

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 400**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2014 PCT/EP2014/052129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014 WO14122119**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2014 E 14702838 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2019 EP 2953484**

54 Título: **Uso de microorganismos para la prevención y el tratamiento de enfermedades intestinales**

30 Prioridad:

05.02.2013 EP 13153996

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

04.06.2019

73 Titular/es:

**LUDWIG STOCKER HOPPFISTEREI GMBH
(100.0%)
Kreittmayrstrasse 5
80335 München, DE**

72 Inventor/es:

**MAYER, JÜRGEN;
HALLER, DIRK;
ZHENCHUK, ANNA;
HOFMANN, THOMAS;
DUNKEL, ANDREAS;
SCHEMANN, MICHAEL y
KRÜGER, DAGMAR**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 715 400 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

Uso de microorganismos para la prevención y el tratamiento de enfermedades intestinales

5 La invención se refiere a microorganismos productores de acetilcolina seleccionados entre una cepa de *Lactobacillus sanfranciscensis* o una cepa de *Lactobacillus rossiae* para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades intestinales, y/o para la reducción de los riesgos de enfermedades intestinales, y para su uso no médico para la mejora de la salud intestinal, así como para promover una flora intestinal sana. Los microorganismos productores de acetilcolina pueden ser proporcionados en forma de una forma de dosificación farmacéutica o como un aditivo de un alimento funcional o de productos alimenticios complementarios.

15 Un gran número de pacientes padece trastornos gastrointestinales asociados con el intestino delgado inferior y/o con el intestino grueso. Estos trastornos incluyen síndrome de intestino irritable (SII) o colon espástico, colitis alterativa idiopática, colitis mucosa, colitis colagenosa, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino en general, colitis microscópica, colitis asociada a antibióticos, estreñimiento idiopático o simple, enfermedad diverticular y enteropatía por SIDA.

20 El síndrome de intestino irritable es el más común de todos los trastornos gastrointestinales, afectando al 11-14 % de los adultos y suponiendo más del 50 % de todos los pacientes con problemas digestivos (G. Triadafilopoulos *et al.*, *Bowel Dysfunction in fibromialgia, Digestive Dis.*, Sci. 36 (1): 59-64 [1991]; W. G. Thompson, *Irritable Bowel Syndrome: Pathogenesis and Management Lancet*, 341: 1569-1572 [1993]). Se cree que únicamente una minoría de las personas con SII busca realmente tratamiento médico. Los pacientes con SII se presentan con unos síntomas desiguales, por ejemplo, dolor abdominal, relacionado predominantemente con la defecación, diarrea y estreñimiento alternantes, distensión abdominal, gas y excesivo moco en las heces. Existen tres grupos de SII: SII con predominio de estreñimiento (C-SII), SII alternante (A-SII) y SII con predominio de diarrea (D-SII). El SII se ha reconocido como una afección crónica, que puede tener un profundo efecto sobre la calidad de vida del paciente.

30 Se han propuesto varias causas posibles para el SII, tales una dieta occidental baja en fibra, un mal funcionamiento de la motilidad intestinal, una percepción del dolor abdominal, una psicología o un comportamiento anormal o una respuesta psicofisiológica al estrés. Sin embargo, ninguna de estas causas ha sido completamente aceptada (W. G. Thompson [1993] *supra*).

35 Los pacientes que padecen SII parecen percibir la actividad intestinal normal como dolorosa. Por ejemplo, los pacientes con SII experimentan dolor con unos volúmenes menores de distensión rectal de lo normal o tienen un umbral menor de lo normal para percibir la actividad de fase III del complejo motor migratorio (W. E. Whitehead *et al.*, *Tolerance for Rectosigmoid Distention in Irritable Bowel Syndrome, Gastroenterol.* 98: 1187-92 [1990]; J. E. Kellow *et al.*, *Enhanced Perception of Physiological Intestinal Motility in the Irritable Bowel Syndrome, Gastroenterol.* 101 (6): 1621-24 [1991]).

40 La motilidad intestinal en los pacientes con SII difiere de una respuesta controlada normal frente a diversos estímulos, tales como fármacos, hormonas, alimentos y estrés emocional (D. G. Wangel y D. J. Deller, *Intestinal Motility in Man, III: Mechanisms of Constipation and Diarrhea with Particular Reference to the Irritable Bowel, Gastroenterol.* 48: 69-84 [1965]; R. F. Harvey y A. E. Read, *Effect of Cholecystokinin and Colon Motility and on Symptoms of Patients with Irritable Bowel Syndrome Lancet* i: 1-3 [1973]; R. M. Valori *et al.*, *Effects on Different Types of Stress and "Prokinetic drugs" on the Control of the Fasting Motor Complex in Humans, Gastroenterol.* 90: 1890-900 [1986]).

50 Evans *et al.* y Govath y Farthing reconocieron que el síndrome de intestino irritable está asociado frecuentemente con un trastorno en la motilidad gastrointestinal (P. R. Evans *et al.*, *Gastroparesis and Small Bowel Dysmotility in Irritable Bowel Syndrome, Dig. Dis. Sci.* 42 (10): 2087-93 [1997]; D. A. Gorard y M. J. Farthing, *Intestinal Motor Function in Irritable Bowel Syndrome, Dig. Dis. Sci.* 12 (2): 72-84 [1994]). El tratamiento dirigido a la motilidad alterada del intestino en el SII incluye el uso de antagonistas de la serotonina (D. P. Becker *et al.*, *Mesoazaclic Aromatic Acid Amides And Esters as Serotonergic Agents, Patente de Estados Unidos* n° 5.612.366; M. Ohta *et al.*, *Methods for Treatment of Intestinal Diseases, Patente de Estados Unidos* n° 5.547.961) y antagonistas de la coleocitocinina (Y. Sato *et al.*, *Benzodiazepine derivatives, Patente de Estados Unidos* n° 4.970.207; H. Kitajima *et al.*, *Tienilazol Compound and Tienotriazolodiazepine Compound, Patente de Estados Unidos* n° 5.760.032). Sin embargo, no se ha demostrado que el índice de motilidad colónica, la actividad mioeléctrica alterada en el colon y la alteración de la motilidad del intestino delgado sean unas herramientas diagnósticas fiables debido a que no son específicos del SII (W. G. Thomson [1993], *supra*).

60 Se ha intentado la administración de probióticos para el tratamiento del SII. Por ejemplo, Allan *et al.* describieron el uso de una cepa de *Enterococcus faecium* para el alivio de los síntomas (W. D. Allan *et al.*, *Probiotic Containing Enterococcus faecium strain NCIMB 40371, Patente de Estados Unidos* n° 5.728.380 y *Probiotic, Patente de Estados Unidos* n° 5.589.168). Borody enseñó un método para el tratamiento del intestino irritable mediante la eliminación al menos parcial de la microflora intestinal mediante un lavado y la sustitución por una nueva comunidad bacteriana introducida a través de un inóculo fecal procedente de un donante humano cribado para la enfermedad o mediante una composición que comprende especies de *Bacterioides* y *Escherichia coli*. (T. J. Borody, *Treatment of Gastro-*

Intestinal Disorders with a Fecal Composition of Bacterioids and *E. coli*, Patente de Estados Unidos nº 5.443.826).

Muchos científicos opinan que la salud y el bienestar de las personas puede verse afectado positiva o negativamente por los microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal, y en particular, en el intestino grueso. Estos microorganismos, a través de la producción de toxinas, de subproductos metabólicos y de ácidos grasos de cadena corta, y similares, afectan al estado fisiológico del hospedador.

La constitución y la cantidad de la microflora intestinal pueden verse afectadas por afecciones o el estrés inducido por una enfermedad, el estilo de vida, un viaje y otros factores. Si pueden incentivarse los microorganismos que efectúan positivamente una salud y un bienestar del individuo para que pueblen el intestino grueso, esto debería mejorar el bienestar fisiológico del hospedador.

Ducrotté et al., 2012, World Journal of Gastroenterology, 18 (30): 4012-4018 desvelan un alivio eficaz del síntoma, particularmente del dolor abdominal y de las flatulencias, en los pacientes con SII que cumplen los criterios de Roma III, tras la administración de *L. plantarum* 299v.

Shen et al., 2009, Internal Medicine Journal, Feb. de 2009, 39: 103-109 desvelan la administración de la cepa *L. ramosus* GG como una terapia de mantenimiento con objeto de aumentar el índice de recaídas de la enfermedad de Crohn, mientras que *L. johnsonii* no era eficaz para reducir la incidencia de recaídas.

Lyte et al., 2011, Bioessays, 33: 574-581 es un artículo de revisión que aborda la producción de sustancias neuroquímicas por parte de los probióticos y su uso clínico como vehículos de administración de compuestos neuroactivos en uso clínico.

Stanaszek et al., 1977, Applied and Environmental Microbiology, 34 (2): 237- 239, desvelan el aislamiento, la extracción y la determinación espectrofotométrica de la acetilcolina a partir de *Lactobacillus plantarum* ATCC10241.

Price et al., 1969, American Journal of Physiology, 216 (2): 343-347, desvelan un aumento en la motilidad intestinal y un aumento en el caudal sanguíneo de la arteria mesentérica superior en respuesta a la infusión de acetilcolina en perros.

Stephenson et al., 1947, Microbiology, 1 (3): 279-298), desvelan el aislamiento de una cepa de *Lactobacillus plantarum* a partir de Sauerkraut que puede producir acetilcolina durante su cultivo y en suspensiones lavadas.

Murakami et al., 2012, Biopsychosocial Medicine, 6: 16, desvelan la utilidad de *Lactobacillus brevis* KB290 para una intervención temprana en el SII.

El documento WO 2014/072408 desvela nuevas cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de masa fermentada. También se divulga una composición que comprende al menos una de dichas cepas de *Lactobacillus* opcionalmente con otros microorganismos adicionales tales como bacterias y/o levaduras. Además, el documento WO 2014/072408 desvela el uso de dichas cepas de *Lactobacillus* o de composiciones para la elaboración de productos alimenticios humanos y de productos alimenticios complementarios para productos de comida para animales. Además, el documento WO 2014/072408 desvela el uso de las cepas de *Lactobacillus* o de las composiciones de las cepas de *Lactobacillus* en la medicina humana o veterinaria o en productos cosméticos.

La introducción de microorganismos o de probióticos beneficiosos puede llevarse a cabo mediante la ingestión de los organismos en bebidas, yogures, cápsulas y otras formas que permitan que los organismos viables lleguen al intestino grueso.

Sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado ni desarrollado ningún método fiable para estimular el sistema nervioso entérico (ENS) que regula los movimientos intestinales y las funciones secretoras de la capa epitelial de una forma suficiente.

El problema de la presente invención era por lo tanto proporcionar un método para intervenir en la regulación de los movimientos intestinales y de las funciones secretoras de la capa epitelial de una forma suficiente para influir así en el curso de las enfermedades intestinales.

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo intensos estudios, y como resultado han averiguado que la función intestinal puede ser modulada por microorganismos productores de acetilcolina. Por lo tanto, se proporciona un método para la estimulación doble dirigida de la motilidad y de la secreción mediante acetilcolina en el intestino a través de la selección y la administración específica de un microorganismo productor de acetilcolina, particularmente de bacterias de ácido láctico. Este método de tratamiento es una alternativa prometedoras o se añade a las terapias conocidas para el SII crónico y otros trastornos asociados con un deterioro en la motilidad y la secreción intestinales.

Un primer aspecto de la presente invención es por lo tanto un microorganismo productor de acetilcolina seleccionado entre una cepa de *Lactobacillus sanfranciscensis* o una cepa de *Lactobacillus rossiae* para el uso en la prevención y/o

en el tratamiento de enfermedades intestinales y/o en la reducción del riesgo de desarrollar enfermedades intestinales.

Un aspecto adicional de la presente invención es el uso no médico de un microorganismo productor de acetilcolina seleccionado entre una cepa de *Lactobacillus sanfranciscensis* o una cepa de *Lactobacillus rossiae* para el mantenimiento y/o la mejora de la salud intestinal, particularmente para la mejora de la salud intestinal.

El microorganismo productor de acetilcolina es un organismo vivo, y preferentemente es capaz de propagarse en el área intestinal.

El término “área intestinal” según se usa en el presente documento pretende incluir el intestino delgado y el intestino grueso. El intestino grueso pretende incluir el colon y el recto, y en los seres humanos, pretende incluir el colon, el recto y el ciego.

El término “reducción del riesgo de desarrollar enfermedades intestinales” según se usa en el presente documento significa que un individuo que está siendo tratado con el microorganismo productor de acetilcolina de la presente invención muestra un menor riesgo de desarrollar una enfermedad intestinal causada por estímulos externos o por procesos fisiológicos en comparación con un individuo no tratado.

El término “mantenimiento y/o mejora de la salud intestinal” según se usa en el presente documento significa que un individuo, tras el tratamiento con el microorganismo productor de acetilcolina, muestra una flora intestinal diferente, que es beneficiosa para la salud humana o animal y razonable para un mantenimiento y/o una mejora de la digestión en dicho individuo. La flora intestinal mejorada puede dar lugar adicionalmente a un aumento en la resistencia del sujeto a desarrollar una enfermedad intestinal mediante una competición con las bacterias perjudiciales y el estímulo del movimiento normal del intestino.

El término “microorganismo” según se usa en el presente documento comprende cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* o cepas de *Lactobacillus rossiae*.

Las enfermedades intestinales engloban enfermedades inflamatorias del intestino (EII), tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, enfermedad de Behçet, colitis indeterminada, colitis por derivación, reservoritis o colitis microscópica y/o cáncer de colon y/o enfermedades asociadas con microorganismos, tales como candidiasis, sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, infecciones agudas o crónicas del intestino y/o enfermedades inducidas por bacterias reductoras de sulfato y/o diverticular intestinal y/o carcinoma intestinal y/o trastornos funcionales del intestino (FBD) tales como un síndrome de intestino irritable y/o trastornos asociados con las secreciones de la pared intestinal controladas por el sistema enteronervioso.

El término “trastorno funcional del intestino” (FBD) se refiere a trastornos gastrointestinales que son crónicos o semicrónicos y que están asociados con dolor intestinal, una alteración en la función intestinal y una desestabilización social. Algunas combinaciones y prevalencias de los síntomas en particular se caracterizan en los siete siguientes subgrupos de FBD, que se definen según el sistema de clasificación conocido como los “criterios de Roma”: 1) C1: intestino irritable con predominio de estreñimiento; 2) C1: intestino irritable con predominio de diarrea; 3) C3: estreñimiento funcional; 4) C4: diarrea funcional; 5) C2: flatulencias abdominales funcionales; 6) F3a: disinerxia del suelo pélvico; 7) F3b: disfunción del esfínter anal interno.

Más específicamente, la enfermedad intestinal puede ser un trastorno intestinal funcional y/o un trastorno asociado con las secreciones de la pared intestinal controladas por el sistema nervioso entérico, en particular un estreñimiento funcional, una diarrea funcional y/o un síndrome de intestino irritable (SII), tales como en particular un SII con predominio de estreñimiento, un SII alternante o un SII con predominio de diarrea.

El microorganismo productor de acetilcolina es preferentemente útil para mantener y/o promover una flora intestinal sana y/o para reducir los efectos tóxicos del proceso digestivo y/o para estimular el sistema digestivo y/o para mejorar el control intestinal. La promoción de una flora intestinal sana da lugar a una competición con las bacterias perjudiciales en los intestinos, en particular en el intestino grueso y más particularmente en el colon, y reduciendo así el efecto tóxico del proceso digestivo, estimulando el sistema digestivo y mejorando el control del intestino.

El microorganismo productor de acetilcolina es preferentemente útil para modular el curso de las enfermedades inflamatorias del intestino (EII) de una forma beneficiosa y para aliviar los síntomas de los pacientes con EII mediante la inhibición de la secreción de la quimiocina proinflamatoria IP-10.

