasa de transcripción del gen correspondiente, por ejemplo, por RT-PCR (transcripción inversa seguida de una amplificación en cadena con polimerasa), preferentemente mediante RT-PCR cuantitativa, o por un método de transferencia Northern.

Otro ejemplo de método indirecto puede consistir en medir la actividad de la proteína, estando la actividad de la proteína correlacionada con la cantidad de proteína funcional presente.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante electroforesis.

La electroforesis permite separar las proteínas según su masa molecular. Se trata generalmente de una electroforesis en gel de poliacrilamida que contiene laurilsulfato de sodio (denominado SDS-PAGE por *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis [electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio]).* También se puede tratar de una electroforesis bidimensional, tal como un isoelectrofocalización que permite separar las proteínas según su masa molecular y su punto isoeléctrico.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante transferencia Western.

La transferencia Western, también denominada técnica de Western, consiste en separar las proteínas por electroforesis sobre un gel de poliacrilamida, transferir posteriormente las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de soporte, sobre la que se marcan las proteínas de interés mediante el uso de anticuerpos marcados específicos contra dichas proteínas.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante inmunoensayo. Por "inmunoensayo", se designa en el presente documento cualquier técnica que utiliza la reacción antígeno-anticuerpo para la detección y la cuantificación de antígenos, anticuerpos o sustancias parecidas. El complejo anticuerpo-antígeno se puede visualizar de varias formas. En la mayoría de los casos, un anticuerpo está conjugado a una enzima (por ejemplo: peroxidasa) que puede catalizar una reacción de producción de color (por ejemplo: coloración con inmunoperoxidasa). De forma alternativa, los anticuerpos se pueden marcar con un fluoróforo (por ejemplo: FITC, rodamina, Texas Red o Alexa Fluor). La detección del complejo anticuerpo-antígeno se realiza seguidamente por inmunofluorescencia.

Los anticuerpos monoclonales específicos de la proteína CFTR humana y de la proteína NHE3 humana son conocidos en el estado de la técnica y están comercialmente disponibles.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante inmunohistoquímica. El término "inmunohistoquímica" se refiere a un método basado en el uso de anticuerpos para situar una proteína en tejidos. Por lo general, el tejido se fija, lava, después se permeabiliza. A continuación, se incuba con un anticuerpo primario que reconoce específicamente la proteína de interés (aquí, por ejemplo, la proteína CFTR o la proteína NHE3). Se añade un segundo anticuerpo acoplado con un sistema de detección. El sistema de detección es, por ejemplo, un fluorocromo o una enzima cuya puesta en presencia del sustrato produce una reacción coloreada. Este segundo anticuerpo reconoce la parte constante Fc del anticuerpo primario y debe proceder de una especie diferente a este último. Tras montaje en un medio que proteja la fluorescencia de la muestra si se trata de un fluorocromo o en presencia de un sustrato si se trata de una enzima, el tejido se analiza con el microscopio de fluorescencia o confocal. El índice de expresión de la proteína de interés se puede determinar seguidamente mediante análisis densitométrico, por media de la intensidad de fluorescencia, o por espectrofotometría.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante inmunocitoquímica.

La inmunocitoquímica es una técnica similar a la inmunohistoquímica, salvo que la muestra de partida es una preparación citológica en lugar de un tejido.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante espectrometría de masas.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante RT-PCR.

La RT-PCR consiste en una transcripción inversa del ARN en ADNc, seguido de una amplificación en cadena mediante polimerasa (PCR). La RT-PCR es, preferentemente, una RT-PCR cuantitativa que permite cuantificar el ARN inicial correspondiente a la proteína de interés.

El índice de expresión del transportador y, especialmente, de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se puede determinar mediante transferencia Northern.

La transferencia Northern, también denominada transferencia de Northern, es una técnica que consiste en separar las moléculas de ARN dependiendo de su tamaño por electroforesis en gel, y posteriormente transferir el ARN a una membrana donde se puede detectar mediante una sonda de hibridación marcada que es específica del ARN de la proteína a cuantificar.

Muestra biológica

Un procedimiento de selección descrito en el presente documento comprende la medida del efecto de la cepa a estudiar sobre la expresión de al menos un transportador implicado en la absorción o la secreción de agua en el colon, especialmente sobre la expresión de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, en una muestra biológica.

La expresión "muestra biológica", como se utiliza en el presente documento, tiene su sentido más amplio. Una muestra biológica puede ser cualquier tejido biológico en el que la proteína de interés (especialmente la proteína CFTR o la proteína NHE3) se expresa y, por tanto, se puede detectar y cuantificar.

Las muestras biológicas que se pueden utilizar en la aplicación de un procedimiento de selección descrito en el presente documento pueden proceder, por ejemplo, del intestino, los canales pancreáticos, los canales biliares, los túbulos renales, el árbol traqueobronquial, el aparato genital, las glándulas sudoríparas, y la nefrona del riñón.

Preferentemente, la muestra biológica es una muestra que procede del intestino, preferentemente una muestra del colon.

Preferentemente se extirpa una muestra de tejido de un animal modelo, por ejemplo, mediante biopsia. El animal modelo es preferentemente un mamífero, por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un cerdo, un pollo, un simio. El animal modelo puede ser un animal transgénico.

Una muestra biológica preferida es una muestra tisular que comprende colonocitos, es decir, las células de la mucosa cólica.

La muestra biológica también puede ser un material biológico derivado de un tejido y que expresa la proteína de interés.

El material biológico derivado se selecciona, por ejemplo, entra las células aisladas de la muestra tisular o también de las proteínas extraídas de las células aisladas de la muestra tisular.

La expresión "muestra biológica" también incluye las células de una línea de células conocida por expresar la proteína de interés, especialmente la proteína CFTR y/o la proteína NHE3.

Los ejemplos de líneas celulares que expresan la proteína CFTR incluyen las células Caco-2 aisladas del colon, las células HT-29 aisladas del colon o las células T84 aisladas del colon.

Los ejemplos de líneas celulares que expresan la proteína NHE3 incluyen células Caco-2 aisladas del colon, células HT-29 aisladas del colon o células T84 aisladas del colon.

