

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 274**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011 E 14173452 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2857027**

54 Título: **Cepas probióticas para usar en la mejora del sistema nervioso entérico**

30 Prioridad:

28.05.2010 WO PCT/IB2010/001534

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

24.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LEGRAIN-RASPAUD, SOPHIE;
GROMPONE, GIANFRANCO;
CAPRONNIER, SANDRINE;
CHAMBAUD, ISABELLE;
SMOKVINA, TAMARA;
DEGIVRY, MARIE-CHRISTINE;
LESIC, BILIANA y
NEUNLIST, MICHEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 744 274 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 usar en la mejora del sistema nervioso entérico

Campo

5 La presente invención se refiere a composiciones que comprenden cepas de bacterias del ácido láctico para su uso en la modificación del sistema nervioso entérico. Dichas composiciones son especialmente adecuadas para tratar y/o prevenir trastornos intestinales tales como estreñimiento y/o enfermedad del intestino irritable.

Antecedentes

10 El síndrome del intestino irritable (SII) o colon espástico es un trastorno intestinal funcional caracterizado por dolor abdominal crónico, incomodidad, hinchazón y alteración de los hábitos intestinales en ausencia de cualquier causa orgánica detectable. En algunos casos, se informó de una inflamación intestinal de grado bajo. La diarrea o el estreñimiento pueden predominar o se pueden alternar (clasificados como SII-D, SII-C respectivamente). El SII puede comenzar después de una infección (postinfeccioso, SII-PI), un suceso vital estresante o comienzo de la madurez sin ningún otro indicador médico. En el SII, Las pruebas clínicas rutinarias no producen anomalías, aunque los intestinos pueden ser más sensibles a determinados estímulos, tales como la prueba de insuflación de globo.

15 El SII es una afección muy habitual que afecta a aproximadamente el 15 % de la población en cualquier momento. Hay aproximadamente el doble de mujeres que de hombres con esta afección. El SII es una fuente de dolor crónico, fatiga y otros síntomas, y aumenta los costes médicos del paciente, y contribuye al absentismo laboral. Los investigadores han informado de que la alta prevalencia del SII, junto con el aumento de los costes produce una enfermedad con un alto coste social. También se considera una enfermedad crónica y puede afectar drásticamente a la calidad de vida del enfermo.

20 Una teoría principal sobre la causa del SII lo relaciona con el sistema nervioso entérico (SNE). El sistema nervioso entérico (SNE) es una subdivisión del sistema nervioso periférico (SNP) que controla directamente las funciones gastrointestinales (GI) y está incluido en el revestimiento del sistema gastrointestinal. Incluye neuronas eferentes, neuronas aferentes e interneuronas. La función estructural y fisiológica del SNE es realizada por células gliales (astrocitos). El SNE está organizado en dos plexos principales con papeles funcionales específicos.

El plexo mientérico, localizado entre el músculo longitudinal y el circular, contiene neuronas implicadas principalmente en el control de la movilidad intestinal. A través de los músculos intestinales, las neuronas eferentes o motoras controlan el peristaltismo y la agitación del contenido intestinal. Las neuronas motoras que controlan la movilidad se componen de dos clases principales:

30 - neuronas excitadoras mientéricas que liberan acetilcolina (conocidas como neuronas inmunorreactivas a la colina acetiltransferasa ("ChAT-IR" o "ChAT" o "neuronas ChAT" o "nervios ChAT") y/o sustancia P (SP) para las contracciones, y

- neuronas inhibitoras mientéricas que liberan óxido nítrico (identificadas como neuronas de sintasa de óxido nítrico (NOS-IR)) y/o péptido intestinal vasoactivo (VIP) para la relajación.

35 La colina acetiltransferasa EC 2.3.1.6 es una enzima que se sintetiza dentro del cuerpo de una neurona y se transfiere al terminal nervioso. El papel de ChAT es unir Acetil-CoA a colina, lo que da como resultado la formación del neurotransmisor acetilcolina. Experimentalmente, el efecto sobre la producción de acetilcolina se extrapola a partir de la determinación del número de neuronas ChAT, normalmente un aumento en el número de nervios ChAT es indicativo de un aumento de la acetilcolina.

40 El plexo submucoso, localizado entre el músculo circular y la mucosa, contiene neuronas implicadas principalmente en el control de las funciones de la barrera epitelial intestinal (BEI), tales como la permeabilidad paracelular. En particular, la activación de neuronas entéricas en el plexo submucoso reduce la permeabilidad paracelular, mediante la liberación de VIP, mientras que la acetilcolina (Ach) aumenta la permeabilidad paracelular, estableciendo la base de un 'ajuste' fino de la permeabilidad de BEI por parte del SNE. Por tanto, con respecto al control neuronal de la permeabilidad paracelular, el aumento de la liberación de VIP por las neuronas submucosas aumenta la integridad de la BEI, mientras que el aumento de las neuronas ChAT del plexo submucoso reduce la resistencia de la BEI.

Aunque actualmente no hay cura para el SII, existen tratamientos que intentan aliviar los síntomas, incluyendo ajustes en la dieta, medicación e intervenciones psicológicas.