En otra realización, la enfermedad intestinal puede ser una enfermedad inflamatoria del intestino. Las enfermedades son preferentemente colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, enfermedad de Behçet, colitis indeterminada, colitis por derivación y/o colitis microscópica. Las enfermedades son más preferentemente colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn.

El microorganismo para su uso según la presente invención es capaz de producir acetilcolina. Preferiblemente, el

- 5 microorganismo productor de acetilcolina produce > 20, 25, 30, 35 o 40 mg/kg de acetilcolina en unas condiciones de cultivo adecuadas según se describe, más preferentemente > 40 mg/kg e incluso más preferentemente > 35 mg/kg. Podría usarse cualquier medio de cultivo para el cultivo de los microorganismos productores de acetilcolina, que sean adecuados para el cultivo de lactobacilos. Preferiblemente, se usa caldo MRS como medio de cultivo. Preferiblemente, la concentración de acetilcolina se ajusta a un recuento de bacterias de 10^6 /ml.
- 10 El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según la presente invención es una cepa de *Lactobacillus sanfranciscensis* o una cepa de *Lactobacillus rossiae* que generalmente están disponibles en el catálogo público del Deutsche Sammlung von Mikroorganismoen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania).
- 15 En una realización más preferida, la cepa de *Lactobacillus* se selecciona entre una cualquiera de las cepas DSM 26024, DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 23174 y DSM 23121 o una cepa cultivada a partir de las mismas, más particularmente la cepa DSM 23090 o la DSM 23093 o una cepa cultivada a partir de las mismas. Estas cepas han sido depositadas en el Leibnitz-Institut DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismoen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Alemania), según el Tratado de Budapest. Las nuevas cepas de *Lactobacillus* tienen los siguientes números de registro y fechas de depósito: DSM 23090 (2012-06-21), DSM 23091 (2012-06-21), DSM 23200 (2012-08-21), DSM 23092 (2012-06-21), DSM 23093 (2012-06-21), DSM 23201 (2012-06-21), DSM 26024 (2012-06-04), DSM 23174 (2012-06-21), DSM 23121 (2012-06-21).
- 20 El término “cepa cultivada a partir de las mismas”, según se usa en el presente documento, se refiere a la descendencia de las cepas derivadas mediante el cultivo de la cepa original.
- 25 El microorganismo productor de acetilcolina es preferentemente un microorganismo secretor de acetilcolina. El término “microorganismo secretor de acetilcolina” según se usa en el presente documento significa que el microorganismo secreta acetilcolina en el medio de cultivo.
- 30 La presente invención se refiere al uso médico de un microorganismo productor de acetilcolina. Preferiblemente, el microorganismo se proporciona en forma de una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable o en forma de un nutriente, por ejemplo, un alimento o una bebida.
- 35 En una realización, el microorganismo productor de acetilcolina se proporciona en una composición farmacéutica. Los microorganismos productores de acetilcolina también pueden proporcionarse en forma de un aditivo en un alimento funcional o en una bebida funcional. La composición farmacéutica, el alimento o las bebidas que incorporan el microorganismo pueden ser consumidos sin peligro y están recomendados especialmente para los sujetos con un riesgo percibido o que padecen una disfunción gastrointestinal o trastornos o enfermedades orgánicas, por ejemplo, unas afecciones o unos síntomas relacionados con el SII o con una EII. Contienen el microorganismo productor de acetilcolina preferentemente en una cantidad eficaz para el tratamiento o la prevención de dichos trastornos o enfermedades.
- 40 Según se usa en el presente documento, el término “una cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz para conseguir un efecto terapéutico deseado, tal como el tratamiento y/o la prevención de enfermedades, de afecciones y de síntomas relacionados con el SII o con una EII.
- 45 La cantidad eficaz de los microorganismos productores de acetilcolina comprende preferentemente una dosis en el intervalo de entre 10^6 y 10^{12} ufc/forma de dosificación (unidades formadoras de colonias/forma de dosificación), más preferentemente en el intervalo de entre 10^7 y $0,5 \times 10^{12}$ ufc/forma de dosificación, incluso más preferentemente en el intervalo de entre 10^9 y 10^{11} ufc/forma de dosificación. La forma de dosificación puede ser administrada una o varias veces, por ejemplo, 2, 3 o más veces al día.
- 50 La composición farmacéutica puede estar en forma líquida o sólida. La composición contiene al menos uno de los microorganismos productores de acetilcolina o una mezcla de los mismos, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 La cantidad de, por ejemplo, microorganismos, incorporada en una composición farmacéutica puede variar entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 100 % en peso, preferentemente entre aproximadamente el 2 y aproximadamente el 20 % en peso, incluso más preferentemente entre aproximadamente el 4 y aproximadamente el 10 % en peso, basado en el peso total de la composición.
- 60 La composición farmacéutica puede elaborarse en las formas farmacéuticas habituales conocidas en la bibliografía, tales como, por ejemplo, comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas, bolsitas, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, pellas, jarabes, supositorios vaginales, ungüentos, cremas, y así sucesivamente. Preferiblemente, la composición comprende un recubrimiento entérico. Pueden ser preparados de la forma habitual mediante la mezcla del principio activo con excipientes y/o portadores, opcionalmente añadiendo adyuvantes y/o agentes dispersantes. Si se utilizara agua como diluyente, también pueden usarse otros disolventes orgánicos en forma de adyuvantes. Los adyuvantes pueden ser, por ejemplo, agua, disolventes orgánicos no tóxicos tales como parafinas, aceites vegetales (aceite de cacahuete o aceite de sésamo), alcoholes (por ejemplo, etanol, glicerol),
- 65

glicoles (propilenglicol, polietilenglicol). Los portadores sólidos pueden ser, por ejemplo, harinas minerales naturales (caolín, talco), harinas minerales sintéticas (por ejemplo, silicatos), azúcar (por ejemplo, azúcar de caña). Los emulsionantes pueden ser sulfonatos de alquilo o sulfonatos de arilo y similares, dispersantes, por ejemplo, lignina, metil celulosa, almidón y polivinil pirrolidina, y lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, talco, ácido esteárico, lauril sulfonato de sodio.

La composición puede contener los microorganismos productores de acetilcolina liofilizados, pulverizados y pulverulentos, opcionalmente para su reconstitución en un portador líquido farmacéuticamente aceptable administrado en el área intestinal, por ejemplo, oral, rectal o naso-duodenal. La administración tiene lugar de la forma habitual, preferentemente por la vía oral/rectal. Después puede ser infundida, disuelta, tal como en una solución salina, en forma de un enema. Como un polvo, preferentemente puede ser proporcionado en una forma agradable para su reconstitución para ser bebida. El polvo también puede ser reconstituido para ser infundido a través de una infusión naso-duodenal.

Las formas farmacéuticas adaptadas para este fin pueden contener, además de los excipientes habituales tales como lactulosa, dextrosa, lactosa, otros aditivos tales como citrato de sodio, carbonato de calcio, dihidrogenofosfato de calcio, junto con otras diversas sustancias adicionales tales como almidón, gelatina y similares. En el caso de las formas líquidas, pueden añadirse agentes colorantes compatibles o sustancias saborizantes.

Algunos componentes adicionales de la composición que contiene el microorganismo productor de acetilcolina pueden incluir un agente activo, por ejemplo, glutamina/glutamato o precursores de los mismos, mananos, oligómeros del ácido galacturónico, extractos de plantas medicinales tales como Regulat® (marca comercial registrada de Dr Niedermayer Pharma) e Iberogast® (marca comercial registrada de Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH), levadura de cerveza de aronia, un fármaco útil para el tratamiento de la colitis ulcerosa, tal como sulfasalazina, agentes 5-ASA, corticosteroides, tales como un esteroide adrenal, prednisona, hidrocortisona o budesonida, o fármacos usados contra el dolor, la diarrea o una infección o el SII tales como un agonista del receptor de la serotonina 4, por ejemplo, tegaserod. La composición puede estar combinada con otros adyuvantes tales como antiácidos para disminuir la inactivación bacteriana en el estómago. La secreción ácida del estómago también podría ser suprimida farmacológicamente usando antagonistas H2 u omeprazol.

La composición puede ser proporcionada en forma de un kit para una administración individual secuencial o simultánea junto con dichos agentes activos, según se describe más arriba en el presente documento. Estos agentes activos pueden estar convenientemente formulados junto con la composición de la invención en las formas de dosificación farmacéuticas convencionales, por ejemplo, junto con al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización preferida, una composición que contiene el microorganismo productor de acetilcolina puede contener al menos un microorganismo adicional, es decir, un microorganismo no productor de acetilcolina tal como una bacteria, para el mantenimiento y/o la restauración de una flora intestinal favorable. Las bacterias adicionales son preferentemente bacterias probióticas.

En otra realización de la invención, los microorganismos productores de acetilcolina pueden proporcionarse preferentemente en forma de un probiótico, preferentemente en forma de un aditivo de un alimento funcional o de bebidas funcionales.

La cantidad de los microorganismos en forma de un aditivo nutriente puede variar entre aproximadamente el 0,0001 y aproximadamente el 20 % en peso, preferentemente entre aproximadamente el 0,01 y aproximadamente el 10 % en peso, e incluso más preferentemente entre aproximadamente el 0,1 y aproximadamente el 5 % en peso.

En otra realización preferida, los microorganismos productores de acetilcolina pueden ser aplicados a un material comestible, preferentemente un alimento o un producto alimenticio tal como cereales, en particular copos o pan de avena, una bebida o productos lácteos, en particular yogur, salsa sauerkraut, extractos vegetales tales como Regulat®, bebidas fermentadas o Brottrunk®. La aplicación del material comestible puede conseguirse mediante el recubrimiento de dicho material con los microorganismos productores de acetilcolina, preferentemente mediante la pulverización de los microorganismos sobre el material comestible. Los microorganismos productores de acetilcolina también pueden ser aplicados mediante su inyección en un material comestible, tal como pan, yogur o queso, preferentemente masa de pan fermentada.

El término "alimento funcional" según se usa en el presente documento es un alimento que, además de sus funciones nutricionales y sensoriales, tiene un efecto positivo sobre el metabolismo y, en una nutrición equilibrada, contribuye a una mejora de la salud, a un aumento del bienestar y/o a una reducción en los riesgos de la salud. El alimento funcional puede ser un alimento natural o un alimento que ha sido alterado mediante la adición o la eliminación de un componente.

En una realización preferida, el alimento funcional es un producto fermentado, más preferentemente, el alimento funcional es masa fermentada o masa de pan fermentada.

La masa de pan fermentada tiene la ventaja de que puede no contener únicamente las cepas productoras de acetilcolina, sino además también un elevado contenido en otros compuestos acetilados tales como N-acetil-glicina, homoserina, canavanina, y similares.

5 El término “bebida funcional” según se usa en el presente documento, es una bebida, que además de su función nutricional y sensorial, tiene un efecto positivo sobre el metabolismo y, en una nutrición equilibrada, contribuye a una mejora de la salud, a un aumento del bienestar y/o a una reducción en los riesgos de la salud. Ejerce su efecto en los hábitos alimentarios normales en una cantidad habitual para el consumo.

10 La bebida funcional puede comprender componentes adicionales tales como plantas medicinales, vitaminas, minerales, aminoácidos u otros ingredientes alimentarios o vegetales para proporcionar unos beneficios específicos para la salud que van más allá de la nutrición general. Alternativamente, puede incluir estimulantes tales como taurina, glucoronolactona, cafeína, vitaminas B, guaraña, ginseng, ginkgo biloba, L-carnitina, azúcares, antioxidantes, yerba mate, creatina, cardo mariano y similares. En una realización preferida, contiene adicionalmente un prebiótico adecuado para ser digerido por los microorganismos productores de acetilcolina de la presente invención.

15 Una bebida funcional preferida es un yogur para beber, una bebida de grano fermentada, una cerveza sin alcohol, Brottrunk®, debidas a base de zumo de frutas o bebidas que contienen extractos vegetales o de plantas medicinales tales como Iberogast®.

20 El alimento funcional o la bebida funcional también pueden ser administrados preferentemente con al menos un agente activo adicional para el tratamiento de enfermedades intestinales. El agente activo adicional puede seleccionarse entre el grupo de medicamentos como se ha descrito anteriormente.

25 En otra realización, el agente activo puede ser preferentemente al menos una bacteria adicional para el mantenimiento y/o la restauración de una flora intestinal favorable. Las bacterias adicionales pueden seleccionarse entre el grupo de bacterias probióticas.

30 Algunas bacterias probióticas preferidas pueden seleccionarse entre el grupo que comprende cepas de *Lactobacillus* y de *Bifidobacterium* tales como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* y/o *Bifidobacterium lactis*.

35 Opcionalmente, la composición también puede contener un prebiótico. Según se usa en el presente documento, una “composición prebiótica” es al menos un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador mediante la estimulación selectiva del crecimiento, de la actividad o de ambos, de una de un número limitado de especies de microorganismos ya residente en el colon. El prebiótico es preferentemente un oligosacárido no digerible tal como fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, lactolosa, xilo-oligosacáridos, isomalto-oligosacáridos, oligosacáridos de semilla de soja, gentio-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos, fructanos, lactosacacrosa, fructo-oligosacáridos de cadena corta y mezclas de los mismos.

40 También se describe un método para la producción de acetilcolina mediante el uso de lactobacilos. Preferiblemente, se usa una única cepa de *Lactobacillus* o una combinación de cepas de *Lactobacillus* o una composición de cepas de *Lactobacillus*. Las cepas de *Lactobacillus* usadas para ello son, en particular, cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis*, cepas de *Lactobacillus rossiae*, cepas de *Lactobacillus brevis* o cepas de *Lactobacillus plantarum*, más particularmente las cepas DSM 26024, DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 23174 y DSM 23121 o una cepa cultivada a partir de las mismas, incluso más particularmente las cepas DSM 23090 o DSM 23093.

50 También se describe la acetilcolina producida por microbios para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades intestinales como se ha descrito anteriormente. La acetilcolina puede ser producida preferentemente por los microorganismos de la invención. Los microorganismos son preferentemente *Lactobacillaceae* tales como cepas de *Lactobacillus*, en particular, cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis*, cepas de *Lactobacillus rossiae*, cepas de *Lactobacillus brevis* o cepas de *Lactobacillus plantarum*. Las enfermedades intestinales engloban las enfermedades intestinales descritas anteriormente tales como enfermedades inflamatorias del intestino o trastornos funcionales del intestino. Preferiblemente, la enfermedad es el síndrome de intestino irritable y/o los trastornos asociados con las secreciones de la pared intestinal controlados por el sistema enteronervioso. La acetilcolina producida por microbios puede ser administrada por vía oral, por ejemplo, añadida a productos alimenticios y/o alimentarios. La adición puede producirse durante la elaboración del alimento y/o del producto alimentario mediante el uso de los microorganismos de la invención también para la fermentación de producto alimenticio y/o alimentario. Dicho producto alimenticio fermentado podría ser una masa de pan fermentada, en la que los microorganismos vivos son destruidos durante la fase de horneado por el calor, dando como resultado una masa de pan fermentada que contiene la acetilcolina producida por los microorganismos. El contenido en la acetilcolina producida por microbios está en un intervalo de entre aproximadamente 5 y 1.000 mg de acetilcolina/kg de producto alimenticio o alimentario, preferentemente en un intervalo de entre aproximadamente 20 y 500 mg de acetilcolina/kg de producto alimenticio o de producto alimentario, más preferentemente en un intervalo de entre aproximadamente 40-200 mg de acetilcolina/kg de producto alimenticio o de producto alimentario. Preferiblemente, la cantidad de acetilcolina iguala la dosis diaria recomendada.