Estas líneas celulares están comercialmente disponibles, por ejemplo, de la ATCC *(American Type Culture Collection).*

La muestra biológica puede ser un extracto proteico aislado de células o tejidos que expresan la proteína de interés, especialmente la proteína CFTR y/o NHE3. Los métodos de extracción de proteínas son bien conocidos del experto en la materia (véase por ejemplo, "Protein Methods", D.M. Bollag et al., 2ª Ed., 1996, Wiley-Liss; "Protein Purification

Methods: A Practical Approach", E.L. Harris y S. Angal (Eds.), 1989; "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", S. Roe, 2ª Ed., 2001, Oxford University Press; "Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization", H. Ahmed, 2005, CRC Press: Boca Raton, FL). También existen kits comerciales para la extracción de proteínas a partir de tejidos o fluidos biológicos. Dichos kits se comercializan, por ejemplo, por BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL), e Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). El experto en la materia sabe seleccionar el kit más adaptado a la situación.

Efecto de la cepa a estudiar

En un procedimiento de selección descrito en el presente documento, el efecto cepa a estudiar sobre la expresión de un transportador implicado en la absorción o la secreción de agua en el colon, especialmente de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3, se determina comparando el índice de expresión de la proteína de interés medido en una muestra biológica obtenida de un animal modelo que se ha tratado con la cepa a estudiar y el índice de expresión de la proteína de interés medido en una muestra biológica (del mismo tipo que la anterior) obtenida de un animal modelo (del mismo tipo que el anterior) que no se ha tratado con la cepa a estudiar. Este último animal se denomina animal de control.

De este modo, por ejemplo, en la aplicación de un procedimiento de selección descrito en el presente documento en el que la muestra biológica procede de un animal modelo, una cantidad dada de células obtenidas por cultivo de la cepa a estudiar se administra al animal modelo.

La cantidad de células se puede administrar de una sola vez.

De forma alternativa, la cantidad de células se puede administrar en varias veces, bien el mismo día o en varios días o semanas.

La administración de las células obtenidas por cultivo de la cepa a estudiar se puede realizar por cualquier método de administración adaptado al animal modelo utilizado. Por ejemplo, la administración se puede realizar por inyección, especialmente por inyección intragástrica, de una solución o de una suspensión que contiene un vehículo adecuado y una cantidad dada de células obtenidas por cultivo de la cepa a estudiar. Al animal de control se administra el mismo volumen de una solución que contiene solamente vehículo.

Asimismo, en la aplicación de un procedimiento de selección descrito en el presente documento en el que la muestra biológica es de una línea de células, el efecto de la cepa a estudiar se determina comparando el índice de expresión de la proteína de interés medido en las células de la línea de células que se han tratado con la cepa a estudiar y el índice de expresión de la proteína de interés medido en las células (de la misma línea celular) que no se han tratado con la cepa a estudiar. Estas últimas células se denominan células control.

De este modo, por ejemplo, en la aplicación de un procedimiento de selección descrito en el presente documento en el que la muestra biológica es de una línea de células, las células de una línea celular se incuban con una cantidad dada de una solución o de una suspensión que contiene un vehículo adecuado y una cantidad dada de células obtenidas por cultivo de la cepa a estudiar. Las células control de la línea celular se incuban en las mismas condiciones en presencia del mismo volumen de una solución que contiene solamente vehículo.

Los procedimientos de cultivo de una cepa, independientemente que sea una cepa de lavadura o una cepa de bacteria, son conocidos en la técnica, y el experto en la materia sabe optimizar las condiciones de cultivo de cada cepa dependiendo de su naturaleza.

Asimismo, el experto en la materia sabe determinar las cantidades óptimas de células obtenidas por el cultivo de la cepa a estudiar para su administración a un animal modelo o para su incubación con las células de una línea de células.

Por ejemplo, las células de *Bacillus subtilis* se obtienen por cultivo de una cepa de *Bacillus subtilis* en un medio de cultivo, especialmente como se describe en la obra Biotechnologie, 5ª edición, R. Scriban, Edition Tec. & Doc., 1999, ISBN: 2-7430-0309-X.

Normalmente, un procedimiento de producción de células de *Bacillus subtilis* por cultivo de una cepa de *Bacillus subtilis* comprende las etapas de:

- sembrar un medio de cultivo con un inóculo de la cepa de *Bacillus subtilis,*
- cultivo en condiciones aerobias, para obtener la multiplicación de las células,
- separación de la biomasa de su medio de cultivo, para obtener las células de *Bacillus subtilis.*

Las células de *Bacillus subtilis* así obtenidas se encuentran mayoritariamente en forma vegetativa.

La expresión "mayoritariamente en forma vegetativa" significa que al menos el 70 % de las células están en forma vegetativa, preferentemente al menos el 80 %, y más preferentemente al menos el 90 %.

La "forma vegetativa" de una bacteria designa la forma de una bacteria situada en condiciones favorables.

Un ejemplo de condiciones favorables es un medio de cultivo no limitante a una temperatura y un pH favorables a la multiplicación bacteriana.

Un medio de cultivo no limitante contiene todos los elementos nutritivos necesarios para la multiplicación de las células.

El procedimiento de producción de células de *Bacillus subtilis* también puede comprender una etapa intermedia de puesta de las células en condiciones desfavorables, entre la etapa de cultivo en condiciones aerobias y la etapa de separación de la biomasa. Las células de *Bacillus subtilis* obtenidas al finalizar el procedimiento de producción se encuentran, por tanto, mayoritariamente en forma esporulada.

La expresión "mayoritariamente en forma esporulada" significa que al menos el 70 % de las células están en forma esporulada, preferentemente al menos el 80 %, y más preferentemente al menos el 90 %.

La "forma esporulada" de una bacteria designa la forma de una bacteria situada en condiciones desfavorables. Por tanto, la forma esporulada es una forma de resistencia que le permite soportar un medio difícil, tal como, por ejemplo, una falta de nutrientes, es decir, un medio con limitación de nutrientes, un estrés hídrico, una variación importante del pH o la temperatura, o incluso el paso por el tubo digestivo.