50 Se ha señalado que los probióticos, en particular cepas de bacterias del ácido láctico, son beneficiosos en el tratamiento y/o la prevención del SII. Son ejemplos de dichas descripciones los documentos WO 2007/036230, WO 03/010297, WO 2009/080800, Bixquert Jimenez M., Revista Española de Enfermedades Digestivas, vol. 101 n.º 8, agosto de 2009, Parkes GC *et al.*, Proceedings of the nutrition society, vol. 69 n.º 2, mayo de 2010 y Moayyedi P. *et al.*, Gut, British Medical Association, vol. 59, n.º 3, marzo de 2010. Sin embargo, las cepas bacterianas se seleccionan por su efecto en el sistema inmunitario, en la permeabilidad intestinal o en la microbiota intestinal y no por su efecto

en la mejora de la función del SNE. El documento WO 2008/064489 describe el uso de probióticos para bloquear una corriente de potasio dependiente de calcio de conductancia intermedia que da como resultado un efecto antiinflamatorio. El documento WO 2007/132359 describe el uso de *Lactobacillus* y un agonista del receptor cannabinoide y/o un antagonista del receptor opioide en relación con la percepción del dolor. El documento WO 2006/032542 describe el uso de *Lactobacillus* con fines analgésicos. Kamm *et al.*, 2004, Neurogastrointest. Motil 16: 53-60 describió efectos de *S. boulardii* en la reducción de la calbindina-28 k (CALB) pero no en otros marcadores neuronales del yeyuno de cerdo. Metugriachuk *et al.*, 2006, Rejuvenation Res. 9: 342-345 describen que una preparación simbiótica sobre la movilidad del intestino delgado y grueso en ratas Wistar viejas aumentó significativamente la actividad mioeléctrica del intestino delgado y el colon, una expresión aumentada de ARNm de VIP, pero sin efecto significativo en la concentración de VIP.

Thibault H. *et al.*, Journal of pediatric gastroenterology and nutrition, vol. 39 n.º 2, 1 de agosto de 2004 describe los efectos del consumo a largo plazo de fórmula infantil fermentada sobre la diarrea aguda en bebés sanos.

Por lo tanto, se necesita más investigación sobre cepas individuales de bacterias probióticas con un efecto beneficioso sobre el SNE para su uso en el SII, estreñimiento y/u otros trastornos.

15 **Compendio de la invención**

Los inventores emplearon un nuevo sistema modelo para explorar y seleccionar cepas de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias que tienen un efecto mejorado sobre el sistema nervioso entérico (SNE). Este modelo contiene una (mono)capa de células epiteliales intestinales de carcinoma de colon humano y, en el lado basolateral de la monocapa, una mezcla de un cultivo primario de células del sistema nervioso entérico que incluye neuronas del plexo mientérico y submucoso. Usando este modelo los efectos de los componentes de calidad alimentaria, en particular cepas de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias, en el SNE podrían evaluarse midiendo los efectos de la adición apical o luminal de estos componentes en la expresión del péptido vaso-intestinal (VIP) y/o los nervios liberadores de ChAT en el lado basolateral.

Por lo tanto, este modelo permitió detectar y seleccionar nuevas cepas de bacterias del ácido láctico y bifidobacterias para su uso en la mejora de la función del sistema nervioso entérico. Dichas cepas mejoran la movilidad intestinal y el peristaltismo. Con algunas cepas, el tiempo de tránsito intestinal puede reducirse, lo que puede abordar algunas afecciones tales como el estreñimiento. Con algunas cepas, se puede aumentar el tiempo de tránsito intestinal, lo que puede abordar algunas afecciones tales como la diarrea. Las cepas de aumento de VIP también mejoran la integridad de la barrera epitelial intestinal. Dichas cepas son particularmente útiles y más eficaces que las cepas existentes en la prevención y/o el tratamiento del SII y/o el estreñimiento y otros trastornos asociados con una función reducida del SNE.

El aumento del fenotipo colinérgico, en particular la expresión de las neuronas ChAT, es de interés terapéutico en las patologías del tracto gastrointestinal asociadas con la inhibición del tránsito colónico. El uso de bacterias del ácido láctico o bifidobacterias seleccionadas para tener un efecto creciente en la mejora de la expresión colinérgica, es decir, ChAT, en neuronas es de interés terapéutico para pacientes con estreñimiento y pacientes que padecen SII-C. Por lo tanto, un grupo de cepas de bacterias del ácido láctico o bifidobacterias de la presente invención aumenta provechosamente el número de nervios ChAT, lo que es indicativo de un efecto mejorado en la movilidad intestinal, y especialmente es beneficioso para pacientes con SII, en particular pacientes con SII-C y pacientes que padecen estreñimiento. Este grupo se conoce como grupo B). La buena movilidad requiere una gran cantidad de nervios ChAT, que son responsables de la contracción y tienen un efecto procinético. En algunas realizaciones interesantes para este grupo, los niveles de TEER no se reducen, ya que la función de BEI y la capacidad para relajar los músculos preferiblemente no se ven afectadas. El subgrupo según estas realizaciones se conoce como grupo B3).

El aumento de VIP mejora beneficiosamente la relajación de los músculos del tracto GI y mejora la BEI, lo que es beneficioso para pacientes que padecen SII o enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y también para personas mayores, bebés y personas obesas. Para dichos sujetos, una buena función de BEI es mejor, si no esencial. Aunque los pacientes que padecen SII o EII tienen una secreción excesiva de neuropéptidos tales como VIP, se supone que esta es una respuesta adaptativa del SNE para controlar la inflamación intestinal, para restablecer las funciones de barrera intestinal y para aumentar la neuroprotección. Un grupo de cepas de bacterias productoras de ácido láctico, en particular bifidobacterias, de la presente invención aumenta provechosamente VIP. Este grupo se conoce como grupo A). En una realización, el nivel de ChAT no aumenta. El grupo según esta realización se conoce como grupo A3). Por consiguiente, el nivel de ChAT puede permanecer sustancialmente sin cambios o puede disminuir.