Breve descripción de los dibujos

- 5 **Figura 1:** perfil de metabolitos en los extractos acuosos de masa fermentada, de pan de masa fermentada y de un análogo de pan. A: mapa térmico de las concentraciones absolutas de metabolitos en el extracto acuoso de masa fermentada (SD), de pan de masa fermentada (BR) y de un análogo de pan (AN) por triplicado. Los extractos acuosos constituyen el 5-10 % de la masa total o de la masa de pan seca. B: el análisis de los componentes principales (PCA) de los metabolitos revela unas diferencias significativas en las concentraciones de los metabolitos entre la masa fermentada (SD), la pan de masa fermentada (BR) y el análogo de pan (AN).
- 10 **Figura 2:** los extractos de masa fermentada estimulan eficazmente la motilidad del músculo estomacal actuando directamente sobre el receptor muscarínico de la acetilcolina (mAChR). A: cambio en el tono muscular inducido bien por la acetilcolina (ACH) (2,5 µM) o bien por los extractos de masa fermentada (SD), de pan de masa fermentada (BR) o de análogo de pan (AN BR) al 0,02 %. El aumento en el tono fue observado inmediatamente después de la adición de los estimulantes (signo de flecha) excepto para el extracto del análogo de pan. B: cambio mediano (n > 4) en el tono muscular tras los tratamientos diferenciales. El efecto procinético de la acetilcolina (ACH) y de los extractos de masa fermentada (SD), de pan de masa fermentada (BR) o de análogo de pan (AN BR) es anulado completamente por la atropina antagonista específica del mAChR. Esto indica que la acetilcolina de los extractos actúa directamente sobre el mAChR.
- 15 **Figura 3:** la tetrodotoxina (TTX) no tiene ningún efecto significativo sobre la estimulación de la contracción muscular por parte de la acetilcolina (ACH) derivada de la masa fermentada (SD). La figura muestra el cambio en el tono muscular estimulado bien por la acetilcolina (2,5 µM) o bien por los extractos al 0,02 % de masa fermentada (SD), de pan de masa fermentada (BR) o de análogo de pan (AN BR), y el efecto de la TTX previo al tratamiento. La TTX no muestra ningún efecto significativo sobre la contracción muscular inducida por la ACH de la masa fermentada, lo que sugiere que la estimulación es inducida por la acción directa sobre el mAChR muscular sin mediación neuronal.
- 20 **Figura 4:** los extractos de masa fermentada y de pan de masa fermentada estimulan la secreción de iones de cloruro cuando son aplicados bien en el lado seroso o bien en el mucoso de la mucosa intestinal. A: configuración de una cámara de Ussing con una pieza de mucosa separando las dos cámaras. El conjunto inferior de electrodos mide el voltaje transepitelial (V_{TE}) y el conjunto lateral – la corriente de cortocircuito (I_{sc}). La secreción se mide estimada por el cambio en la I_{sc} necesaria para mantener el V_{TE} a 0 mV. B: indicios representativos de la I_{sc} estimulada por extractos de acetilcolina (ACH), de masa fermentada (SD), de pan de masa fermentada (SD BR) o de un análogo de pan (AN BR). El área bajo la curva se calcula usando una integral ($\mu A*s/cm^2$) en la que el azul muestra la respuesta a los extractos, y las rayas rojas muestran la respuesta a la estimulación con un campo eléctrico (EFS). La Figura C muestra el valor mediano (n > 4) del cambio en la I_{sc} tras el tratamiento bien en el lado mucoso (MUC) o bien en el lado seroso (SER) de la mucosa del colon de cobaya. Los extractos de acetilcolina (ACH) y de masa fermentada (SD), así como de pan de masa fermentada (SD BR) estimulan claramente la secreción cuando son aplicados a cualquiera de los lados de la mucosa, mientras que el extracto de análogo de pan no tiene ningún efecto. Lo que demuestra que la acetilcolina de la masa fermentada y del pan de masa fermentada es responsable de la estimulación.
- 25 **Figura 5:** la atropina anula completamente la secreción de iones de cloruro estimulada con los extractos de masa fermentada (SD) y de pan de masa fermentada (SD BR). Se muestra el valor medio (n > 4) del cambio en la corriente de cortocircuito (I_{sc}) con el tiempo tras la aplicación de acetilcolina (ACH) (10 µM) y del extracto (0,1 %) tanto en el lado mucoso (A) como en el lado seroso (B) de la mucosa del colon de cobaya con y sin un pretratamiento con atropina (1 µM). La atropina anuló completamente la estimulación de la secreción, lo que sugiere el papel del mAChR en el efecto secretor de los extractos de masa fermentada.
- 30 **Figura 6:** la atropina anula completamente la estimulación de la secreción por parte de la ACH y de los extractos de masa fermentada (SD), de pan de masa fermentada (BR) o de análogo de pan (AN BR) cuando se aplica serosamente pero no mucosamente. Se muestra el valor medio (n > 4) del cambio en la corriente de cortocircuito (I_{sc}) con el tiempo subsiguiente al tratamiento con ACH y con el extracto en el lado mucosal con y sin un pretratamiento con atropina (1 µM). La atropina se añadió bien en el lado seroso o bien en el mucoso. La atropina anuló completamente la secreción cuando se aplicó en el lado seroso, pero no en el mucoso.
- 35 **Figura 7:** perfil metabólico de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada. A: mapa térmico de los valores absolutos de los metabolitos en el caldo MRS 24 horas después de la inoculación de las bacterias de ácido láctico (media de tres experimentos). B: la gráfica de PCA de los metabolitos indica un aguda distinción entre las bacterias de la masa fermentada probadas y *L. paracasei* (LC). C: la acetilcolina (ACH) juega el papel más importante en la separación observada en la gráfica de PCA, dado que *L. paracasei* no produce acetilcolina.
- 40 **Figura 8:** concentración de acetilcolina en medio MRS después de 24 horas de incubación con bacterias de ácido láctico. A: concentración de acetilcolina en el caldo MRS 24 horas después de la inoculación de $0,25 \times 10^7$ bacterias/ml. B: concentración de acetilcolina (ACH) ajustada a un recuento de bacterias de 10^6 /ml en MRS. La concentración se determinó usando una CL-EM/EM mediante la comparación del área del pico con el área de las
- 45 **Figura 9:** perfil metabólico de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada. A: mapa térmico de los valores absolutos de los metabolitos en el caldo MRS 24 horas después de la inoculación de las bacterias de ácido láctico (media de tres experimentos). B: la gráfica de PCA de los metabolitos indica un aguda distinción entre las bacterias de la masa fermentada probadas y *L. paracasei* (LC). C: la acetilcolina (ACH) juega el papel más importante en la separación observada en la gráfica de PCA, dado que *L. paracasei* no produce acetilcolina.
- 50 **Figura 10:** perfil metabólico de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada. A: mapa térmico de los valores absolutos de los metabolitos en el caldo MRS 24 horas después de la inoculación de las bacterias de ácido láctico (media de tres experimentos). B: la gráfica de PCA de los metabolitos indica un aguda distinción entre las bacterias de la masa fermentada probadas y *L. paracasei* (LC). C: la acetilcolina (ACH) juega el papel más importante en la separación observada en la gráfica de PCA, dado que *L. paracasei* no produce acetilcolina.
- 55 **Figura 11:** perfil metabólico de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada. A: mapa térmico de los valores absolutos de los metabolitos en el caldo MRS 24 horas después de la inoculación de las bacterias de ácido láctico (media de tres experimentos). B: la gráfica de PCA de los metabolitos indica un aguda distinción entre las bacterias de la masa fermentada probadas y *L. paracasei* (LC). C: la acetilcolina (ACH) juega el papel más importante en la separación observada en la gráfica de PCA, dado que *L. paracasei* no produce acetilcolina.
- 60 **Figura 12:** perfil metabólico de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada. A: mapa térmico de los valores absolutos de los metabolitos en el caldo MRS 24 horas después de la inoculación de las bacterias de ácido láctico (media de tres experimentos). B: la gráfica de PCA de los metabolitos indica un aguda distinción entre las bacterias de la masa fermentada probadas y *L. paracasei* (LC). C: la acetilcolina (ACH) juega el papel más importante en la separación observada en la gráfica de PCA, dado que *L. paracasei* no produce acetilcolina.
- 65 **Figura 13:** perfil metabólico de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada. A: mapa térmico de los valores absolutos de los metabolitos en el caldo MRS 24 horas después de la inoculación de las bacterias de ácido láctico (media de tres experimentos). B: la gráfica de PCA de los metabolitos indica un aguda distinción entre las bacterias de la masa fermentada probadas y *L. paracasei* (LC). C: la acetilcolina (ACH) juega el papel más importante en la separación observada en la gráfica de PCA, dado que *L. paracasei* no produce acetilcolina.

soluciones con una concentración conocida de acetilcolina.

Figura 9: el medio condicionado concentrado de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada inhibe significativamente la secreción de la proteína inducible por interferón 10 (IP-10) por parte de las células epiteliales intestinales (IEC) activadas por el factor de necrosis tumoral (TNF). Se muestra la concentración de la IP-10 en el medio de cultivo de las células Mode-k medida mediante un ELISA. Las células se incubaron durante 24 horas con medio condicionado concentrado (cCM) (barra negra) y con cCM más 10 ng/ml de TNF (barra gris). El *L. paracasei* (L.p.) expresa la Lactocepina PrtP, que es capaz de degradar eficazmente la IP-10 y, como se esperaba, tiene la mayor actividad inhibidora. El cCM de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada inhibe significativamente la secreción de la IP-10 pero en menor grado. Las cepas de *L. sanfranciscensis* DSM 23174 y DSM 23200 son las más eficaces en la inhibición de la secreción de la IP-10, junto con *L. paracasei*.

Figura 10: las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada fijadas en formaldehído inhiben significativamente la secreción de la proteína inducible por interferón (IP-10) por parte de las células epiteliales intestinales activadas por el TNF. Se muestra la concentración de la IP-10 en el medio de cultivo de las células Mode-k medida mediante un ELISA. Las células se incubaron durante 24 horas con 20 MOI de bacterias de ácido láctico fijadas (barra negra) y con 20 MOI de bacterias de ácido láctico fijadas más 10 ng/ml de factor de necrosis tumoral (TNF) (barra gris). El *L. paracasei* (L.p.) fijado tiene, de forma similar a las cepas fijadas de *L. sanfranciscensis* DSM 23090 y DSM 23092, la mayor actividad inhibidora sobre la secreción de la IP-10 por parte de las células epiteliales intestinales activadas por el TNF (barra gris) en comparación con el control activado por el TNF.

Además, la invención se explicará con más detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

1) Métodos y materiales

1.1) Masa fermentada y pan

Se preparó masa fermentada (Vollsauer) mediante la propagación tradicional de la masa fermentada de tipo I con iniciador de centeno que contiene las cepas de lactobacilos DSM 26024, DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 23174 y DSM 23121. La composición de la masa fermentada y del pan de masa fermentada es: un 71 % de harina de centeno, un 25 % de harina de trigo, un 1,8 % de sal y un 2 % de pan rallado (a un pH de 4,5, acidez de 9-10). La masa se horneó a 298 °C durante 1,5 horas. El análogo de pan era idéntico al pan de masa fermentada con la sustitución del iniciador de la masa fermentada por un 2,5 % bicarbonato de sodio, un 0,13 % de ácido acético y un 1,2 % de ácido láctico.

1.2) Análisis de los metabolitos

Se sometieron extractos acuosos (< 10 kDa) de masa fermentada, de pan de masa fermentada y de análogo de pan, así como bacterias de ácido láctico cultivadas en medio MRS, a un análisis mediante una CL-EM/EM para la cuantificación de los metabolitos. El medio MRS se filtró con filtros Vivaspin 500 de 10 kDa (Sartorius Stedim biotech, Goettingen, Alemania) antes del análisis.

Las muestras se midieron usando:

45 Cromatografía líquida de resolución ultra alta Dionex UltiMate® 3000 (Dionex, Idstein, Alemania)

- bomba - HPG-3400SD
- desgasificador - SRD-3400
- automuestreador - WPS - 3000TSL
- horno de columna - TCC-3000SD

50 API 4000 QTRAP, espectrómetro de masas de cuadrupolo con trampa lineal de iones (AB Sciex, Darmstadt, Alemania):

- tipo de ionización - ionización por electronebulización (ESI)
- control del instrumento - programa informático Analyst (AbSciex, Darmstadt, Alemania)
- 55 - fase estacionaria: gel TSK de Amide-80 de 3 µm (150 x 2 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania)
- temperatura de la fase estacionaria: 40 °C
- Fase móvil:

eluyente A: acetonitrilo / 5 mM/l de acetato de amonio en agua (95 + 5)

eluyente B: 5 mM/l de acetato de amonio en agua (95 + 5)

gradiente:	0 min	90 % de A	10 % de B
	5 min	90 % de A	10 % de B
	10 min	80 % de A	20 % de B
	15 min	50 % de A	50 % de B

	18 min	0 % de A	100 % de B
	21 min	0 % de A	100 % de B
	24 min	90 % de A	10 % de B
	30 min	90 % de A	10 % de B
caudal:	200 µl/min		

Los cromatogramas se analizaron con MultiQuant 2.0 (AB Sciex, Darmstadt, Alemania) y las concentraciones de las muestras se calcularon según los espectros de los patrones.

5 1.3) Extracción

La masa fermentada, el pan de masa fermentada y el análogo de pan fueron liofilizados y pulverizados. Se solubilizaron 100 g de pan o de masa fermentada en polvo en 500 ml de agua destilada y se extrajeron durante 3 horas a 50 °C con agitación constante. La suspensión se centrifugó a 9.000 rpm durante 20 min. El sobrenadante se recogió y se conservó a 4 °C. El sedimento se resuspendió de nuevo en 500 ml de agua destilada y se repitió la extracción de 3 horas. Después de una centrifugación, el sedimento se resuspendió de nuevo en 500 ml de agua destilada y se extrajo durante una noche. Los sobrenadantes después de las tres etapas de extracción (volumen total de aproximadamente 1,5 l) se agruparon entre sí y se filtraron por etapas usando casetes Vivacaudal 200 con unos umbrales de exclusión de 0,2 µm, de 100 kDa y de 10 kDa (Sartorius, Goettingen, Alemania). Los filtrados de los umbrales de exclusión de 100 kDa y de 10 kDa se liofilizaron y se resuspendieron en agua destilada al 25 % para los ensayos *in vitro*. Se extrajeron 10 g de una fracción < 10 kDa a partir de 100 g del pan y de la masa fermentada liofilizados.

1.4) Medición y limpieza de la endotoxina

Las mediciones de las concentraciones de endotoxina en los extractos acuosos de la masa fermentada, del pan de masa fermentada y del análogo de pan se determinaron usando un ensayo de punto final cromogénico de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (Hycult biotech, Uden, Holanda). El ensayo se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. La contaminación por endotoxina en los extractos acuosos de la masa fermentada, del pan de masa fermentada y del análogo de pan se eliminó usando columnas de eliminación de endotoxina Detoxi-Gel™ (Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos), que contienen una resina con polimixina B inmovilizada para que se una a, y elimine, los pirógenos de la solución. La eliminación de la endotoxina se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante.

1.5) ELISA

Las concentraciones de la proteína inducible por interferón (IP-10) (murina/humana) y (murina) en los sobrenadantes de los cultivos celulares se determinaron usando los apropiados kits de ELISA (R&D Europe, Abington, Inglaterra) según las instrucciones del fabricante. El ELISA se llevó a cabo usando placas de 96 pocillos de fondo plano Nunc MaxiSorp® (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Alemania). En resumen, las placas de 96 pocillos se recubrieron con el anticuerpo de captura apropiado durante una noche a la TA. Las placas se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1 % en PBS y se incubaron con los sobrenadantes de los cultivos celulares durante 1,5 h a la TA. Las placas se lavaron y se incubaron con los anticuerpos de detección apropiados durante 1,5 h a la TA. Las placas se lavaron y se incubaron con una enzima de detección. Las placas se lavaron y se incubaron con una solución de sustrato. La concentración de proteína se determinó mediante un análisis fotométrico de la reacción entre el sustrato y la enzima de detección.