La puesta en condiciones desfavorables de las células de las bacterias se obtiene, por ejemplo, mediante: una no renovación del medio de cultivo de las bacterias, una detención de la alimentación con medio de cultivo, el uso de un medio de cultivo limitante, un cambio de temperatura, un cambio de pH, o su combinación.

El procedimiento de producción de células de *Bacillus subtilis* también puede comprender una etapa posterior de secado de las células, para obtener las células de *Bacillus subtilis* en forma seca.

La expresión "células de *Bacillus subtilis* en forma seca" significa que la biomasa obtenida al finalizar el procedimiento de producción de las células de *Bacillus subtilis* comprende más del 90 % de materia seca, preferentemente más del 95 % de materia seca.

El secado es, por ejemplo, un secado por liofilización, un secado en lecho fluidizado o un secado por atomización.

Identificación de una cepa probiótica para el tratamiento y/o la prevención de la diarrea

La comparación entre el índice de expresión de la proteína de interés medido en la muestra tratada con la cepa a estudiar y el índice de expresión de la proteína de interés medido en la muestra de control permite determinar si la cepa estudiada induce una disminución o un aumento en la expresión de la proteína de interés o si no tiene ningún efecto sobre dicha expresión.

Como se ha indicado anteriormente, una cepa para la que se ha determinado, según un procedimiento de selección descrito en el presente documento, que induce una disminución de la expresión de al menos un transportador implicado en la secreción de agua en el colon y/o un aumento de la expresión de al menos un transportador implicado en la absorción de agua en el colon es una cepa probiótica que puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

Los Inventores han demostrado que una cepa probiótica de ese tipo es capaz de inducir una absorción de agua presente en exceso en el colon y, por tanto, es de aplicación en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

Por "disminución de la expresión de un transportador implicado en la secreción de agua en el colon", se entiende designar una disminución significativa de la expresión de dicho transportador con respecto a su expresión en ausencia de la cepa a estudiar.

El carácter "significativo" de dicha disminución se determina mediante análisis estadístico.

Cuando el efecto sobre la expresión del transportador se mide por inmunohistoquímica, una "disminución de la expresión del transportador" corresponde a una disminución significativa en la intensidad de la fluorescencia/μm^2 correspondiente a la expresión de dicho transportador con respecto a la obtenida en ausencia de la cepa a estudiar.

Por "aumento de la expresión de un transportador implicado en la absorción de agua en el colon", se entiende designar un aumento significativo de la expresión de dicho transportador con respecto a su expresión en ausencia de la cepa a estudiar.

El carácter "significativo" de dicho aumento se determina mediante análisis estadístico.

Cuando el efecto sobre la expresión del transportador se mide por inmunohistoquímica, un "aumento de la expresión del transportador" corresponde a un aumento significativo en la intensidad de la fluorescencia/µm2 correspondiente a la expresión de dicho transportador con respecto a la obtenida en ausencia de la cepa a estudiar.

Como reconocerá el experto en la materia, la identificación de una cepa probiótica útil para tratar y/o prevenir las diarreas se puede realizar usando solamente un procedimiento de selección descrito en el presente documento. El procedimiento de selección se puede llevar a cabo usando un único tipo de muestra biológica, por ejemplo, un animal modelo dado, o usando varios tipos de muestras biológicas, por ejemplo una línea de células, después al menos un animal modelo.

De forma alternativa, la identificación de una cepa probiótica capaz de actuar sobre la absorción de agua en el colon se puede llevar a cabo usando un procedimiento de selección descrito en el presente documento y posteriormente completando dicha selección con una serie de pruebas y ensayos clínicos, bien conocidos del experto en la materia.

II - Utilización de una cepa probiótica para el tratamiento y/o la prevención de la diarrea

Cualquier cepa probiótica identificada mediante un procedimiento de selección como capaz de inducir una absorción del agua presente en exceso en el colon puede ser útil en el tratamiento y/o prevención de la diarrea. Una cepa probiótica de ese tipo se puede utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

Como se ha indicado anteriormente, la cepa probiótica puede ser cualquier cepa de microorganismo, especialmente una cepa de levadura o una cepa de bacteria, como las anteriormente mencionadas.

En particular, los Inventores han demostrado que la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745 es una cepa probiótica que actúa sobre la absorción del exceso de agua en el colon y, por tanto, puede ser útiles para tratar y/o prevenir las diarreas.

Esta cepa se ha descrito en el documento FR 2 837 835 que divulga un adyuvante vivo que comprende dicha cepa para una inmunización en la mucosa gastrointestinal.

Las células de levadura o las células de bacteria obtenidas mediante el cultivo de una cepa probiótica identificada según un procedimiento de selección descrito en el presente documento son útiles en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

Como se ha indicado anteriormente, las condiciones de cultivo de una cepa son generalmente conocidas en la materia o bien las puede determinar con facilidad el experto en la materia.

En particular, las células obtenidas por el cultivo de la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745, son útiles en el tratamiento y/o prevención de la diarrea.

Las "células obtenidas por el cultivo de la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745 se denominan en lo sucesivo como "células CU1".

La producción de célula CU1 se puede realizar como se ha descrito anteriormente.

Las células CU1 utilizadas en el tratamiento y/o prevención de la diarrea son células en forma esporulada y/o en forma vegetativa.

Preferentemente, las células CU1 están mayoritariamente en forma esporulada.

Preferentemente, las células CU1 utilizadas en el tratamiento y/o prevención de la diarrea están en forma seca.

Más preferentemente aún, las células CU1 utilizadas en el tratamiento y/o prevención de la diarrea están mayoritariamente en forma esporulada y en forma seca.

Cualquier extracto de célula de levadura probiótica o de célula de bacteria probiótica y cualquier filtrado de cultivo de una cepa probiótica, que tenga la capacidad de inducir una disminución de la expresión de la proteína CFTR y/o un aumento de la expresión de la proteína NHE3, puede inducir una absorción del agua en exceso en el colon.