Se han depositado todas las cepas bacterianas mencionadas en el presente documento, según el Tratado de Budapest, ante la CNCM ("Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos", 25 rue du Docteur Roux, París) como una autoridad internacional de depósito.

55 Son cepas que se descubrió con el método de exploración que pertenecían al grupo B) DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010). Son cepas que pertenecen al grupo A) DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_0032 (CNCM I- 4321 presentada el 19 de mayo de 2010),

DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) y DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010). La cepa DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) se ha descrito en la solicitud internacional WO 02/02800 y la cepa DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) se ha descrito en la solicitud internacional WO 01/01785.

5 El alcance de la invención está definido por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se describen composiciones que comprenden al menos una de estas cepas seleccionadas. Se prefiere una composición que comprende una mezcla de al menos una cepa que pertenece al grupo B) y al menos una cepa que pertenece al grupo A). Dicha mezcla tendrá provechosamente un efecto mejorado sobre la movilidad al mejorar tanto las contracciones como las relajaciones y, además, tendrá un efecto ventajoso sobre la función de BEI.

10 Por tanto, según un aspecto, la invención se refiere a una composición como se indica en la reivindicación 1.

Se describe en el presente documento una composición que comprende al menos una cepa de bacterias, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias, para su uso en:

A) aumento de los niveles de péptido intestinal vasoactivo (VIP) del sistema nervioso entérico, o

15 B) aumento de los niveles de neuronas inmunorreactivas a colina acetil transferasa (ChAT) del sistema nervioso entérico, o

C) reducción de los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico.

También se describe una composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3],

20 - DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3],

- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3],

- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3],

- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3], y

- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3],

25 para su uso en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferiblemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de movilidad intestinal, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C,

30 - tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o

- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, bebés o personas obesas.

Según un aspecto, la invención se refiere a una composición con se indica en la reivindicación 8.

La invención también se refiere a una composición como se indica en la reivindicación 21.

35 Se describe una composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3],

- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3],

- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3],

40 - DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3],

- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3], y

- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3],

para su uso en la administración a sujetos que padecen un trastorno seleccionado del grupo que consiste en:

- estreñimiento, SII-C,
- diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI, EII,
- SII, y

5 - trastornos encontrados en personas mayores, bebés o personas obesas.

Según un aspecto, la invención se refiere a una composición como se ha mencionado anteriormente para su uso en la mejora de la movilidad gastrointestinal, mejora del peristaltismo intestinal y/o reducción de la permeabilidad intestinal.

Se describen nuevas cepas de bacterias seleccionadas del grupo que consiste en:

- 10 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3],
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3],
- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3], y
- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3].

Se describen composiciones que comprenden las nuevas cepas.

15 Se describe una composición que comprende:

- al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias que B) aumenta los niveles de ChAT en el sistema nervioso entérico, y

- al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias que A) aumenta los niveles de péptido intestinal vaso-activo (VIP) en el sistema nervioso entérico.

20 Según un aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar cepas de bacterias, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) Organizar un cocultivo de células epiteliales intestinales y células neuronales entéricas, en donde dichas células epiteliales intestinales están presentes como una monocapa y en donde dichas células neuronales entéricas están presentes en el lado basolateral de la monocapa,

25 b) Añadir cepas de bacterias al lado apical o luminal de la monocapa de células epiteliales intestinales, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 4 a 400 células bacterianas por cada célula epitelial,

c) Incubar el cocultivo con la cepa de bacterias del ácido láctico,

d) Preferiblemente aislar las células neuronales,

30 e) Medir la cantidad de VIP, ChAT, sustancia P, nervios de óxido de nitrógeno, ATP y/o péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisario (PACAP) producido por las células neuronales y, opcionalmente, adicionalmente la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales.

En este método, la cepa de bacterias pertenece preferiblemente al grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias.

Descripción detallada

Definiciones

35 En la presente solicitud, se pretende que el uso de un compuesto o una composición abarque el uso en sí mismo, opcionalmente con la intención relacionada, pero también cualquier comunicación asociada al compuesto o composición con consecuencias comerciales o legales, por ejemplo publicidad, instrucciones o recomendaciones en el envase de las composiciones, instrucciones o recomendaciones en soporte comercial tal como folletos, panfletos, carteles, documentación presentada en apoyo de registros reguladores con fines de seguridad, fines de eficacia o para protección del consumidor, por ejemplo en administraciones tales como EFSA en Europa.

40 En la presente solicitud, los grupos de cepas se refieren a cepas que presentan una propiedad o un conjunto de propiedades específico. Por tanto, una cepa específica puede pertenecer a varios grupos. En la presente solicitud, el término "o" no es exclusivo.

45 En la presente solicitud, una propiedad tal como VIP y/o ChAT se considera sustancialmente sin cambios en comparación con un control si la variación no supera el 10 %, preferiblemente el 1 % en comparación con el control.

Realizaciones preferidas

En realizaciones preferidas, la composición es para su uso en:

A3) aumento de VIP, siempre que no se aumente ChAT, o

5 B3) aumento de ChAT, siempre que no se aumente VIP, no estando la resistencia eléctrica (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales reducida o

C3) reducción de ChAT, siempre que no se reduzca VIP, o

C2) reducción de ChAT y reducción de VIP.

Por ejemplo, la composición de la invención se puede usar en:

10 - tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferiblemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de movilidad intestinal, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o

15 - tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, bebés y personas obesas.