1.6) Cultivo bacteriano

Las cepas de *L. sanfranciscensis* (DSM 23090, DSM 23091, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23174, DSM 23200, DSM 23201) y de *L. rossiae* (DSM 26024) aisladas a partir de la masa fermentada, la cepa de tipo *L. sanfranciscensis* DSM 20451 (DSMZ GmbH, Braunschweig, Alemania), de *L. plantarum* FUA 3038 y de *L. brevis* 3113 (proporcionadas por Prof. Ganzle de la Universidad de Alberta, Canadá), de *L. paracasei* VSL#3 (proporcionada por Dr. DeSimone, L'Aquila, Italia), se cultivaron a 30 °C en caldo MRS (a un pH de 5,4) que contiene un 0,15 % de L-cisteína recién añadida en condiciones anaerobias usando los paquetes Anaerogen (Anaerogen, Basingstoke, Oxoid, Reino Unido). Las bacterias fijadas (en formaldehído al 5 %, 4 horas, 4 °C) se lavaron tres veces con PBS estéril antes de su uso. Los medios condicionados concentrados (CM) se generaron transfiriendo las bacterias (5×10^7 ufc/ml) de un cultivo de una noche a DMEM (glutamina al 1 %, HEPES 20 mM) y a un cultivo anaerobio durante una noche a 30 °C. Las bacterias y el sobrenadante bacteriano (CM) se separaron después de una centrifugación (4.500 g, 10 min, a la TA). El CM se ajustó a un pH de 7,4, se filtró estéril (0,22 µm) y se concentró (100x) usando sistemas de filtro Vivacell con un tamaño de exclusión de 100 kDa (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemania). Los medios condicionados concentrados se diluyeron a 1x en los experimentos de estimulación del medio de cultivo. Las placas de agar se obtuvieron mediante la adición de un 1,5 % de agar al respectivo medio descrito anteriormente.

1.7) Motilidad

Las mediciones de la motilidad se llevaron a cabo con preparaciones musculares del cuerpo circular de cobayas Dunkin Hardley (Sulzfeld y Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Alemania). La fuerza contráctil del músculo se midió usando un transductor de fuerza en un baño de órganos usando el programa informático LabChart 5 (ADInstruments, Spechbach, Alemania). En resumen, se diseccionó tejido muscular del estómago de la capa mucosa en una preparación de solución de Krebs enfriada en hielo perfundida de forma continua (a un pH de 7,4) ($\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM, NaH_2PO_4 1,2 mM, NaCl 117 mM, NaHCO_3 25 mM, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 11 mM, KCl 4,7 mM). Se cortó una pieza de 1,5 cm² del músculo del cuerpo circular y se montó desde ambos extremos con un hilo de poliamida entre dos electrodos en un baño de órganos en 20 ml de solución experimental de Krebs (idéntica a la preparación de Krebs excepto por el NaHCO_3 20 mM) a 37 °C y se aireó de forma continua con Carbogen (un 95 % de O₂ y un 5 % de CO₂). Después de un periodo de equilibrio de 45 min, las preparaciones musculares fueron estimuladas mediante una estimulación de campo eléctrico (EFS) para probar su vitalidad. El cambio en la fuerza contráctil durante la EFS, así como en el tratamiento experimental, se midió mediante un transductor de fuerza. El periodo de tiempo entre cualquier tratamiento era siempre de 20 min.

1.8) Cámara de Ussing

El movimiento de iones a través del epitelio intestinal se midió con la técnica de la cámara de Ussing (Easy mount chambers, Physiologic instruments, San Diego, Estados Unidos) y el programa informático LabChart 5 (ADInstruments, Spechbach, Alemania). En resumen, se diseccionaron segmentos del colon distal de cobayas Dunkin Hardley (Sulzfeld y Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, Alemania), se retiraron las capas musculares y las preparaciones de mucosa/submucosa se montaron en un portaobjetos con un área de registro de 0,5 cm². Los lados apicales y basolaterales se bañaron por separado en 5 ml de solución de Krebs. Durante los procedimientos experimentales, el baño se mantuvo a 37 °C y se aireó de forma continua con Carbogen (un 95 % de O₂ y un 5 % de CO₂). Después de un periodo de equilibrio de 45 min, el tejido fue estimulado eléctricamente (parámetros: potencia del estímulo de 6 V, duración de 10 s, frecuencia de 10 Hz, duración del pulso individual de 0,5 ms) para evaluar la vitalidad del tejido. Para la evaluación del transporte activo de iones espontáneo que se produce con el voltaje transepitelial (V_{TE}) formado por el transporte pasivo de iones a través del tejido, se estableció a 0 mV mediante la aplicación de una corriente de cortocircuito (I_{SC}). Cuando se induce la secreción activa del ion de cloruro, se observa un aumento en la I_{SC} necesario para mantener el V_{TE} a 0 mV. El cambio en la I_{SC} es equivalente a la corriente generada por la secreción de aniones o la absorción de cationes. La resistencia transepitelial ($TER = V_{TE} / I_{SC} \times 1.000/2$) del tejido se midió al comienzo y al final de cada experimento para evaluar la integridad del tejido.

1.9) Análisis estadístico

Los datos están expresados como los valores medios \pm la desviación típica (DT). Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo usando la plataforma de programación estadística R que compara el grupo de tratamiento frente al correspondiente grupo de control, se analizaron usando pruebas de la *t* para datos independientes. Los datos que comparan los diversos tratamientos frente a los correspondientes grupos de control se analizaron usando un ANOVA monofactorial seguido de un procedimiento de comparación múltiple apropiado. Si los datos no seguían una distribución normal o comprendían datos discontinuos, se usaron pruebas no paramétricas (prueba de Mann-Whitney/de la suma de rangos, ANOVA en rangos). Las diferencias se consideraron significativas si los valores de *p* eran $< 0,05$ (*) o $< 0,01$ (**). El análisis del componente principal (PCA) se describe en Pearson, K.; On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space, Philosophical Magazine (1901), 2 (11), 559-572, y en Theodoridis, G., Gika, H. G., Wilson, I. D.; LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics, TrAC Trends in Analytical Chemistry (2008), 27 (3), 251-260.

2.) Resultados

2.1) Análisis mediante una CL-EM/EM de los metabolitos en los extractos de la masa fermentada, del pan de masa fermentada y del análogo de pan

Para comparar el efecto de la fermentación sobre de la masa fermentada y el pan de masa fermentada, los extractos solubles en agua (< 10 kDa, por triplicado) de la masa fermentada, del pan de masa fermentada y del análogo de pan en bruto, preparados a partir de tres lotes diferentes, se sometieron a un análisis mediante una CL-EM/EM. La concentración de los metabolitos en los extractos se determinó mediante la comparación de la solución patrón con una concentración conocida de metabolitos.

El análisis del componente principal (PCA) mostró unas diferencias significativas en los metabolitos aislados a partir de la masa fermentada, del pan de masa fermentada y del análogo de pan (Fig. 1). La masa fermentada en bruto tiene unas cantidades significativamente mayores de aminoácidos libres, que reflejan la actividad proteolítica de las enzimas endógenas de la harina, así como de las proteasas de las bacterias de ácido láctico. Antes de hornear se añade harina reciente sin fermentar a la masa fermentada, lo que explica por qué no hay diferencias en el contenido de aminoácidos libres entre el análogo y el pan de masa fermentada. La acetilcolina es un metabolito que está presente coherentemente en la masa fermentada y en el pan de masa fermentada, pero no en el análogo de pan (Tabla 1). La

fermentación por parte de las bacterias de la masa fermentada es la única diferencia entre el pan de masa fermentada y el análogo de pan, lo que sugiere que la acetilcolina es producida por los microorganismos presentes en la masa fermentada.

- 5 **Tabla 1:** la masa fermentada y el pan de masa fermentada contienen unas grandes cantidades de acetilcolina de con 38,6 mg/kg en el pan seco. La concentración se determinó usando una CL-EM/EM mediante la comparación del área del pico con el área de las soluciones con concentraciones patrones de acetilcolina.

Extractos acuosos	Concentración de ACH en los extractos acuosos	Concentración de ACH en el pan o en la masa fermentada, masa seca
Masa fermentada, 10 kDa	1.819 ± 717 µM	26,5 ± 10,4 mg/kg
Pan de masa fermentada, 10 kDa	2.644 ± 273 µM	38,6 ± 4,03 mg/kg
Análogo de pan, 10 kDa	44,5 ± 1,0 µM	0,64 ± 0,03 mg/kg

10 2.2) La acetilcolina derivada de la masa fermentada desencadena la contracción muscular *in vitro*

La acetilcolina (ACH) es un neurotransmisor que es responsable de la activación de la motilidad en el tracto gastrointestinal mediante la estimulación de los receptores muscarínicos (mAChR) o nicotínicos (nAChR) de la ACH en las células musculares. Para determinar si la acetilcolina derivada de la masa fermentada mimetiza esta actividad, se estimuló el músculo del cuerpo aislado de cobaya con extractos de masa fermentada, de pan de masa fermentada y de análogo de pan, y se midió la estimulación de la contracción. Tanto la masa fermentada como los extractos de masa fermentada, pero no el extracto de análogo de pan, inducen unas contracciones musculares similares a la acetilcolina a una concentración equivalente (Fig. 2). Se usó atropina, un antagonista específico del mAChR, para determinar si los extractos estimulan la contracción mediante la activación del AChR muscarínico o del nicotínico. El pretratamiento de las tiras musculares con atropina anuló completamente la estimulación por parte de la ACH, así como por parte de los extractos de masa fermentada y de pan de masa fermentada, lo que indica que la acetilcolina derivada de la masa fermentada está actuando a través del mAChR.

Adicionalmente, para clarificar si la ACH derivada de la masa fermentada actúa a través de la activación de las neuronas que consecuentemente estimulan las células musculares, las preparaciones musculares se pretrataron con tetrodotoxina (TTX). La TTX bloquea el potencial de acción generado por las neuronas que anula la señalización cascada abajo. El pretratamiento con TTX no tuvo ningún efecto significativo sobre la contracción muscular inducida por la acetilcolina y los extractos, lo que sugiere que ambos activan directamente el mAChR de las células musculares (Fig. 3). La motilidad es una de las funciones cruciales del tracto GI. Los agonistas y los antagonistas de los receptores de la serotonina (5-hidroxitriptamina) son una opción de tratamiento habitual para modular la motilidad, y consecuentemente los movimientos del intestino de los pacientes con SII (Camilleri, M. y V. Andresen, Current and novel therapeutic options for irritable bowel syndrome management. Dig Liver Dis, 2009. 41 (12): págs. 854-62). Estas observaciones demuestran que la aplicación externa de ACH en sitios locales también podría utilizarse para modular la motilidad mediada por el ENS.

35 2.3) La acetilcolina derivada de la masa fermentada estimula la secreción por parte de la mucosa intestinal desde el lado luminal

La acetilcolina (ACH), liberada por las neuronas entéricas en el lado seroso de la pared intestinal, estimula la secreción de iones de cloruro por parte de la mucosa, conduciendo posteriormente el transporte pasivo de agua a la luz. Este efecto es temporal debido a la rápida degradación de la acetilcolina por parte de la acetilcolinesterasa. El efecto de la ACH derivada de la masa fermentada sobre la función secretora intestinal se probó en colon de cobaya. Se aplicaron los extractos de masa fermentada, de pan de masa fermentada, de análogo de pan, así como de ACH (pura) bien en el lado luminal (mucoso) o bien en el lado seroso de preparaciones de mucosa/submucosa intestinal de colon distal de cobaya. El experimento se llevó a cabo en una cámara de Ussing y se midió el cambio en la corriente de cortocircuito (I_{sc}). En este sistema, el caudal pasivo de iones a través de una capa de células de tejido o de epitelio es eliminado por un equilibrio de gradientes eléctricos, osmóticos, hidrostáticos y químicos a través de la preparación, de forma que se mide el único ion de transporte activo. En la cámara de Ussing, los electrodos se colocan cercanos a cada lado del tejido para permitir la detección de la diferencia de potencial espontánea (PD) a través del epitelio generada como consecuencia del transporte activo del ion (Hirota, C. L. y McKay D. M., Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine, Br. J. Pharmacol., 2006, 149 (5): págs. 463-79). Sorprendentemente podía observarse un aumento en la I_{sc} cuando las preparaciones fueron estimuladas tanto desde el lado mucoso como seroso por la ACH, así como por los extractos que contienen ACH (el extracto del análogo de pan no tuvo ningún efecto) (Fig. 4), lo que demuestra que la acetilcolina de la masa fermentada y del pan de masa fermentada es adecuada para la estimulación.

El tejido fue pretratado con atropina y se midió de nuevo el efecto de los extractos sobre la secreción (Fig. 5). La atropina anuló completamente la respuesta, lo que corrobora el papel del mAChR en el efecto prosecretor de los extractos de masa fermentada.

Una investigación anterior proporciona pruebas de la expresión del ACHR en las células epiteliales intestinales del lado basolateral, pero no en el sitio apical de la capa de células (Hirota, C. L. y McKay D. M., Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine, Br. J. Pharmacol., 2006, 149 (5): págs. 463- 79). por lo tanto, es altamente probable que la ACH, aplicada desde el lado apical, atravesase la capa de células y estimule los receptores del lado basolateral. Esta hipótesis fue verificada por el hecho de que cuando se aplica la ACH apicalmente, es decir, en el lado, mucoso o luminal, el efecto secretor era significativamente inhibido cuando se aplicó atropina en el lado seroso pero no en el lado mucoso (Fig. 6). La atropina aplicada en el lado seroso bloqueó todos los mAChR del lado basolateral, anulando la actividad de la ACH. Sin embargo, cuando se aplicaba la atropina en el lado mucoso, esto da como resultado que unas menores cantidades alcanzan el lado basolateral, y por lo tanto, únicamente inhiben parcialmente la actividad de la ACH. La observación de que la atropina puede atravesar la barrera epitelial y bloquear el mAChR basolateral se confirmó mediante el hecho de que cuando se aplicaba la ACH serosalmente y la atropina mucosalmente, la secreción era inhibida (datos no mostrados).

Estas observaciones demuestran que la aplicación externa de ACH en sitios locales también podría utilizarse para modular la secreción de fluidos mediada por el ENS. Esto es especialmente importante, dado que se cree que la secreción de fluidos en el intestino proporciona el entorno ideal para la digestión enzimática y para facilitar el paso de las heces a través del tracto intestinal. Adicionalmente, algunos estudios recientes sugieren que la secreción acuosa aguda y dirigida localmente sirve como una medida protectora frente al daño epitelial en los puntos de particular estrés mecánico (Barrett, K. E. y S. J. Keely, Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. Annu Rev Physiol, 2000. 62: págs. 535- 72 y Sidhu, M. y H. J. Cooke, Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. Am J Physiol, 1995. 269 (3 Pt 1): págs. G346-51).

2.4) El análisis mediante una CL-EM/EM reveló la presencia de acetilcolina en el medio de cultivo de las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada

Se cultivaron siete cepas de *L. sanfranciscensis* (DSM 23090 - DSM 23201) y de *L. rossiae* (DSM 26024) aisladas a partir de masa fermentada, de *L. plantarum* FUA 3038 y de *L. brevis* 3113 aisladas a partir de otras masas fermentadas, y de *L. paracasei* (VSL#3), durante 24 horas en medio MRS. En medio de cultivo se recogió, se filtró y se analizó usando una CL-EM/EM.

El análisis del PCA mostró una diferencia significativa en los perfiles de los metabolitos de todas las bacterias aisladas a partir de la masa fermentada en comparación con *L. paracasei*. La separación es debida a su mayor parte al impacto de la acetilcolina presente en el medio de crecimiento de las bacterias de la masa fermentada, pero no en el medio de *L. paracasei* (Fig. 7). El mayor productor de ACH durante 24 horas es *L. brevis* 3113, que adicionalmente tiene el mayor índice de crecimiento (Fig. 8A). Sin embargo, cuando la concentración se ajusta a un número de bacterias, por ejemplo, 10⁶/ml, en el caldo, la mayor parte de la ACH por célula bacteriana es producida por las cepas de *L. sanfranciscensis* DSM 23090 y DSM 23093 (Fig. 8B).