Un método de tratamiento y/o de prevención de la diarrea comprende la administración, al paciente, de una cantidad eficaz de células de levadura o células de bacteria obtenidas por cultivo de una cepa probiótica identificada según un procedimiento de selección descrito en el presente documento. La cantidad eficaz de células de levadura o de células de bacteria, que se pueden administrar en una o varias dosis, se puede determinar por el médico. La

cantidad exacta a administrar puede variar de un paciente a otro, según la edad, el peso, el estado de salud general del paciente, la naturaleza y la gravedad de la diarrea, etc. La cantidad exacta a administrar también puede variar según el efecto terapéutico deseado (es decir, prevenir una diarrea o tratar una diarrea).

La vía de administración, oral o parenteral, se puede seleccionar según la naturaleza de la diarrea y/o según la edad y el estado de salud general del paciente.

En caso de prevención de una diarrea, las células de levadura o las células de bacteria obtenidas por cultivo de una cepa probiótica identificada según el procedimiento de selección descrito en el presente documento se administran antes de la aparición de los síntomas.

En caso del tratamiento de una diarrea, las células de levadura o las células de bacteria obtenidas mediante el cultivo de una cepa probiótica identificada según el procedimiento de selección descrito en el presente documento se administran después de la aparición de los síntomas.

De una forma general, cualquier diarrea se puede tratar usando una une cepa probiótica identificada según el procedimiento de selección descrito en el presente documento o las células obtenidas por cultivo de dicha cepa probiótica, comprendiendo las diarreas agudas y las diarreas crónicas.

Por "diarrea aguda", se entiende una diarrea cuyos síntomas duran menos de dos semanas, y por "diarrea crónica", una diarrea cuyos síntomas duran al menos dos semanas, preferentemente al menos un mes.

Las diarreas agudas incluyen, por ejemplo, las gastroenteritis víricas, las gastroenteritis bacterianas, y las toxiinfecciones alimentarias (por ejemplo, las salmonelosis, shigellosis, las infecciones por *Staphylococcus aureus,* las infecciones por *Bacilluscereus,* las infecciones por *Escherichia Coli).*

Las diarreas crónicas incluyen, por ejemplo, el síndrome de mama absorción, las gastroenteropatías (enfermedad celíaca, enfermedad de Whipple, enfermedad de Crohn, etc...), la diarrea motriz (es decir, una diarrea debida a la aceleración del tránsito intestinal), la diarrea secretora (es decir, una diarrea debida a una aceleración de la secreción hidroelectrolítica en el intestino delgado y/o el colon), la diarrea osmótica (es decir, una diarrea que deriva de la presencia, en el tracto gastrointestinal, de solutos que se absorben mal y producen un efecto osmótico).

Otras diarreas que se pueden tratar utilizando una cepa probiótica identificada en un procedimiento de selección descrito en el presente documento o de células obtenidas por cultivo de dicha cepa probiótica, incluyen las diarreas debidas a la ansiedad o a las emociones intensas, las diarreas debidas a intolerancias alimentarias (por ejemplo, lactosa en la leche de vaca, sorbitol, gluten, etc.), las diarreas debidas a determinados tratamientos como la magnesoterapia, la radioterapia o la quimioterapia o a determinadas cirugías como las gastrectomía o la resección ilíaca, las diarreas debidas a una sobrecarga o una irritación del estómago, los intestinos, el colon, etc., las diarreas debidas a la abstinencia de estupefacientes tales como la heroína, las diarreas debidas a algunos medicamentos tales como los antibióticos.

Otros ejemplos de diarreas que se pueden tratar utilizando una cepa probiótica identificada en un procedimiento de selección descrito en el presente documento o de células obtenidas por cultivo de dicha cepa probiótica, incluyen las diarreas que acompañan las crisis hepáticas o las indigestiones, las diarreas que son resultado de un consumo en exceso de determinados alimentos laxantes, y las diarreas de los deportistas.

En algunos casos, la diarrea tratada usando una cepa probiótica identificada en un procedimiento de selección descrito en el presente documento, o con células obtenidas por cultivo de dicha cepa probiótica no es una diarrea inducida por la administración de un antibiótico o, de forma más general, por la administración de un medicamento.

En otros casos, la diarrea tratada usando una cepa probiótica identificada en un procedimiento de selección descrito en el presente documento, o con células obtenidas por cultivo de dicha cepa probiótica no es una diarrea de origen infeccioso.

III - Composiciones

También se describe en el presente documento una composición para su uso en el tratamiento y/o prevención de la diarrea, comprendiendo la composición al menos une cepa probiótica identificada en un procedimiento de selección como se ha definido anteriormente o, más específicamente, las células obtenidas por cultivo de dicha cepa. En particular, una composición preferida comprende una cantidad eficaz de células obtenidas por el cultivo de la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745.

La composición puede ser una composición alimentaria, un complemento alimentario o una composición farmacéutica.

Una composición alimentaria designa cualquier tipo de alimento, bebida o producto de confitería.

La composición alimentaria puede ser, por ejemplo, una bebida, una barrita de cereales, una goma de mascar, chocolate, un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado, un producido fermentado de origen vegetal.

Por "complemento alimentario" se entiende un producto alimentario cuyo objetivo es completar la dieta alimentaria normal. Un complemento alimentario constituye una fuente concentrada de nutrientes u otras sustancias que tienen un efecto nutritivo o fisiológico, solos o combinados.

Un complemento alimentario se comercializa en forma de dosis, es decir, formas farmacéuticas tales como cápsulas, pastillas, comprimidos, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvo, ampolla de líquido, envase provisto de cuentagotas y otras formas análogas de preparaciones líquidas o en polvo destinadas a ingerirse en unidades medidas de escasa cantidad.

Una composición es adecuada, por ejemplo, para un uso diario de las células obtenidas por cultivo de la cepa probiótica en una cantidad de $1,10^{8}$ UFC a $1,10^{11}$ UFC, preferentemente en una cantidad de $1,10^{9}$ UFC a $1,10^{10}$ UFC cuando se destina a uso humano.

Una composición es adecuada, por ejemplo, para un uso diario de las células obtenidas por cultivo de la cepa probiótica en una cantidad de $1,10^{5}$ UFC a $1,10^{11}$ UFC, preferentemente en una cantidad de $1,10^{6}$ UFC a $1,10^{10}$ UFC cuando se destina a uso veterinario.

El término UFC designa Unidades formadoras de colonias.