En realizaciones especialmente preferidas, las composiciones pueden:

A) aumentar los niveles de VIP del sistema nervioso entérico y usarse en el tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferiblemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de movilidad intestinal, o

20 B) aumentar los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico y usarse en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C, o

C) reducir los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico y usarse en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, SII-D, SII-PI, EII.

La cepa de bacterias se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) [A] - A3]],

25 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],

- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3]],

- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],

- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]],

- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]], y

30 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3]].

En una realización, la cepa de bacterias se selecciona del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],

- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3]], y

- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],

35 y la composición es para su uso en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o

- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, bebés o personas obesas.

En una realización, la cepa de bacterias se selecciona del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]],

- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]], y
- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3]],

y la composición para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C.

5 En una realización, la cepa de bacterias se selecciona del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],
- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3]], y
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],

y la composición es para su uso en:

10 A) aumento de los niveles de péptido intestinal vasoactivo (VIP) del sistema nervioso entérico, preferiblemente para su uso en A3) aumento de VIP, siempre que no se aumente ChAT.

En una realización particular de esta realización, la composición es para su uso en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, bebés o personas obesas.

15 En una realización, la cepa de bacterias se selecciona del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]],
- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]], y

- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3]], y la composición es para su uso en:

20 B) aumento de los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico, preferiblemente B3) aumento de ChAT, siempre que no se aumente VIP.

En una realización particular de esta realización, la composición es para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C.

Más detalles de las cepas de bacterias

25 Como se ha mencionado anteriormente, la composición comprende al menos una o dos cepas específicas de bacterias, preferiblemente bacterias del ácido láctico. Se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en el género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Se encontró que dicha cepa específica de bacterias es capaz de afectar a los niveles de VIP y/o afectar a los niveles de nervios ChAT en un modelo de cocultivo que representa la interacción entre el intestino y el SNE.

30 Un modelo de cocultivo, como se describe en más detalle a continuación, se usó para seleccionar *in vitro* cepas de bacterias del ácido láctico o bifidobacterias con estas propiedades. Se exploraron 102 cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium*.

35 Las cepas del grupo B) con mayor efecto sobre ChAT normalmente mejorarán la movilidad intestinal. Las cepas del grupo B3) con mayor efecto sobre ChAT, excluyendo cepas en donde VIP no aumenta (es decir, VIP no cambia sustancialmente o VIP se reduce) representan una realización preferida específica. Las cepas de estos grupos son normalmente beneficiosas para el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C. Esto podría ser de interés particular adicional para el tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, que con frecuencia pueden padecer estreñimiento. Con respecto a la movilidad creciente, se favorecerían las cepas que aumenten la expresión de ChAT. Esta propiedad parece ser muy poco habitual. De manera interesante, solo se encontraron tres cepas que aumentarían estadísticamente ChAT. Estas se conocen como cepas del grupo B) o del grupo B3). Las cepas del grupo B) o del grupo B3) comprenden las cepas

40 DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010), DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010). Dichas cepas mejoran beneficiosamente la movilidad, especialmente contracciones. Se prefiere que la resistencia eléctrica (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales no se reduzca. Dicha propiedad puede ser indicativa de una función de barrera

45 adecuada. La cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) redujo significativamente los niveles de VIP, mientras que las otras dos cepas no tuvieron un efecto significativo en los niveles de VIP. Ya que una reducción en VIP puede tener un efecto adverso en la BEI, se examinó con un modelo *in vitro* con una monocapa de células epiteliales intestinales si la incubación de esta cepa daba como resultado una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER). Esto resultó no ser el caso, lo que indica que la función de BEI no está alterada.

Con respecto a la relajación de los músculos y el refuerzo de la función de BEI, que es beneficioso en pacientes con SII y EII, se favorecerían las cepas que aumenten la expresión de VIP (que tendrían además efectos antiinflamatorios). Dichas cepas se conocen como cepas del grupo A). En una realización preferida, las cepas del grupo A) no aumentan la expresión de ChAT (es decir, ChAT no cambia sustancialmente o ChAT se reduce). Dichas cepas se conocen como cepas del grupo A3). Las cepas de estos grupos son normalmente beneficiosas para el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o para el tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, bebés o personas obesas. Las cepas del grupo A) o del grupo A3) comprenden las cepas DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010), DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999), DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010). Es interesante observar que todas las cepas que tienen esta propiedad son bifidobacterias, excepto una: DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010). Asimismo, utilizando otro modelo *in vitro* con una monocapa T84 y la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), se descubrió que especialmente las cepas DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999), DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) del grupo A) o A3) tenían un efecto protector sobre la BEI en presencia de LPS. Por lo tanto, estas cepas particulares son especialmente preferidas.

Según una realización, las cepas permiten reducir los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico. El grupo correspondiente de cepas se conoce como grupo C). En una realización particular, las cepas permiten reducir ChAT, siempre que no se reduzca VIP (es decir, VIP no cambia sustancialmente o VIP aumenta). Este grupo se conoce como grupo C3). En una realización particular, las cepas permiten reducir ChAT con reducción de VIP. Estas cepas se conocen como grupo C2). Las cepas del grupo C3) son normalmente beneficiosas para el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, SII-D. Esto podría ser de interés particular adicional para el tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, que con frecuencia pueden padecer diarrea. Las cepas del grupo C2) son normalmente beneficiosas para el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, SII-D, SII-PI y EII. Esto podría ser de interés particular adicional para el tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores que con frecuencia pueden padecer dichas afecciones, especialmente diarrea.