2.5) Las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada inhiben la secreción de la quimiocina IP-10 por parte de las células epiteliales intestinales activadas por el TNF

La lactocepina PrtP, una proteasa de serina expresada en *L. paracasei* (VSL#3), degrada selectivamente la quimiocina proinflamatoria proteína inducible por interferón 10 (IP-10). Para investigar si la PrtP también está presente en los lactobacilos de la presente invención, se aisló el ADN bacteriano total a partir de ocho cepas de la masa fermentada: de *L. sanfranciscensis* (DSM 23090, DSM 23091, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23174, DSM 23200, DSM 23201) y de *L. rossiae* (DSM 26024), así como de *L. paracasei* como control positivo. El ADN se amplificó usando cebadores específicos para la Lactocepina PrtP y se visualizó en un gel de agarosa. No había unas cantidades detectables presentes del gen de la lactocepina PrtP en las bacterias de ácido láctico aisladas a partir de la masa fermentada. Se probaron los efectos de las ocho cepas de bacterias de ácido láctico de la masa fermentada y de *L. paracasei* sobre la secreción de la quimiocina proinflamatoria IP-10 por parte de células Mode-K no estimuladas y activadas por el TNF. De forma interesante, tanto las bacterias de ácido láctico del medio condicionado (Fig. 9) como las fijadas (Fig. 10) mostraron una actividad inhibidora de la IP-10 a pesar del hecho de que no se detectó el gen de la Lactocepina PrtP. Esto sugiere que hay factores tanto secretados como unidos a la superficie celular producidos por las bacterias de ácido láctico de la masa fermentada adecuados para inhibir la secreción de la quimiocina proinflamatoria IP-10. Este resultado proporciona una base para el potencial tratamiento de la EII y el alivio de sus síntomas, dado que la IP-10 se ha implicado en el refuerzo de la inflamación intestinal en pacientes con EII.

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) u Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	International Application No.	
0-3	Applicant's or agent's File reference	53906PWO
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	28
1-2	line	10
1-3	identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania
1-3-3	Date of deposit	21.June 2012 (21-06.2012)
1-3-4	Accession Number	DSMZ 23090
1-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
2	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
2-1	page	28
2-2	line	10
2-3	Identification of deposit	
2-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
2-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania
2-3-3	Date of deposit	21.June 2012 (21.06.2012)
2-3-4	Accession Number	DSMZ 23091
2-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
3	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
3-1	page	28
3-2	line	11
3-3	Identification of deposit	

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

3-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
3-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania
3-3-3	Date of deposit	21.June 2012 (21.06.2012)
3-3-4	Accession Number	DSMZ 23200
3-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

4	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
4-1	page	28
4-2	line	11
4-3	Identification of deposit	
4-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
4-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania
4-3-3	Date of deposit	21.June 2012 (21.06.2012)
4-3-4	Accession Number	DSMZ 23092
4-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
5	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
5-1	page	28
5-2	line	11
5-3	Identification of deposit	
5-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
5-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania
5-3-3	Date of deposit	21. June 2012 (21.06.2012)
5-3-4	Accession Number	DSMZ 23093
5-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
6	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
6-1	page	28
6-2	line	11
6-3	Identification of deposit	

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

6-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania 21.June 2012 (21 .06.2012) DSMZ 23201
6-3-2	Address of depositary institution	
6-3-3	Date of deposit	
6-3-4	Accession Number	
6-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

7	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
7-1	page	28
7-2	line	11
7-3	Identification of deposit	
7-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania 21.June 2012 (21-06.2012) DSMZ 23174
7-3-2	Address of depositary institution	
7-3-3	Date of deposit	
7-3-4	Accession Number	
7-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
8	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
8-1	page	8
8-2	line	10
8-3	Identification of deposit	
8-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania 21.June 2012 (21.06.2012) DSMZ 23121
8-3-2	Address of depositary institution	
8-3-3	Date of deposit	
8-3-4	Accession Number	
8-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations
9	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
9-1	page	28
9-2	line	12
9-3	Identification of deposit	

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

9-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
9-3-2	Address of depositary institution	Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Alemania
9-3-3	Date of deposit	04. June 2012 (04.06.2012)
9-3-4	Accession Number	DSMZ 26024
9-5	Designated States for Which Indications are Made	All designations

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received con the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un microorganismo productor de acetilcolina para su uso médico en la prevención y/o en el tratamiento de enfermedades intestinales, y/o en la reducción del riesgo de enfermedades intestinales, en el que dicho microorganismo es una cepa de *Lactobacillus sanfranciscensis* o una cepa de *Lactobacillus rossiae*.
- 10 2. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según la reivindicación 1, para mantener y/o promover una flora intestinal sana y/o para reducir los efectos tóxicos del proceso digestivo y/o para estimular el sistema digestivo y/o para mejorar el control intestinal.
- 15 3. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la enfermedad intestinal es un trastorno intestinal funcional y/o un trastorno asociado con las secreciones de la pared intestinal controladas por el sistema nervioso entérico, en particular un estreñimiento funcional, una diarrea funcional y/o un síndrome de intestino irritable (SII), más en particular, un SII con predominio de estreñimiento, un SII alternante o un SII con predominio de diarrea.
- 20 4. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad intestinal es una enfermedad inflamatoria del intestino, en particular colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn.
- 25 5. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo produce > 30 mg/kg de acetilcolina en unas condiciones de cultivo adecuadas.
- 30 6. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el microorganismo es una bacteria.
- 35 7. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el *Lactobacillus* se selecciona entre una cualquiera de las cepas DSM 26024, DSM 23090, DSM 23091, DSM 23200, DSM 23092, DSM 23093, DSM 23201, DSM 23174 y DSM 23121 o una cepa cultivada a partir de las mismas, particularmente a partir de la DSM 23090 y de la DSM 23093.
- 40 8. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una forma de dosificación farmacéutica, en un alimento funcional o en una bebida funcional.
- 45 9. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según la reivindicación 8, en el que el alimento funcional es pan de masa fermentada.
10. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según la reivindicación 8 o 9, que comprende adicionalmente al menos una bacteria adicional para el mantenimiento y/o la restauración de una flora intestinal favorable.
11. El microorganismo productor de acetilcolina para su uso según la reivindicación 8 o 9, que comprende adicionalmente al menos un medicamento adicional para el tratamiento de enfermedades intestinales.
12. Uso no médico de un microorganismo productor de acetilcolina para el mantenimiento y/o la mejora de la salud intestinal, en el que dicho microorganismo es una cepa de *Lactobacillus sanfranciscensis* o una cepa de *Lactobacillus rossiae*.
13. El uso no médico de la reivindicación 12 según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2-10.

A

Figura 1

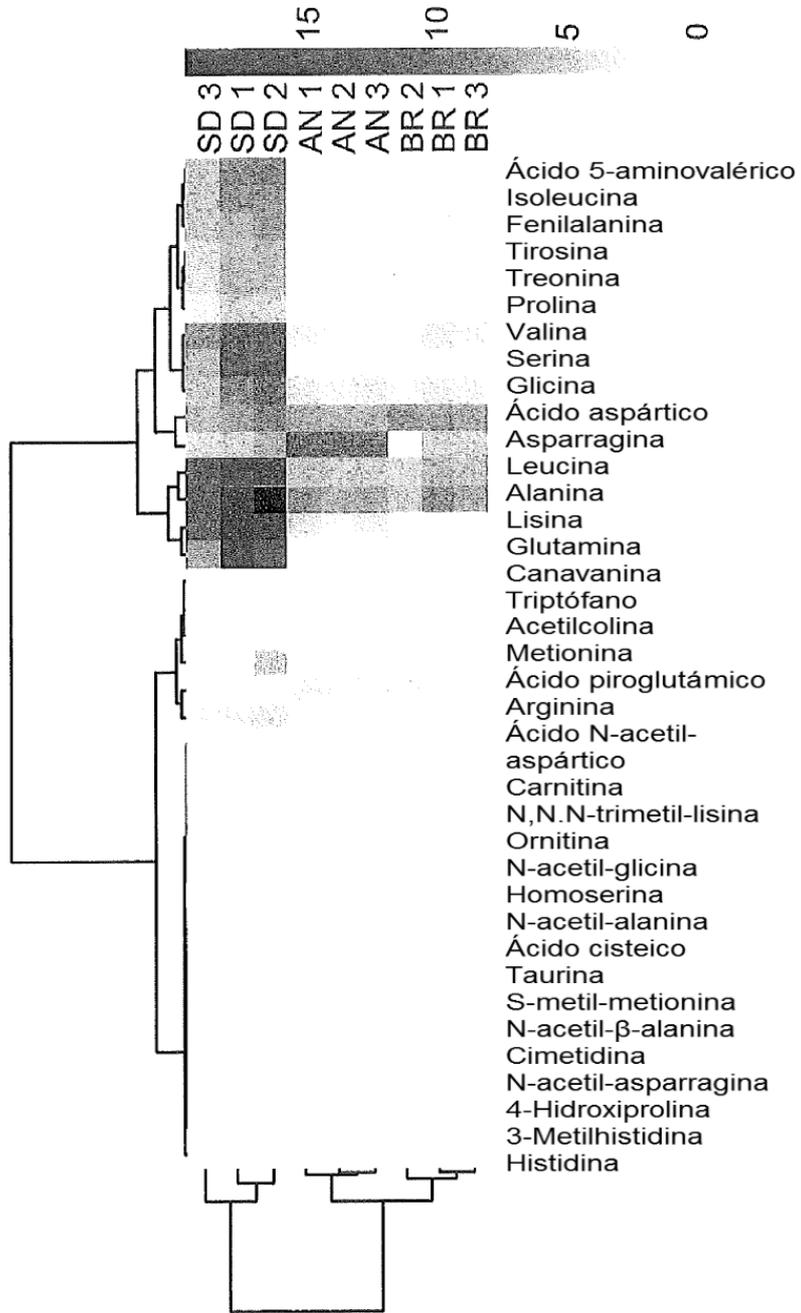


Figura 1 (continuación)

B

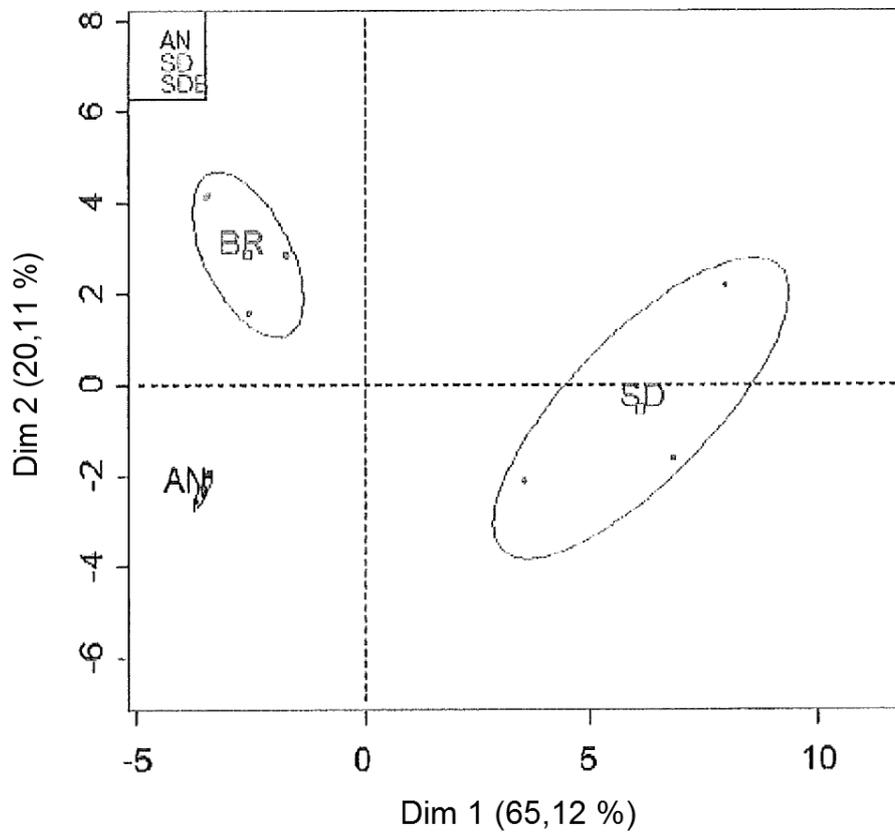


Figura 2

A

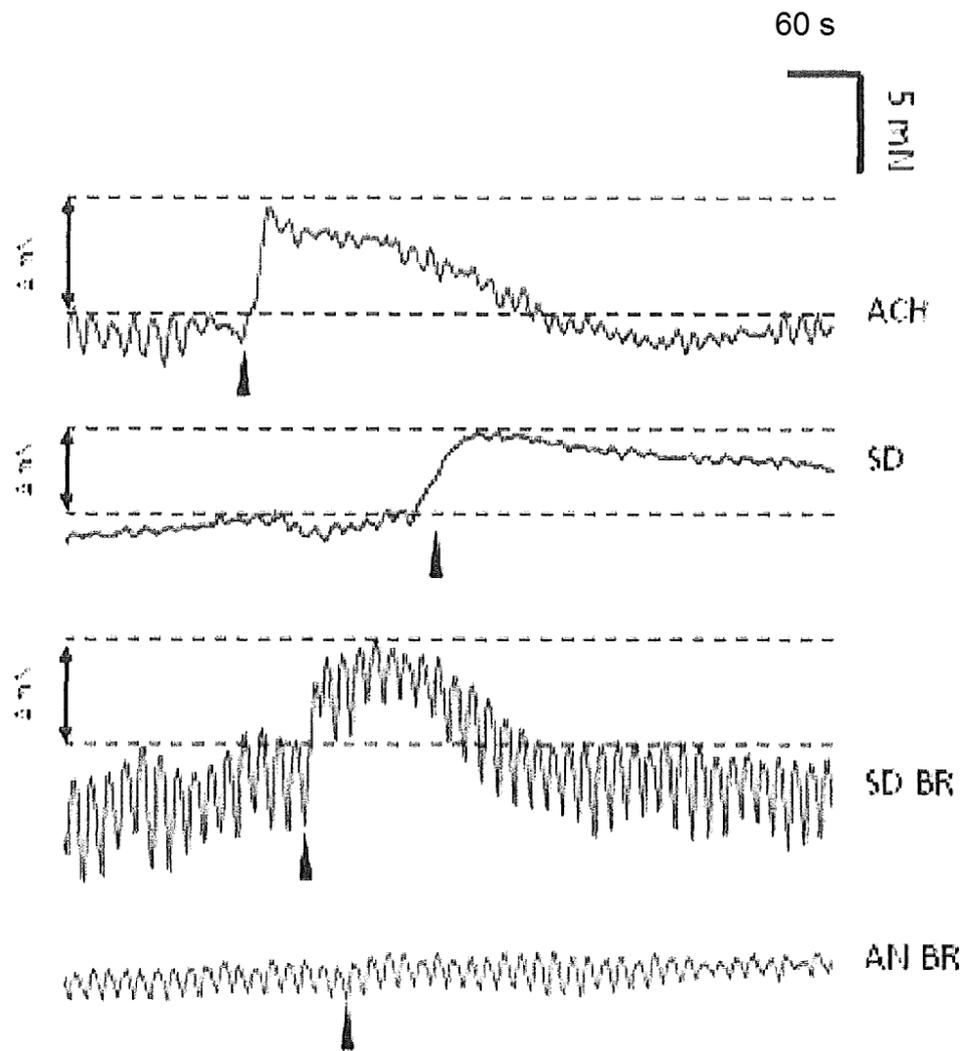


Figura 2 (continuación)