IV - Composiciones farmacéuticas

Debido a su acción directa sobre los transportadores implicados en la regulación del fluido intestinal, una cepa probiótica identificada en un procedimiento de selección descrito en el presente documento o, más específicamente, las células de levadura o las células de bacteria obtenidas por cultivo de dicha cepa, se pueden utilizar como agente terapéutico.

Dichas células de levadura o de bacteria se pueden administrar tal cual o en forma de una preparación o composición farmacéutica en presencia de al menos un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable. En el presente documento, por "vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable" se entiende cualquier medio o aditivo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del principio activo (en el presente documento, las células de levadura o de bacteria), y que no sea excesivamente tóxico para el paciente o el sujeto, en las concentraciones en las que se administra. Un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable puede ser un vehículo o excipiente adecuado para su administración a seres humanos y/o a los animales (especialmente a los mamíferos).

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar utilizando cualquier combinación de dosis y de vía de administración eficaz para obtener el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta a administrar puede variar de un paciente a otro, según la edad, el peso, el estado de salud general del paciente, la naturaleza y la gravedad de la diarrea, etc. La vía de administración (oral o parenteral) se puede seleccionar según la naturaleza de la diarrea y/o según la edad y la salud del paciente.

Como ejemplo, una composición farmacéutica tal como se ha definido anteriormente puede estar destinada al uso diario de las células obtenidas por cultivo de la cepa probiótica en una cantidad de $1,10^{8}$ UFC a $1,10^{11}$ UFC, preferentemente en una cantidad de $1,10^{9}$ UFC a 10^{10} UFC, cuando se destina a uso humano.

De forma alternativa, una composición farmacéutica tal como se ha definido anteriormente puede estar destinada al uso diario de las células obtenidas por cultivo de la cepa probiótica en una cantidad de $1,10^{5}$ UFC a $1,10^{11}$ UFC, preferentemente en una cantidad de $1,10^{6}$ UFC a $1,10^{10}$ UFC, cuando se destina a uso veterinario.

La formulación de una composición farmacéutica puede variar dependiendo de la vía de administración y de la dosis para las que la composición está destinada a usarse. Tras la formulación con al menos un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable, una composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada para su administración a un mamífero, especialmente el ser humano, por ejemplo, en forma de tabletas, comprimidos, grageas, cápsulas, jarabes, pomadas, soluciones inyectables, supositorios, etc. El experto en la técnica sabe seleccionar los vehículos y los excipientes más adecuados para la preparación de un tipo dado de formulación. De este modo, por ejemplo, los excipientes tales como agua, 2,3-butanodiol, solución de Ringer, soluciones isotónicas de cloruro de sodio, monoglicéridos o diglicéridos sintéticos, y ácido oleico, se utilizan frecuentemente para la formulación de preparaciones inyectables. Las composiciones líquidas, comprendiendo las mismas emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires, etc., se pueden formular en presencia de disolventes, agentes solubilizantes, emulsionantes, aceites, ácidos grasos, y otros aditivos como agentes de suspensión, conservantes, edulcorantes, aromas, agentes viscosificantes, colorantes, etc. Las composiciones sólidas para administración por vía oral se pueden formular en presencia de un excipiente inerte como citrato de sodio y, opcionalmente, de aditivos tales como agentes aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes, aceleradores de la absorción, agentes lubricantes, etc.

Una composición farmacéutica se puede formular para la liberación inmediata del uno o varios principios activos, especialmente las células de levadura o las células de bacterias obtenidas por cultivo de la cepa probiótica. De forma alternativa, una composición farmacéutica se puede formular para una liberación prolongada o dirigida del uno o varios principios activos o para una protección de los principios activos, por ejemplo, con respecto a la acidez y de las enzimas gástricas.

Por tanto, es posible utilizar revestimientos resistentes al pH y/o a la acción de las enzimas gástricas, revestimientos sensibles al pH y/o a las acciones enzimáticas, o revestimientos bioadhesivos que se pegan a las paredes del estómago o del intestino, o incluso mediante el uso de sistemas de encapsulación.

Las composiciones farmacéuticas pueden, además, contener al menos un principio activo farmacéutico adicional (es decir, además de las células de levadura o de bacteria obtenidas por cultivo de la cepa probiótica).

Por "principio activo farmacéutico", se entiende cualquier compuesto o sustancia cuya administración tiene un efecto terapéutico o un efecto beneficioso para la salud o estado de salud general de un paciente o de un sujeto al que se administra.

De este modo, un principio activo farmacéutico puede ser activo contra la diarrea que se quiera prevenir o curar mediante la administración de la composición farmacéutica; o puede ser activo contra una dolencia o un síntoma asociado a la diarrea (por ejemplo, fiebre, vómito o calambres abdominales); o también puede aumentar la disponibilidad y/o la actividad del o de los principios activos de la composición farmacéutica.

Los ejemplos de principios activos farmacéuticos que pueden estar presentes en una composición incluyen, sin limitación, antiinflamatorios, antibióticos, agentes antipiréticos, agentes antieméticos, agentes antihistamínicos, vitaminas, agentes antiespasmódicos, etc.

Preferentemente, el otro principio activo farmacéutico no es una cepa de *Bacillus subtilis* ni células obtenidas por cultivo de dicha cepa, preferentemente no es una cepa de bacteria ni células obtenidas por cultivo de dicha cepa, más preferentemente no es una cepa probiótica ni células obtenidas por cultivo de dicha cepa.

Un ejemplo de composición farmacéutica es una que comprende células de levadura o de bacteria obtenidas por cultivo de la cepa probiótica, como único principio activo farmacéutico.

Preferentemente, la composición contiene células obtenidas por el cultivo de la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745, con exclusión de cualquier otra fuente de bacterias.

Más preferentemente aún, la composición de acuerdo con la invención contiene células obtenidas por el cultivo de la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745, con exclusión de cualquier otra fuente de bacterias o de levaduras.

De manera aún más preferida, la composición de acuerdo con la invención contiene células obtenidas por el cultivo de la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745, como único principio activo farmacéutico.