La presente invención también abarca el uso de las cepas mencionadas anteriormente, pero también cepas mutantes o cepas genéticamente transformadas derivadas de una cualquiera de las cepas parentales que todavía tienen actividad en VIP y que afectan a los nervios ChAT. Estas cepas mutantes o transformadas genéticamente pueden ser cepas en donde uno o más genes endógenos de la cepa original se han mutado, por ejemplo, para modificar algunas de sus propiedades metabólicas (p. ej., su capacidad para fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia al transporte en el tracto gastrointestinal, su post-acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa parental por uno o más genes de interés, por ejemplo, para proporcionar a dicha cepa características fisiológicas adicionales o para permitirle expresar proteínas de interés terapéutico o vacunal que se desee administrar a través de dichas cepas.

Preferiblemente se usa una mezcla de al menos una cepa que pertenece al grupo B), preferiblemente grupo B3), y al menos una cepa que pertenece al grupo A), preferiblemente grupo A3). Dicha mezcla tendrá provechosamente un efecto mejorado en la movilidad, así como en BEI.

Modelo de cocultivo y ensayo de exploración

En una realización, la presente invención se refiere a un método para seleccionar cepas de bacterias del ácido láctico, comprendiendo dicho método las etapas de:

a) Usar un cocultivo de células epiteliales intestinales y células neuronales entéricas, en donde las células epiteliales intestinales están presentes como una monocapa y en donde las células neuronales entéricas están presentes en el lado basolateral de la monocapa,

b) Añadir bacterias del ácido láctico o el lado apical o luminal de la monocapa, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 4 a 400 células bacterianas por cada célula epitelial,

c) Incubar el cocultivo con la bacteria del ácido láctico,

d) Preferiblemente aislar las células neuronales, y

e) Medir la cantidad de al menos un neurotransmisor seleccionado del grupo que consiste en VIP, ChAT, sustancia P y óxido de nitrógeno, ATP, PACAP producido por las células neuronales y, opcionalmente, adicionalmente la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales.

De acuerdo con el reflejo peristáltico, el SNE contiene circuitos cableados que consisten en neuronas motoras excitadoras ascendentes que liberan acetilcolina y sustancia P, que contrae el músculo liso a través de receptores muscarínicos y de neuronas inhibitoras descendentes que liberan un cóctel de transmisores, como NO, ATP, VIP y PACAP, todos los cuales inhiben el músculo circular.

Cultivo celular

Se proporciona una forma adecuada de establecer el cocultivo con una monocapa de células epiteliales intestinales polarizadas en el ejemplo 1 y también se describe en J. Chevalier *et al.*, 2008, J. Physiol. 586 1963-1975.

5 Todos los cultivos de células epiteliales intestinales que forman monocapas son adecuados, tales como Caco-2, T84, HT29 y TC7. Preferiblemente se usan células T84.

Como células primarias del sistema nervioso entérico, preferiblemente se aíslan células de fetos de mamíferos no humanos, preferiblemente roedores, más preferiblemente ratas.

10 Preferiblemente, las cepas de bacterias ensayadas se cultivan hasta una fase exponencial tardía en un medio de cultivo adecuado y se lavan. Preferiblemente, las bacterias se añaden al lado apical del cocultivo en una cantidad de 4 a 400 bacterias / célula epitelial, más preferiblemente de 10 a 100 bacterias / célula epitelial, aún más preferiblemente de 30 a 50 bacterias / célula epitelial. Preferiblemente, como control, no se añaden bacterias. Preferiblemente, como control positivo se usa butirato 1 mM o KCl 40 mM.

Preferiblemente, la etapa de incubación se realiza a aproximadamente 37 °C. Preferiblemente, la etapa de incubación dura de 1 a 72 h, más preferiblemente de 2 a 36 h, aún más preferiblemente de 4 a 12 h.

15 Preferiblemente, después de la incubación conjunta, se retira el compartimento que contiene células epiteliales y bacterias y se incuban células neuronales primarias durante 12 a 48 h, más preferiblemente durante 20 a 28 h en una incubadora humidificada que contiene CO2 al 5 %.

20 Preferiblemente, la cantidad de nervios ChAT frente a nervios totales se mide usando tinción inmunohistoquímica, usando anti-enolasa específica de neurona (NSE) para contar el número total de neuronas y anti-colina acetil transferasa para contar los nervios ChAT.

Preferiblemente, VIP se determina mediante ELISA después de recoger las células neuronales y extraer las proteínas con la presencia de un cóctel inhibidor de proteasa.

Más detalles acerca de las composiciones

25 En el presente documento se describen composiciones con cepas de bacterias que permiten los usos o propiedades mencionados anteriormente. También se describen en el presente documento composiciones que comprenden una o más de las siguientes cepas (que abarcan mutantes o cepas transformadas genéticamente derivadas de los mismos):

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],

- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3]],

- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3]],

30 - DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]],

- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3]], y

- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3]],

para su uso en:

35 - tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferiblemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de movilidad intestinal, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o

40 - tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, bebés o personas obesas,

normalmente cuando se administran *in vivo* a un sujeto.

45 En las composiciones de la invención, dichas cepas pueden usarse en forma de bacterias enteras que pueden estar vivas o no. Como alternativa, pueden usarse en forma de un lisado bacteriano o en forma de fracciones bacterianas; se pueden elegir las fracciones bacterianas adecuadas para este uso, por ejemplo, ensayando sus propiedades para aliviar los efectos sobre los niveles de VIP y los niveles de nervios ChAT del modelo de cocultivo descrito en la presente invención. Preferiblemente las células bacterianas están presentes como células vivas, viables.