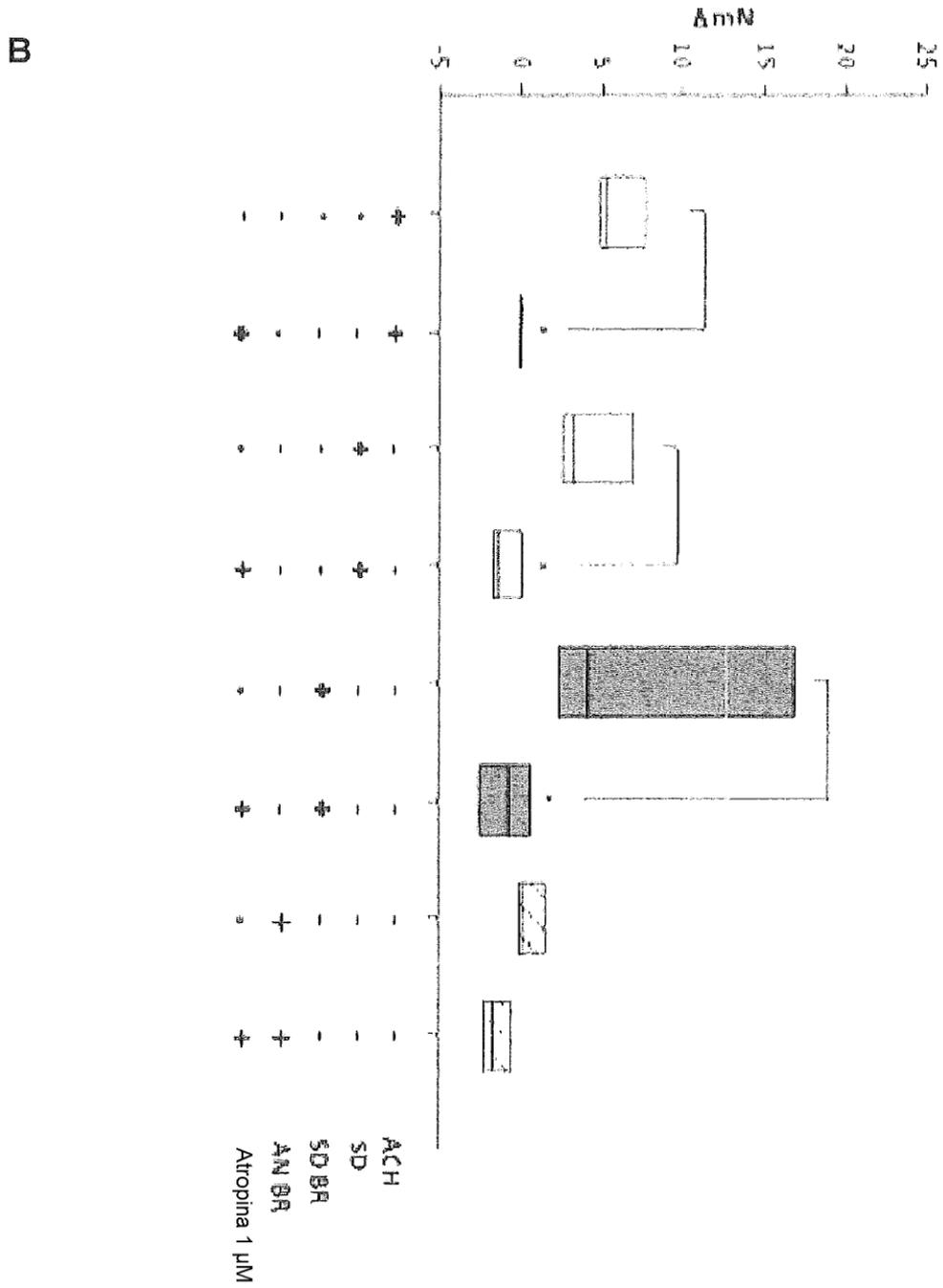


Figura 3

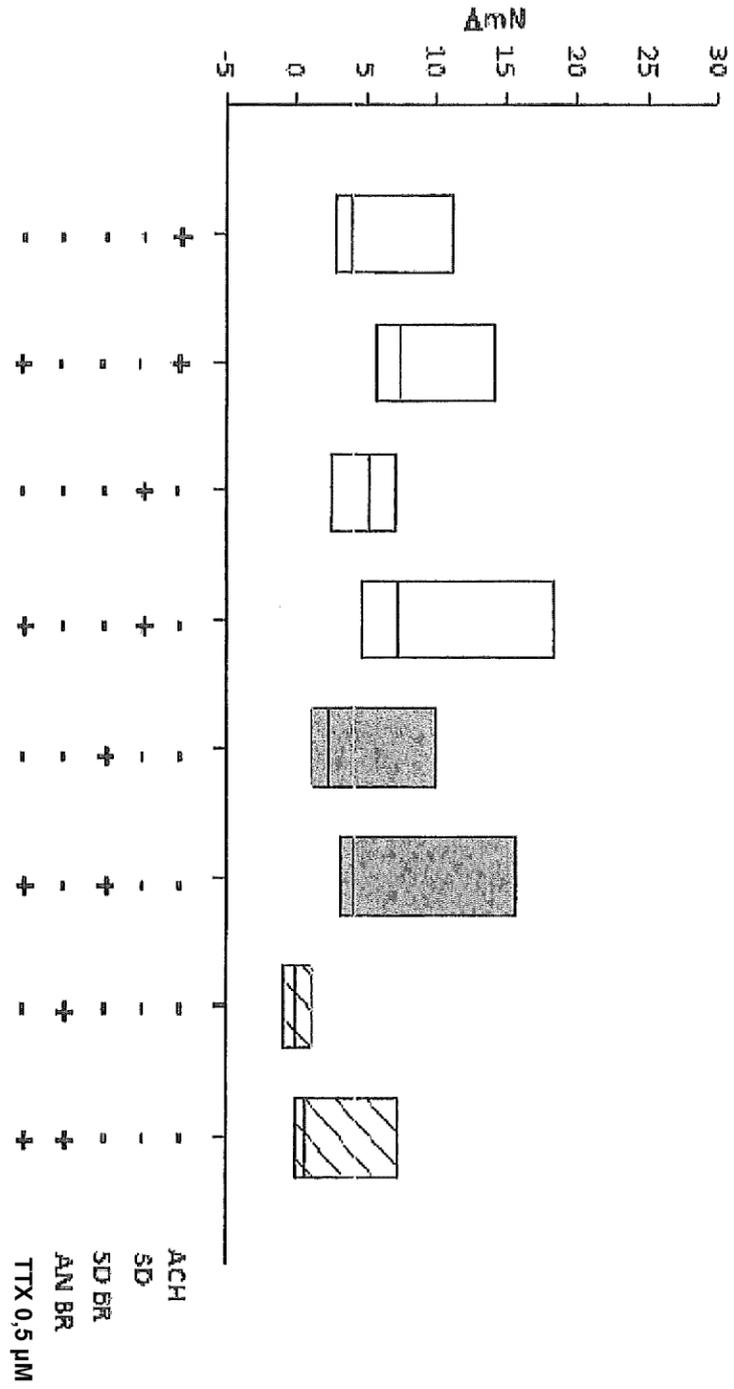


Figura 4

A

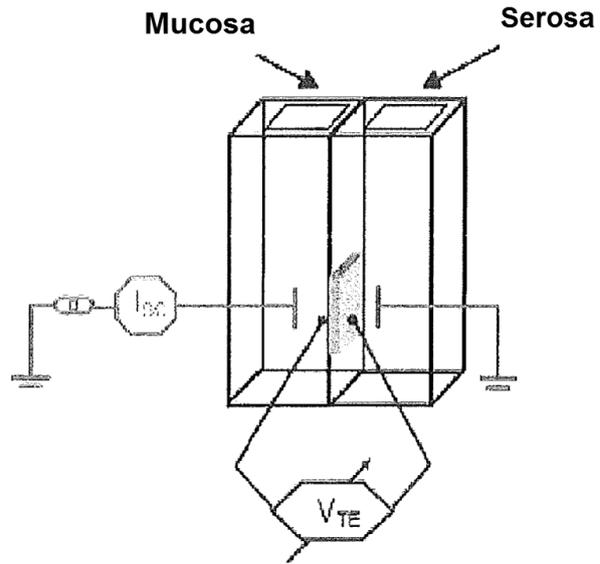


Figura 4 (continuación)

B

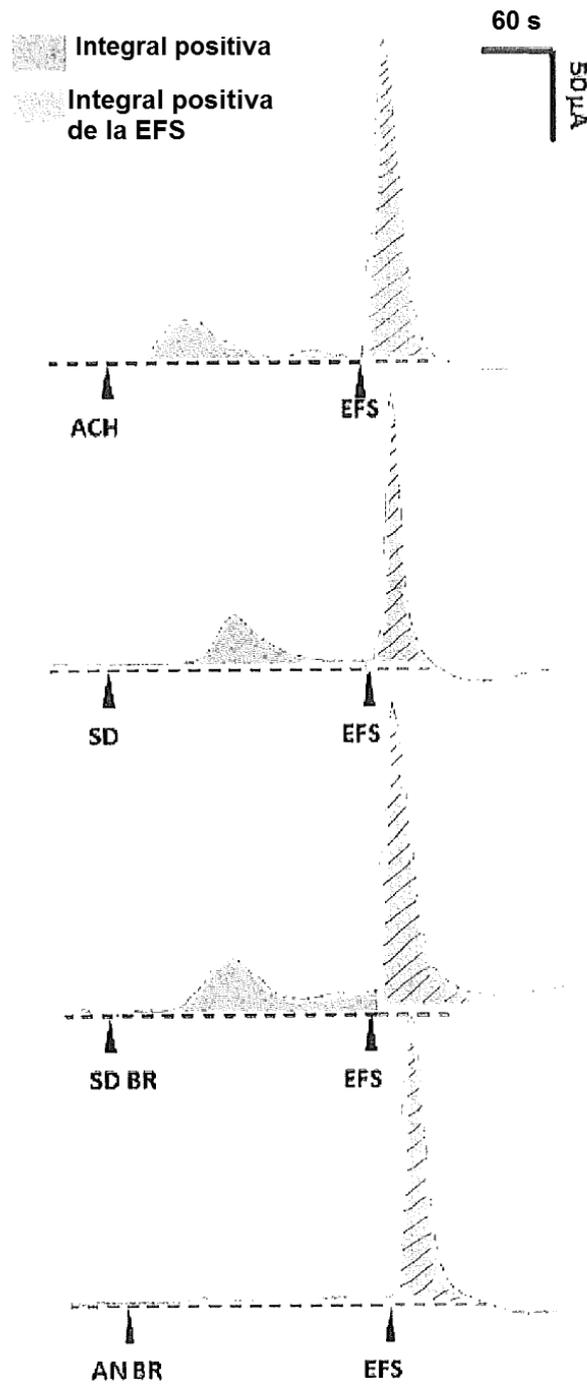


Figura 4 (continuación)