Salvo que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la descripción tienen el mismo significado que comprende normalmente un especialista habitual del campo al que pertenece la presente invención.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes describen algunas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, se entiende que los ejemplos solamente se presentan a títulos ilustrativo y no limitan en ningún caso el alcance de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Efecto del tratamiento con la cepa *Bacillus subtilis* CU1 sobre la expresión cólica de la proteína CFTR. La intensidad de fluorescencia/μm^2 se proporciona para el control (en blanco) y después del tratamiento con CU1 (en negro). * $p<0,005$

Figura 2. Efecto del tratamiento con la cepa *Bacillus subtilis* CU1 sobre la expresión cólica de la proteína NHE3. La intensidad de fluorescencia/μm^2 se proporciona para el control (en blanco) y después del tratamiento con CU1 (en negro). * $p<0,005$

Figura 3. Ausencia de efecto del tratamiento con la cepa *Lactobacillus plantarum* sobre la expresión cólica de la proteína CFTR. La intensidad de fluorescencia/μm^2 se proporciona para el control (en blanco) y después del

tratamiento con LR (en negro). * p<0,005

Figura 4. Ausencia de efecto del tratamiento con la cepa *Lactobacillus plantarum* sobre la expresión cólica de la proteína NHE3. La intensidad de fluorescencia/μm^2 se proporciona para el control (en blanco) y después del tratamiento con LR (en negro). * p<0,005

Figura 5. Agua excretada (en mg) en las deposiciones a 60 minutos (en negro) y entre 60 y 120 minutos (en blanco) tras la administración intravenosa de LPS (15 mg/kg) o de solución salina a ratones (promedio ± SEM, n=10-20). T-: ratones no tratados con CU1 que recibieron una inyección de solución salina; T+: ratones no tratados con CU1 que recibieron una inyección de LPS; T-/CU1: ratones tratados con CU1 que recibieron una inyección de solución salina, T+/CU1: ratones tratados con CU1 que recibieron una inyección de LPS. * P<0,05 vs T-; † P<0,05 vs T+

Figura 6. Agua excretada (en mg) en las deposiciones a 60 minutos (en negro), entre 60 y 120 minutes (en gris) y entre 120 et 180 minutes (en blanco) después de la administración intragástrica de aceite de ricino (200 µl) o de solución salina a los ratones (promedio ± SEM, n=10-19). T-: ratones no tratados con CU1 que recibieron una inyección de solución salina; T+: ratones no tratados con CU1 que recibieron una inyección de aceite de ricino; T-/CU1: ratones tratados con CU1 que recibieron una inyección de solución salina, T+/CU1: ratones tratados con CU1 que recibieron una inyección aceite de aceite de ricino. * P<0,05 vs T-; † P<0,05 vs T+

Ejemplo 1: Selección de cepas probióticas destinadas a la prevención y/o el tratamiento de la diarrea

Material y métodos

Cepas probióticas estudiadas.

Las cepas estudiadas son las siguientes: una cepa de *Lactobacillus plantarum* y la cepa *Bacillus subtilis* CU1.

Las células de *Bacillus subtilis* CU1 (en adelante CU1) se utilizaron en forma esporulada y seca.

Las células de *Lactobacillus plantarum* (en adelante LR) se utilizaron en forma vegetativa y liofilizada.

Medida del efecto de una cepa probiótica sobre la expresión de CFTR y de NHE3.

Cuatro semanas se trataron durante 2 semanas con cada una 10^9 UFC/día de CU1.

Cuatro semanas se trataron durante 2 semanas con cada una 10^9 UFC/día de LR.

Cuatro ratones no tratados con CU1 se utilizaron como control.

La expresión de CFTR y NHE3 se midió por inmunohistoquímica sobre colonocitos procedentes se ratones tratados con CU1 y de ratones control, como se describe a continuación.

Inmediatamente después del sacrificio de los ratones, las muestras del colon proximal (1 cm de longitud) se lavaron con una solución de NaCl al 0,9 %, se fijaron en una solución tampón al 4 % de formaldehído (6 h) y se sumergieron durante 24 h en una solución de sacarosa al 30 % a 4 °C.

Las muestras se fijaron en un medio Tissue Tek (Euromedex, Souffelweyersheim, Francia) y se congelaron en isopentano a -45 °C. Los cortes del criostato se fijaron después con acetona (10 minutos, -20 °C) y se hidrataron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) - leche. Tras incubación con solución de bloqueo (PBS con Triton X-100 al 0,25 % que contenía 0,1 % de albúmina de suero bovino (BSA)), los cortes se incubaron durante la noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra CFTR de ratón (1/100), contra NHE3 de ratón (1/200) o contra TLR4 de ratón (1/100) (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Los cortes se incubaron a continuación durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo de asno dirigido contra Ig de conejo marcado con FITC (1/2000, Uptima, Montluçon, Francia). A continuación los cortes se montaron en medio "Vectashield Hard-Set mounting médium" (Abcys, Les Ulis, Francia) y se examinaron con un microscopio de fluorescencia Nikon 90i (Nikon, Champigny-sur-Marne, Francia). La intensidad de la fluorescencia/μm^2 del inmunomarcado se midió con el programa informático Nis-Elements Ar (Nikon). Los análisis se realizaron sobre cinco cortes de un grupo de 4 ratones.

Resultados

Entre las cepas probióticas estudiadas, únicamente la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 actúa sobre la expresión de los dos transportadores CFTR y NHE3 que están implicados en los movimientos del agua a través de la mucosa cólica. Efectivamente, como muestra la Figura 1, el tratamiento de los ratones durante dos semanas con la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 produjo una reducción significativa de la expresión de CFTR en el polo apical de los colonocitos en el colon de ratones sanos. Como muestra la Figura 2, el tratamiento de los ratones durante 2s semanas con la cepa de

Bacillus subtilis CU1 produjo un aumento significativo de la expresión de NHE3 en el polo apical de los colonocitos en el colon de ratones sanos.

Por el contrario, como muestran las Figuras 3 y 4, el tratamiento con la cepa de *L. plantarum* no modificó significativamente ni la expresión de CFTR ni la de NHE3.

Ejemplo 2: Utilización de la cepa probiótica CU1 en la prevención y/o el tratamiento de la diarrea

Material y métodos

Modelo de diarrea inducida por LPS.