Las composiciones de la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para su administración, en particular administración oral. Esto incluye, por ejemplo, sólidos, semisólidos, líquidos y polvos. Se prefieren en general composiciones líquidas para una administración más fácil, por ejemplo, como bebidas.

5 La composición puede comprender, por ejemplo, al menos 10^5 , preferiblemente al menos 1×10^6 , ufc por g de peso seco, de al menos una cepa de bacterias, preferiblemente de cepas de bacterias como se han mencionado anteriormente. Estas se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias.

10 Cuando las bacterias están en forma de bacterias vivas, la composición puede comprender normalmente de 10^5 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos 10^6 ufc, más preferiblemente al menos 10^7 ufc, aún más preferiblemente al menos 10^8 ufc, y lo más preferiblemente al menos 10^9 ufc por g de peso seco de la composición. En el caso de una composición líquida, esto corresponde en general a 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente al menos 10^5 ufc, más preferiblemente al menos 10^6 ufc, aún más preferiblemente al menos 10^7 ufc y lo más preferiblemente al menos 10^9 ufc/ml.

Son ejemplos de las composiciones de la invención composiciones nutricionales, incluyendo productos alimenticios y en particular productos lácteos.

15 La composición puede ser, por ejemplo, un producto lácteo, preferiblemente un producto lácteo fermentado. La administración en forma de un producto lácteo fermentado tiene la ventaja adicional de bajos niveles de lactosa, lo que es más beneficioso para el SII. Opcionalmente, pueden estar presentes otras cepas de bacterias del ácido láctico. El producto fermentado puede estar presente en forma de líquido o presente en forma de polvo seco obtenido mediante la deshidratación del líquido fermentado. Preferiblemente, el producto fermentado es un producto fresco. Un producto fresco, que no ha sufrido etapas de tratamiento térmico intenso, tiene la ventaja de que las cepas bacterianas presentes están en forma viva. Preferiblemente, el producto fermentado es un producto lácteo, más preferiblemente leche fermentada y/o suero fermentado. Preferiblemente, la composición nutricional es yogur o leche fermentada en forma sólida, agitada o bebible. Preferiblemente, el producto fermentado es un queso. Preferiblemente, el producto fermentado es un vegetal fermentado, tal como soja, cereales y/o frutas fermentados en forma sólida, agitada o bebible.

20 Preferiblemente, la presente composición nutricional es un alimento para bebés, una fórmula de leche infantil o una fórmula infantil de continuación. Preferiblemente, la presente composición es un producto nutracéutico o farmacéutico, un complemento nutricional o alimento médico.

30 Las composiciones nutricionales de la invención también incluyen complementos alimenticios y alimentos funcionales. Un "complemento alimenticio" designa un producto hecho de compuestos habitualmente utilizados en productos alimentarios, pero que está en forma de comprimidos, polvo, cápsulas, poción o cualquier otra forma no asociada habitualmente con alimentos y que tiene efectos beneficiosos para la salud. Un "alimento funcional" es un alimento que también tiene efectos beneficiosos para la salud de un individuo. En particular, los complementos alimenticios y los alimentos funcionales pueden tener un efecto fisiológico, protector o curativo, contra una enfermedad, por ejemplo, contra una enfermedad crónica.

35 Se prefiere una composición que comprenda una mezcla de al menos una cepa de bacteria del ácido láctico bifidobacteria que aumentan los nervios ChAT y al menos una cepa de bacteria del ácido láctico o bifidobacteria que aumenta los niveles VIP. Dicha mezcla tendrá provechosamente un efecto mejorado en la movilidad, así como en BEI.

40 Se prefiere una mezcla de al menos una cepa que pertenece al grupo B), preferiblemente B3), y al menos una cepa que pertenece al grupo A), preferiblemente A3). Dicha mezcla tendrá provechosamente un efecto mejorado en la movilidad, así como en BEI. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a composiciones que comprenden:

- al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)],

- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) [B] - B3)], y

45 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) [B] - B3)]; y

- al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) [A] - A3)],

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)],

- DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) [A] - A3)], y

50 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) [A] - A3)].

Las composiciones de la invención también pueden comprender una o más cepas adicionales de bacterias del ácido

láctico, probióticas o no, por ejemplo una o más cepas bacterianas seleccionadas de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y bifidobacterias. En particular, esta(s) otra(s) cepa(s) puede(n) incluir una o más cepas de *Streptococcus thermophilus* y/o una o más cepas de *Lactobacillus bulgaricus*.

Aplicación

5 En una realización, se descubrió que las cepas de la presente invención aumentan el número de nervios ChAT. La colina acetiltransferasa EC 2.3.1.6 es una enzima que se sintetiza dentro del cuerpo de una neurona y se transfiere al terminal nervioso. El papel de la colina acetiltransferasa es unir Acetil-CoA a colina, lo que da como resultado la formación del neurotransmisor acetilcolina. Se usa como marcador inmunohistoquímico para las neuronas motoras. Los efectos sobre el nervio ChAT dan como resultado contracciones mejoradas que dan como resultado un peristaltismo mejorado. Por lo tanto, las cepas y composiciones de la presente invención capaces de aumentar los nervios ChAT se administran provechosamente para mejorar el SNE, para mejorar o potenciar el peristaltismo, para mejorar la movilidad intestinal y/o para reducir el tiempo de tránsito gastrointestinal. El aumento del fenotipo colinérgico es de interés terapéutico en las patologías gastrointestinales asociadas con la inhibición del tránsito colónico. En particular, diversos estudios han mostrado que el tránsito lento podría estar asociado con una expresión reducida de las neuronas ChAT. En particular, (i) los pacientes con estreñimiento grave tienen en general una menor cantidad de nervios ChAT, (ii) la producción de ACh mientérica disminuyó significativamente tanto durante el transcurso de la infección como después de la infección (PI), (iii) durante el envejecimiento, se ha señalado una reducción de la proporción de neuronas colinérgicas.