C

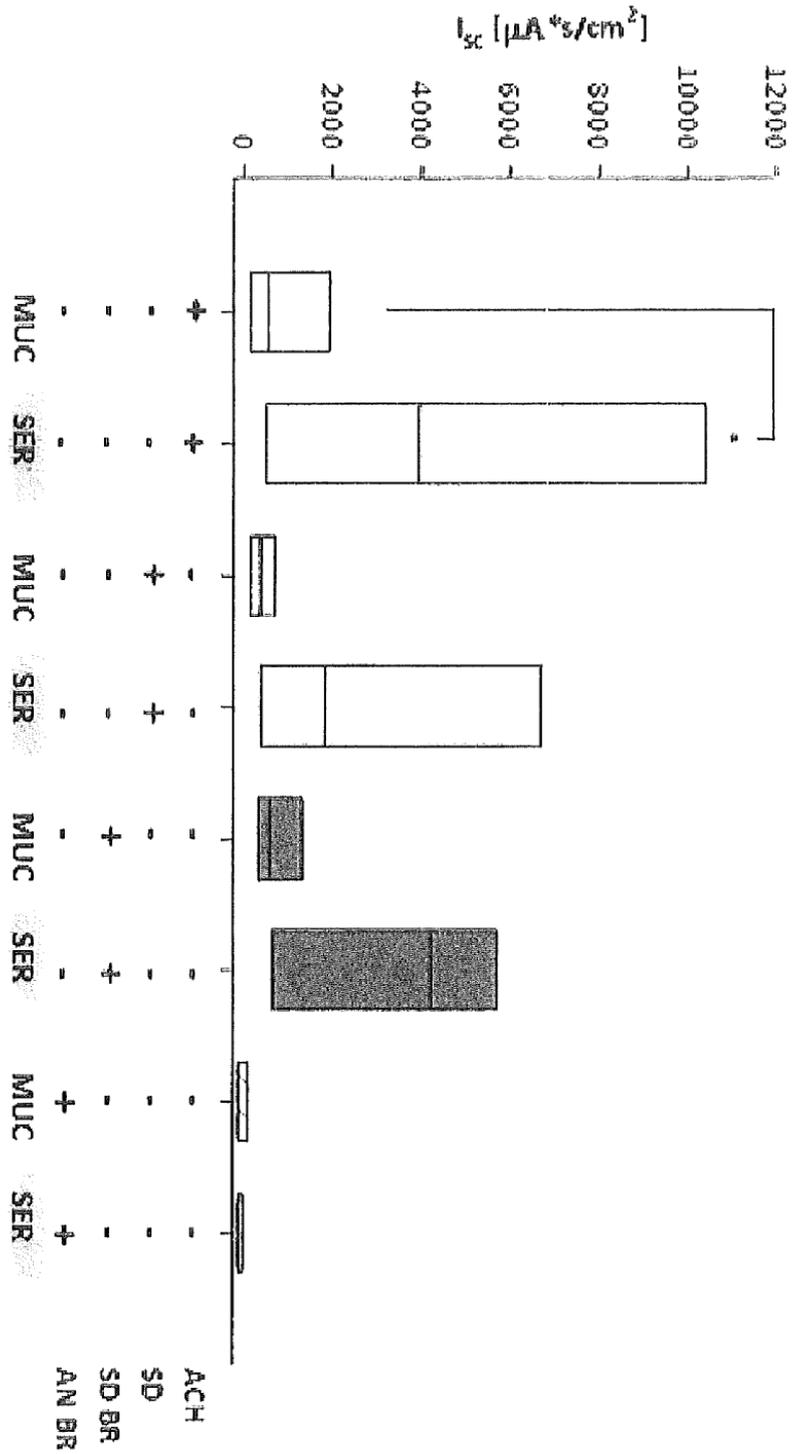


Figura 5

A

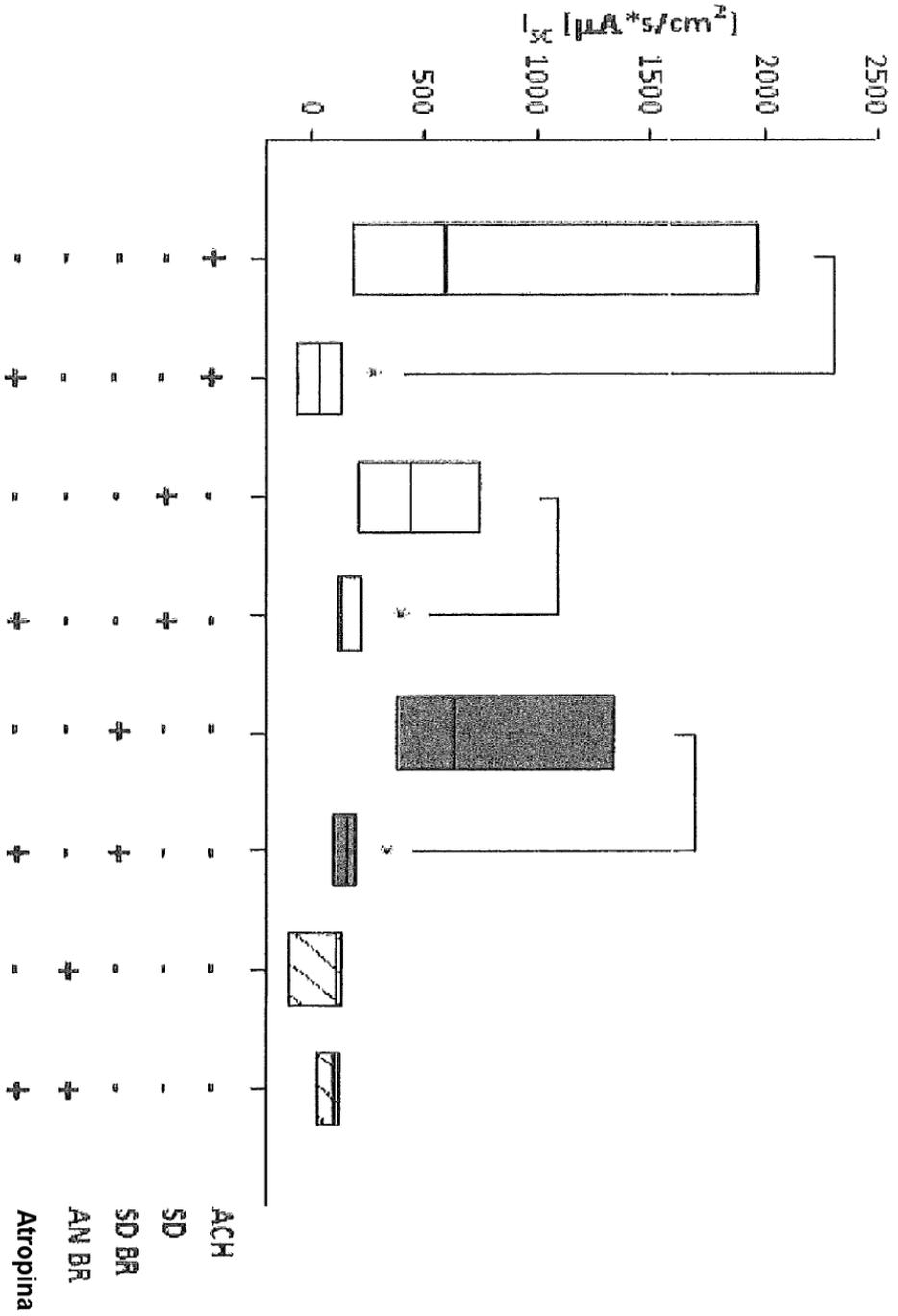


Figura 5 (continuación)

B

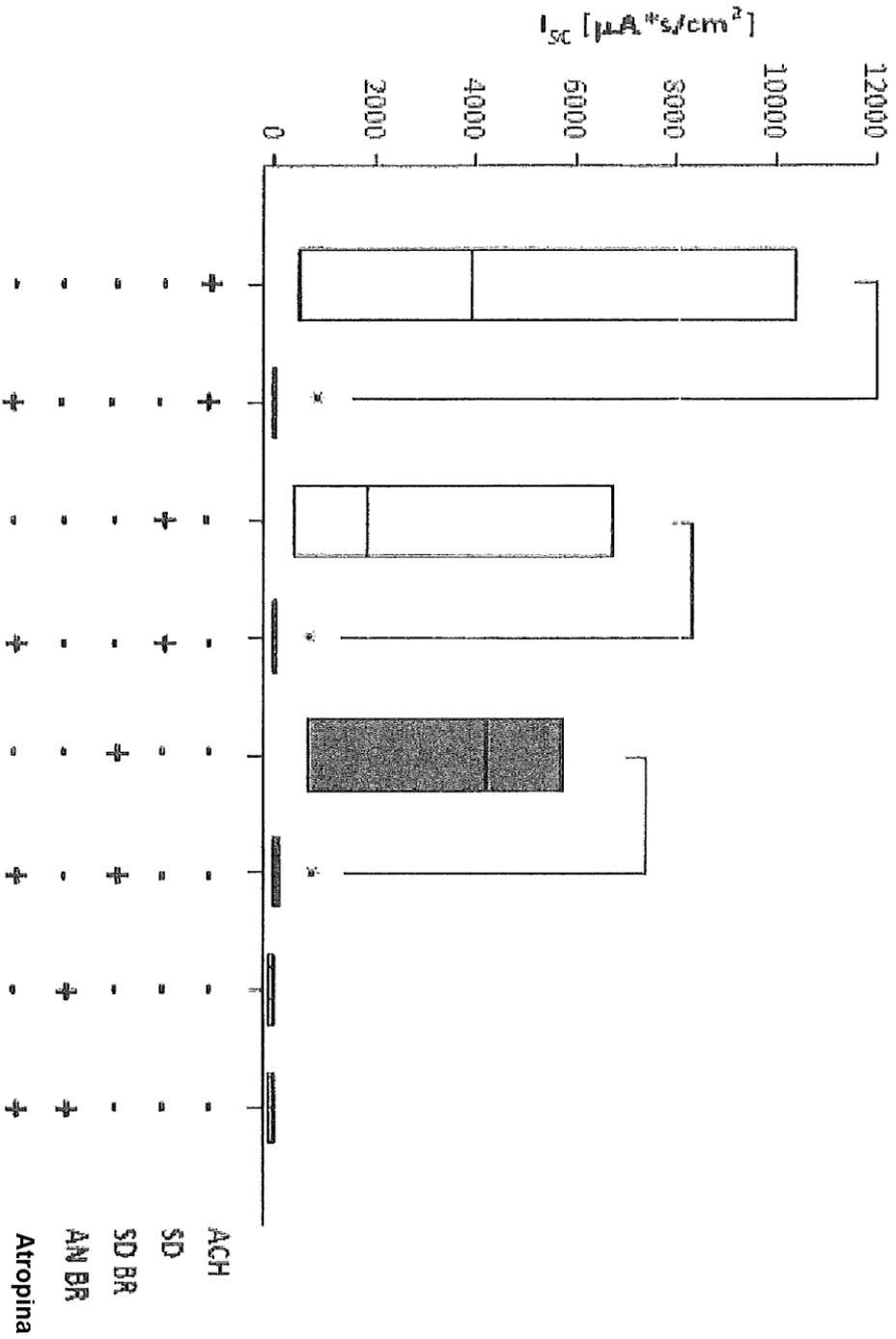


Figura 6

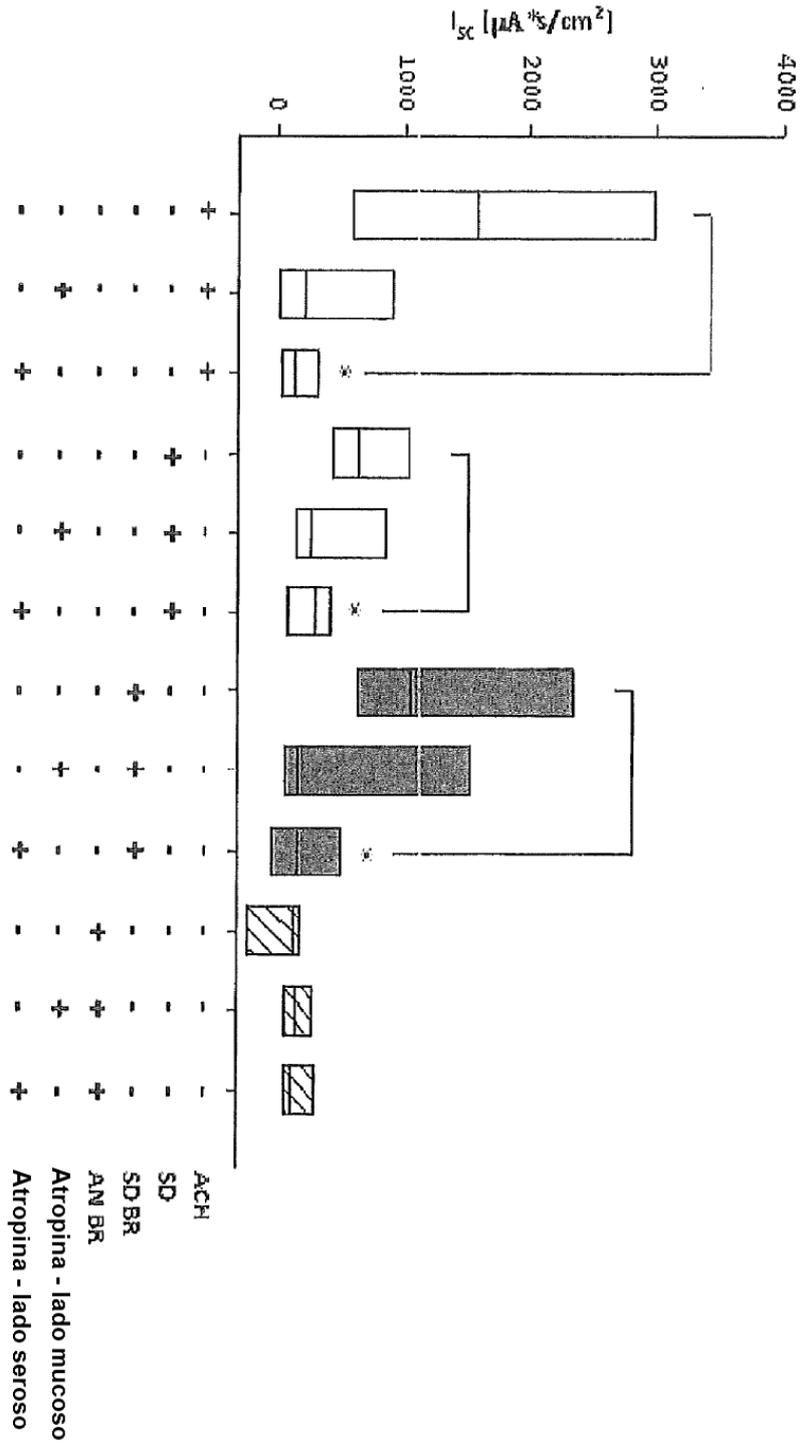


Figura 7

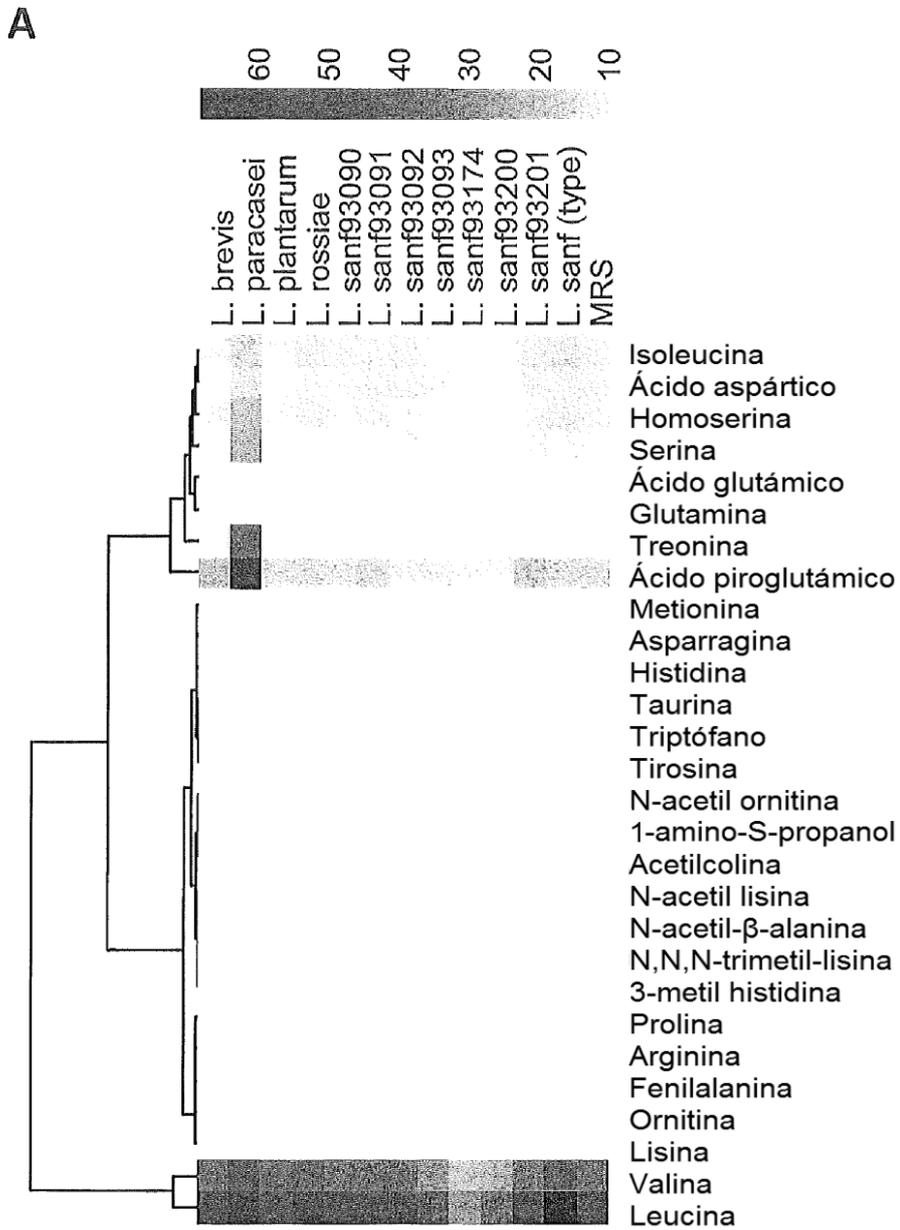


Figura 7 (continuación)

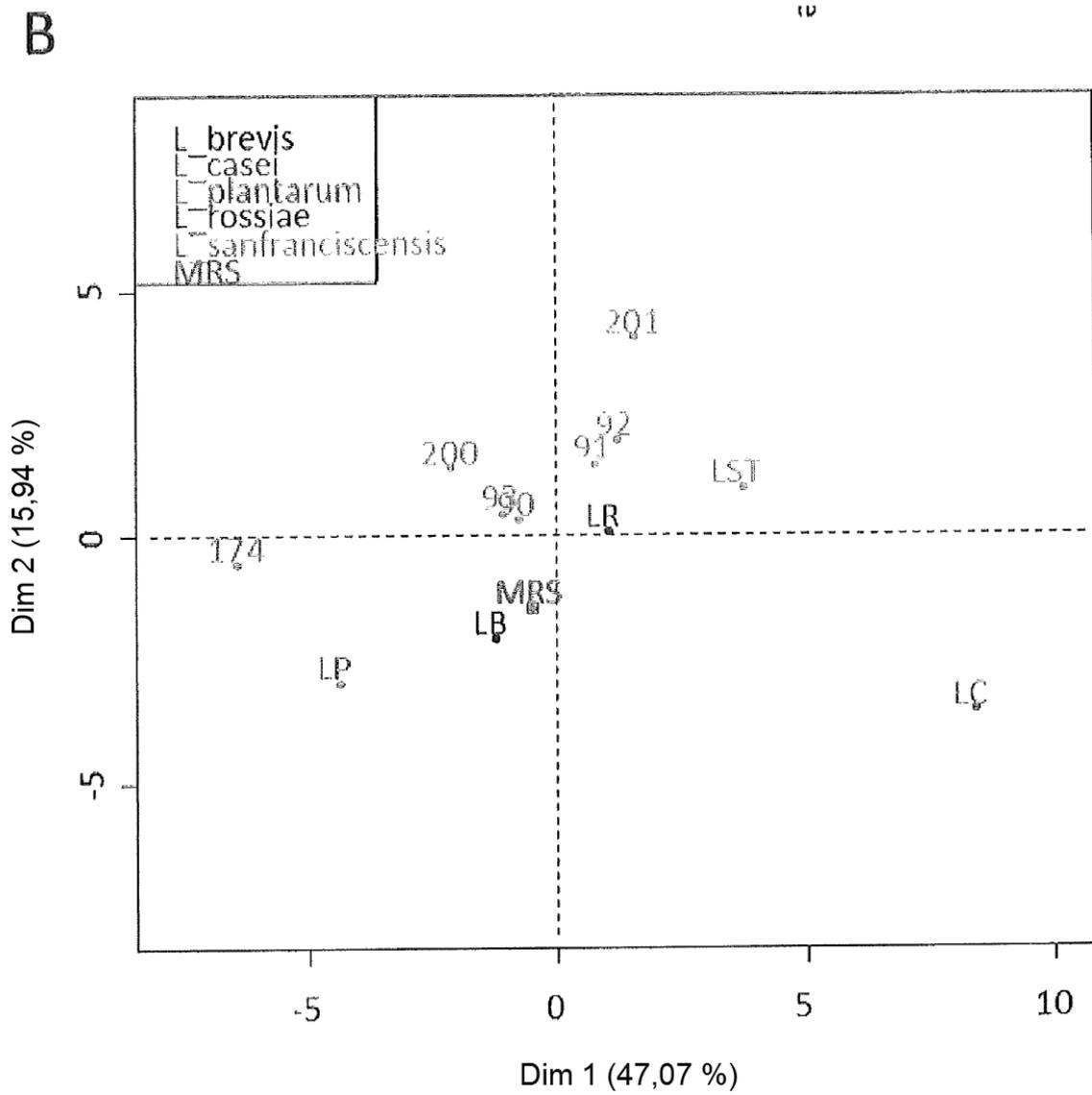


Figura 7 (continuación)