Una dosis de 10^9 UFC/día/animal de la cepa probiótica a estudiar se administró por vía intragástrica a ratones DBA/2 macho durante 14 días.

Los ratones del grupo control (12 ratones) se trataron a continuación con 200 µl de agua administrada por vía intravenosa y los ratones del grupo de ensayo (12 ratones) recibieron una administración de lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella enterocitos* (Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia) por vía intravenosa) a una dosis de 15 mg/kg, para inducir diarrea. Los ratones se alojaron en jaulas individuales con la parte inferior cubierta por una lámina de aluminio que permitía la recogida de heces cada 30 minutos durante 120 minutos después de la inyección de LPS. La materia fecal recogida se pesó y se calentó a 100 °C durante 24 h y se pesó de nuevo. La diferencia entre la masa húmeda de materia fecal (antes del calentamiento) y la masa seca corresponde a la excreción de agua. La diarrea se evaluó con respecto a la excreción de agua total tras la administración del LPS.

Modelo de diarrea inducida por aceite de ricino.

Una dosis de 10^9 UFC/día/animal de la cepa probiótica a estudiar se administró por vía intragástrica a ratones NMRI macho durante 14 días.

Los ratones del grupo control (12 ratones) se trataron a continuación con 200 µl de agua administrada por vía intragástrica. 200 µl de aceite de ricino (Sigma) se administraron por vía intragástrica a los ratones NMRI macho del grupo "de ensayo" (12 ratones), para inducir diarrea. Los ratones se alojaron en jaulas individuales con la parte inferior cubierta por una lámina de aluminio que permitía la recogida de heces cada 30 minutos durante 180 minutos después de la inyección del aceite de ricino. La materia fecal recogida se pesó y se calentó a 100 °C durante 24 h y se pesó de nuevo. La diferencia entre la masa húmeda de materia fecal (antes del calentamiento) y la masa seca corresponde a la excreción de agua. La diarrea se evaluó con respecto a la excreción de agua total tras la administración del aceite de ricino.

Modelo de diarrea inducida por un antibiótico.

Se implantó un modelo animal de diarrea inducida por antibióticos mediante el uso de un número limitado de antibióticos (según la publicación de Chen et al., 2008, Gastroenterology, 135(6): 1984-92). La administración de antibióticos induce una disbiosis (desequilibrio) en la flora así como una respuesta inmunitaria y una alteración en el número de células productoras de moco por el intestino del ratón. El tratamiento con antibióticos puede inducir especialmente la aparición de *Clostridium difficile.*

El tratamiento preventivo de la cepa CU1 se estudió en este modelo a razón de 10^9 UFC/día/animal durante 14 días y 18 días en grupos de 5 ratones. Tras 7 días de administración de la cepa CU1, se proporcionó una mezcla de 5 antibióticos en agua de bebida durante 3 días, al día siguiente, los ratones tratados con antibióticos recibieron una inyección intraperitoneal de clindamicina. El efecto de los tratamientos se observó en los días 14 y 18 desde el inicio del experimento. Los ratones tratados con la cepa CU1 recibieron la cepa durante la totalidad del ensayo.

Resultados

La cepa de *Bacillus subtilis* CU1 se ha estudiado en diferentes modelos de diarrea en ratones.

Propiedades antidiarreicas de la cepa de Bacillus subtilis CU1.

Como muestran las Figuras 4 y 5, la cepa CU1 previene significativamente la diarrea inducida por LPS (Figura 5) y por aceite de ricino (Figura 6).

Efectivamente, la administración de células CU1 disminuye significativamente el agua excretada en las heces durante la primera hora después de la administración de LPS (en 4 ensayos, la disminución era del 35 %, 38 %, 36 % y 40 %).

La administración de células CU1 disminuye significativamente el agua excretada en las heces durante la 2ª hora en

el modelo de diarrea inducida por aceite de ricino (en 3 ensayos, la disminución era del 63 %, 46 %, 44 %).

La cepa CU1 tiene también un efecto preventivo sobre la diarrea inducida por la administración de un antibiótico. Este efecto se observó después del tratamiento preventivo con células CU1: los ratones presentaron entonces una normalización de la microbiota y una mejora de las alteraciones ocasionadas por los antibióticos en las células de la mucosa intestinal productora de moco y sobre los macrófagos.

Comparación con el efecto de la loperamida.

Un tratamiento preventivo con la cepa CU1 durante 15 días redujo la diarrea inducida por el LPS o el aceite de ricino con la misma eficacia que la loperamida, molécula antidiarreica de referencia, administrada en dosis única (1 mg/kg) por vía oral una hora antes de desencadenarse la diarrea. La loperamida redujo en un 50 % la excreción fecal de agua tras LPS (40 % para CU1) y un 60 % tras el aceite de ricino (60 % para CU1).

Conclusiones

In vivo, la cepa *Bacillus subtilis* CU1 permite mejorar las capacidades de absorción del colon en condiciones de exceso de líquido.

Estudios complementarios han mostrado que la cepa *Bacillus subtilis* CU1:

- no tiene efectos sobre las capacidades de secreción/absorción del intestino delgado en el modelo de aceite de ricino y el modelo LPS,
- elimina el aumento de la permeabilidad paracelular inducida por el LPS en la pared del colon, pero no la inducida por el aceite de ricino,
- reduce la corriente de cortocircuito inducida por el aceite de ricino en la pared del colon, lo que sugiere un refuerzo de las capacidades del colon para absorber agua en situaciones de diarrea laxativa inducida por aceite de ricino (y no en situación basal).

La cepa *Bacillus subtilis* CU1 y las células obtenidas por cultivo de esta cepa son por tanto útiles para el tratamiento y/o la prevención de cualquier tipo de diarrea.