20 En este contexto, el uso de cepas de bacterias, preferiblemente bacterias del ácido láctico o bifidobacterias para potenciar la expresión colinérgica en las neuronas, podría ser de interés terapéutico futuro para pacientes con estreñimiento grave y SII-C. Por lo tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran provechosamente a pacientes que padecen SII-C y/o estreñimiento. Son cepas más útiles las cepas del grupo B) o B3) mencionadas anteriormente.

25 En una realización particular, las cepas y composiciones de la presente invención son usadas por o para personas mayores. Las personas mayores en la presente invención se definen como seres humanos con una edad mayor de 65 años, preferiblemente mayor de 70 años, preferiblemente mayor de 75 años, preferiblemente mayor de 80 años, preferiblemente mayor de 85 años. Las personas mayores tienen normalmente un número reducido de neuronas ChAT en el sistema nervioso entérico localizado en el colon, lo más preferiblemente en el colon transversal. Por lo tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran provechosamente para tratar y/o prevenir el SII, preferiblemente SII-C, y/o estreñimiento para personas mayores. Son cepas capaces de aumentar los nervios ChAT el grupo B), tal como la cepa DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010). Preferiblemente, no reducen VIP, ya que VIP es necesario para una buena función de BEI y para la relajación del tracto gastrointestinal, otra parte importante de la movilidad del tracto gastrointestinal, tal como el peristaltismo. Las cepas que cumplieron este criterio fueron DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_116_0047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010). Sin embargo, la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) tampoco afectó negativamente a la función de BEI según lo determinado por los experimentos de TEER, ya que TEER no disminuyó.

40 En una realización, se descubrió que las cepas de la presente invención aumentan los niveles de VIP. Con respecto al sistema digestivo, VIP induce la relajación del músculo liso (esfínter esofágico inferior, estómago, vesícula biliar), estimula la secreción de agua en el jugo pancreático y la bilis y provoca la inhibición de la secreción de ácido gástrico y la absorción en la luz intestinal. Su papel en el intestino es estimular en gran medida la secreción de agua y electrolitos, además de dilatar el músculo liso intestinal, dilatar los vasos sanguíneos periféricos, estimular la secreción de bicarbonato pancreático e inhibir la secreción de ácido gástrico estimulada por gastrina. Estos efectos actúan juntos para aumentar la movilidad. Por lo tanto, este hallazgo es indicativo de que estas cepas tienen un efecto mejorado sobre la movilidad intestinal, en particular la parte de relajación de la movilidad. VIP también aumenta beneficiosamente la función de BEI. Por lo tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran provechosamente para mejorar el SNE, para mejorar o potenciar el peristaltismo, para reducir la permeabilidad, para mejorar la movilidad intestinal y/o para reducir el tiempo de tránsito gastrointestinal. Por lo tanto, las cepas y composiciones de la presente invención se administran provechosamente para su uso en pacientes que padecen:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferiblemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de movilidad intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII, o
- tratamiento y/o prevención de trastornos encontrados en personas mayores, bebés y personas obesas.

Son cepas más útiles las cepas del grupo A) o A3) mencionadas anteriormente.

Se pueden encontrar detalles o ventajas de la presente invención en los ejemplos no limitantes a continuación.

Ejemplos

EJEMPLO 1: EXPLORACIÓN DE PROBIÓTICOS EN UN MODELO DE COCULTIVO QUE IMPLICA CÉLULAS EPITELIALES Y CÉLULAS NEURONALES ENTERICAS

Cultivo celular

Se obtuvieron ratas gestantes Sprague-Dawley (CERJ, Le Genest St Isle, Francia y Janvier-Breeding Center, Bélgica) y se sacrificaron mediante una sobredosis de CO₂, seguido de corte de las arterias carótidas. Los embriones (35-45 por aislamiento de 3 ratas gestantes) se retiraron y se sacrificaron por decapitación. Los intestinos delgados de los embriones se extrajeron y se picaron de forma fina en HBSS (Sigma, Francia). Se recogieron fragmentos tisulares en 5 ml de medio (medio DMEM-F12 1:1) y se digirieron a 37 °C durante 15 minutos en tripsina al 0,1 % (Sigma). La reacción de tripsina se detuvo mediante la adición de 10 ml de medio que contenía suero de ternero fetal al 10 % y después se trató con DNasa I (0,01 %, Sigma) durante 10 min a 37 °C. Después de triturar con una pipeta de 10 ml, las células se centrifugaron a 750 rpm durante 10 min. Se contaron las células y después se sembraron a una densidad de $2,4 \times 10^5$ células/cm² en placas de 24 pocillos previamente recubiertas durante 6 h con una solución de gelatina (0,5 %, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril. Después de 24 h, el medio se reemplazó con un medio sin suero (DMEM-F12 1:1 que contenía 1 % de complemento de N-2 (Life technologies, Francia). Las células se mantuvieron en cultivo durante 14 días para obtener un cultivo primario del sistema nervioso entérico (SNE). La mitad del medio fue reemplazada cada dos días. A los 14 días, las células neuronales primarias estaban listas para el establecimiento del modelo de cocultivo.