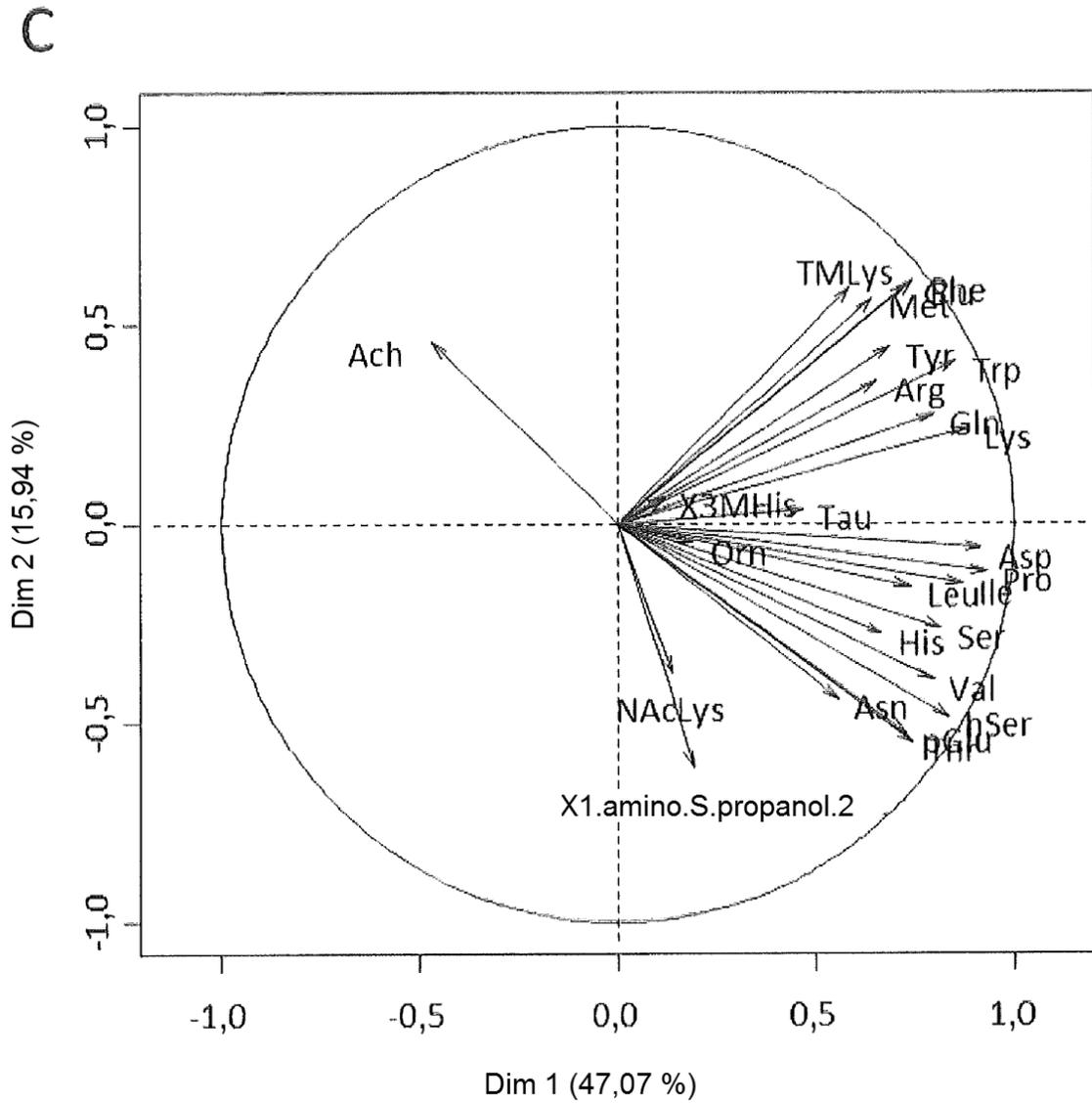


Figura 8

A

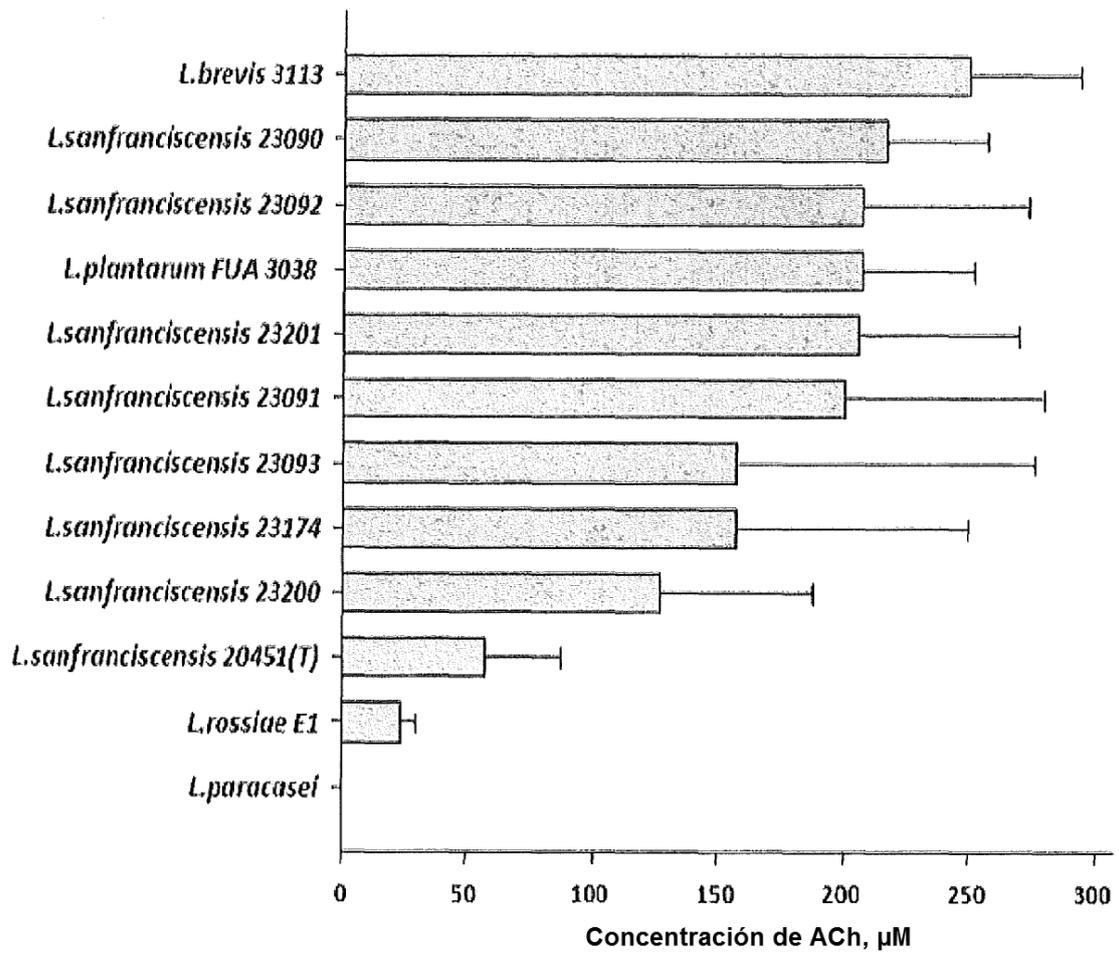


Figura 8 (continuación)

B

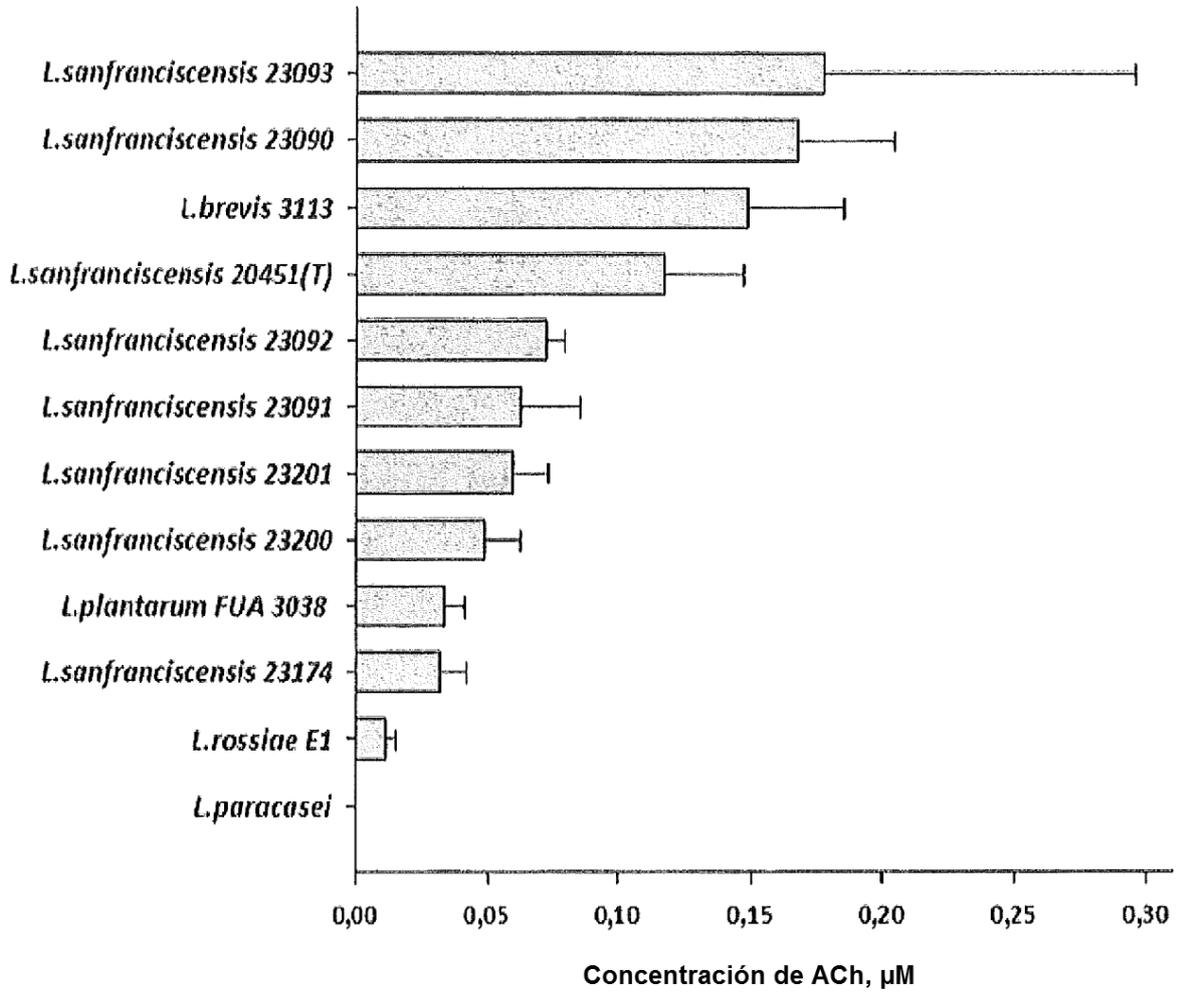


Figura 9

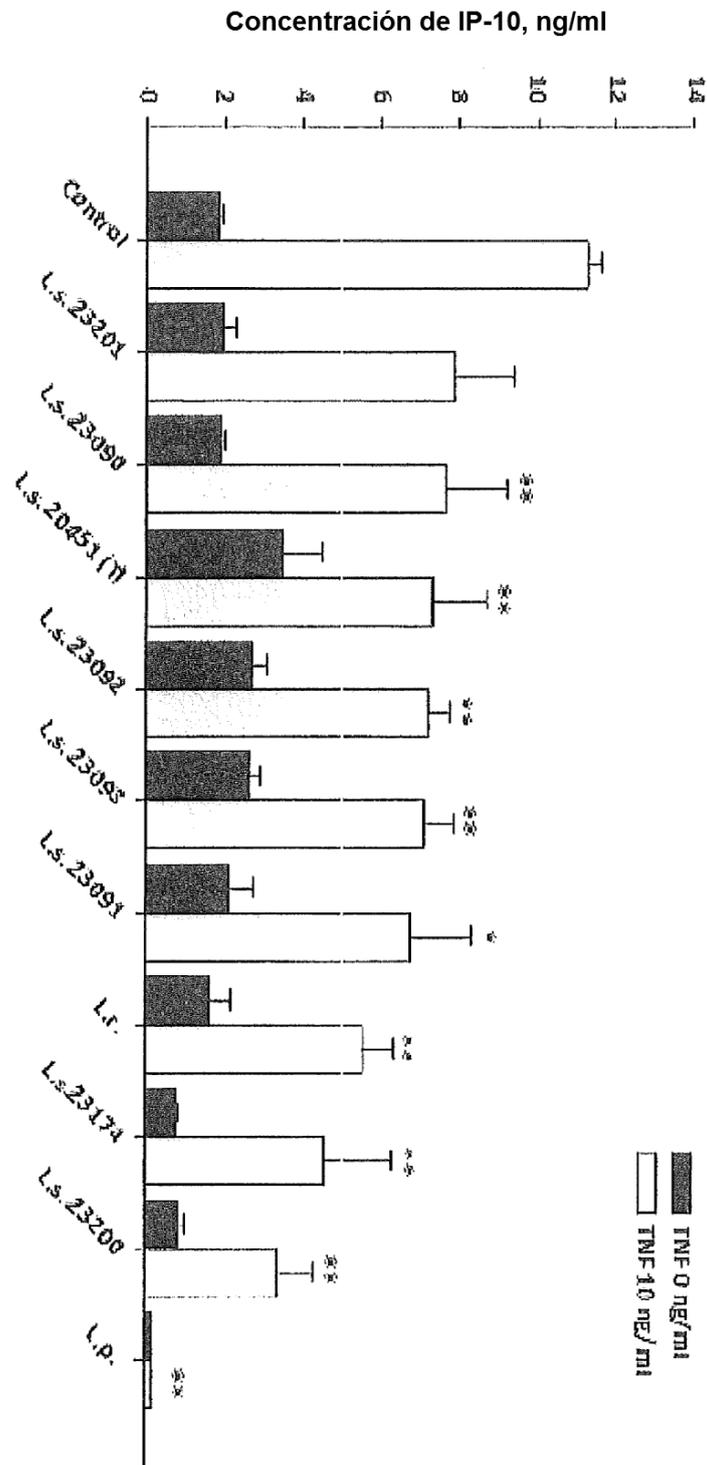


Figura 10