Resumen de la invención

Cepas probióticas para el tratamiento y/o la prevención de la diarrea

La presente invención se refiere a un procedimiento de selección o de identificación de cepas probióticas capaces de actuar sobre la absorción de agua en el colon, y su uso como medicamentos en el tratamiento y/o prevención de la diarrea. La invención se refiere especialmente a la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 para su uso en el tratamiento y/o prevención de la diarrea. (sin figura)

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de selección de una cepa probiótica para el tratamiento y/o prevención de la diarrea, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

- medida del efecto de al menos una cepa a estudiar respecto de la expresión de la proteína CFTR en una muestra biológica, y
- selección de al menos una cepa que induce una disminución de la expresión de la proteína CFTR,

donde la muestra biológica es una muestra de intestino proximal o de los colonocitos.

2. Procedimiento de selección de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento además las etapas de:

- medida del efecto de al menos una cepa a estudiar respecto de la expresión de la proteína NHE3 en una muestra biológica, y
- selección de al menos una cepa que induce un aumento en la expresión de la proteína NHE3,

donde la muestra biológica es una muestra de intestino proximal o de los colonocitos.

3. Procedimiento de selección de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, **caracterizado por que** la cepa a estudiar es una cepa de levadura o una cepa de bacteria.

4. Procedimiento de selección de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la cepa de bacteria es una cepa de *Bacillus,* preferentemente una cepa de *Bacillus subtilis.*

5. Procedimiento de selección de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado por que** la expresión de la proteína CFTR y/o de la proteína NHE3 se mide por electroforesis, transferencia Western, inmunoensayo, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, espectrometría de masas, RT-PCR o transferencia Northern.

6. Cepa probiótica, o composición que comprende dicha cepa probiótica para su uso en el tratamiento y/o prevención de la diarrea, **caracterizada(s)** por que la cepa probiótica es la cepa de *Bacillus subtilis* CU1 depositada en la CNCM el 25 de octubre de 2001 con el número I-2745.

7. Cepa probiótica, o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada(s)** por que la diarrea es una diarrea aguda o una diarrea crónica.

8. Cepa probiótica, o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, **caracterizada(s)** por que la diarrea es una diarrea de origen infeccioso o una diarrea de origen no infeccioso.

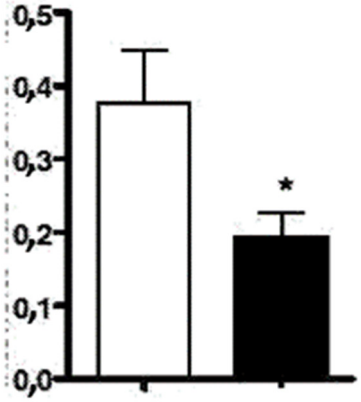

Figura 1

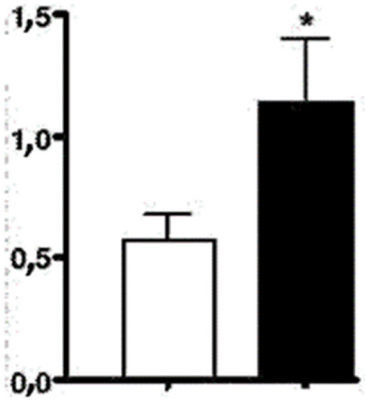

Figura 2

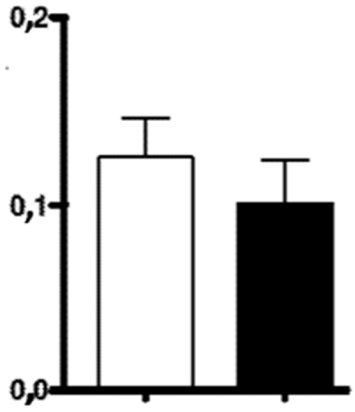

Figura 3

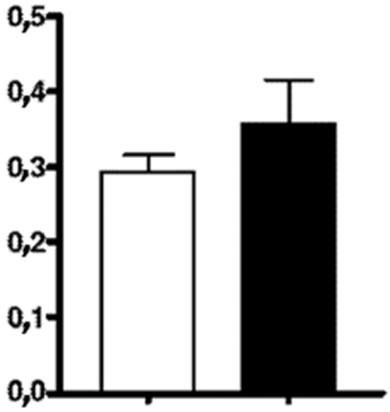

Figura 4

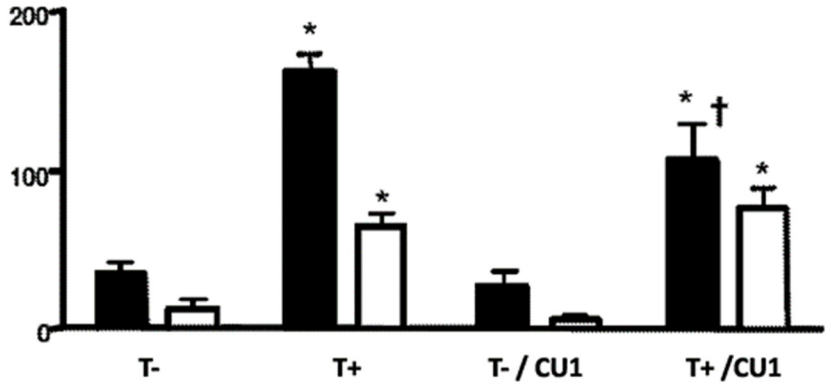

Figura 5

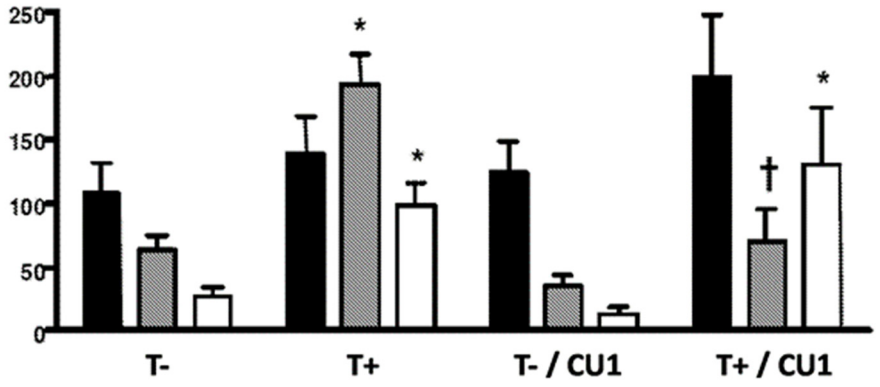

Figura 6