La línea celular T84 (EATCC) se cultivó en DMEM-F12 (1:1, GIBCO) complementado con FBS termoinactivado al 10 % y penicilina 50 UI/ml y estreptomycin 50 µg/ml. Las células se sembraron en filtros Transwell® (Corning, NY EE.UU.) de 12 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/inserto y se cultivaron para obtener confluencia.

Un día después de que las células epiteliales alcanzaran la confluencia, los filtros Transwell® se transfirieron a las placas de 12 pocillos sembradas en el fondo con células nerviosas entéricas. Las células epiteliales y neuronales se cocultivaron en el medio para células epiteliales.

Cultivo de cepas de bacterias

Se cultivaron bacterias durante 16 horas en TGYH para bifidobacterias y lactobacilos, excepto para la cepa DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) que se cultivó en medio de MRS + cisteína, se lavó en PBS dos veces y se ajustó a $4 \cdot 10^8$ ufc/ml para añadir uniformemente el mismo volumen de suspensión bacteriana al filtro. Las cepas se añadieron en el compartimento del filtro a una MOI de 40 bacterias/célula epitelial. Como control, no se añadieron bacterias.

Después de 8 horas de incubación conjunta, se retiró el compartimento del filtro que contenía células epiteliales y bacterias y se incubaron células neuronales primarias durante 24 h en una incubadora humidificada que contenía CO₂ al 5 %. En los pocillos de control, las células neuronales se estimularon con butirato 1 mM y KCl 40 mM cuando se realizaron mediciones de ChAT y VIP, respectivamente.

Tinción inmunohistoquímica. Medición de los nervios ChAT

Después de la incubación, se realizó inmunohistoquímica para detectar poblaciones de células neuronales. Después de la fijación de células (en PBS 0,1 M que contenía paraformaldehído al 4 % durante 1 h a temperatura ambiente), las células se lavaron 3 veces en PBS, después se permeabilizaron durante 30 min en PBS/Na₃N que contenía Triton X-100 al 0,5 % y suero de caballo al 4 %. Anticuerpo primario: anti-enolasa específica de neurona (NSE) de conejo (1:2000; Biovalley, Francia) y anti-colina acetil transferasa de conejo se diluyeron en PBS/Na₃N, Triton X-100 al 0,5 % y suero de caballo al 4 % y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Después de la incubación con antisuero primario, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 3 h con IgG anti-conejo de burro conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:200 Immunotech, Francia) y 7-amino-4-metil-cumarina-3-acetato respectivamente. Las muestras se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Olympus 1X50 equipado con una cámara de video blanca (Mod. 4910, CoHu Inc, Alemania) conectada a un ordenador Macintosh a través de una tarjeta de captura de fotogramas (Scion Image, SL Microtest).

Mediciones de VIP:

Para la determinación de VIP, se recogieron células neuronales de las placas de 12 pocillos, las proteínas se extrajeron usando tampón de lisis RIPA (Millipore, Francia) que contenía cóctel inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics, Francia) y los niveles de VIP se midieron por ELISA (Bachem, Alemania).

Resultados

Se muestra la respuesta diferencial de neuronas entéricas primarias en marcadores de VIP y ChAT después de la interacción de algunas de las 102 cepas probióticas, incluyendo bacterias del ácido láctico y bifidobacterias, en la Tabla 1. Solo se muestran algunas cepas que pertenecen al grupo A3) o B3) o C3). Además, se menciona que se mostró que 26 cepas no tenían un efecto significativo sobre VIP y ChAT (incluyendo las cepas *Bifidobacterium longum* NCC 2705 (CNCM I-2618), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) y *Lactobacillus casei* Shirota), Se mostró que 11 cepas que pertenecían al grupo C2) reducían tanto VIP como ChAT (incluyendo la cepa *Bifidobacterium longum* WII de Alfa-Wass (LMG P-21586)), 10 cepas reducían VIP y no tuvieron ningún efecto sobre ChAT (incluyendo las cepas de referencia *Bifidobacterium infantis* UCC 3564, *Bifidobacterium longum* Bb536, *Bifidobacterium animalis* spp *lactis* Bb12 (DSM 15954) y *Bifidobacterium animalis* spp *lactis* Bi-07 (ATCC SD5220) y 41 cepas pertenecientes al grupo C3) reducían CHAT y no tenían ningún efecto en VIP, incluidas las cepas *Lactobacillus johnsonii* Lai (CNCM I-1225), *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) *Lactobacillus reuteri* SD 2122 (ATCC 55730)).

Tabla 1: Efecto de la incubación con bacterias del ácido láctico y bifidobacterias en los niveles de VIP y ChAT en un modelo de cocultivo con monocapa de células epiteliales y células del SNE primarias.

Grupo	Número DN de la especie (número de CNCM)	VIP			ChAT		
		Diferencia estimada* frente a control	valor de p	Media empírica	Diferencia estimada frente a control	valor de p	Media empírica
1	DN 154 0067 (CNCM I- 4320 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Bifidobacterium bifidum</i>	-0,0097	0,9	0,0790	0,2709	0,09	0,1796
1	DN 116 0047 (CNCM I- 4317 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-0,0389	0,7	0,0397	0,3151	0,10	0,2535
1	DN 119 0118 (CNCM I- 4279 presentada el 25 de febrero de 2010) <i>Lactobacillus acidophilus</i>	-0,1329	0,09	-0,2221	0,2847	0,02	0,2796
2	DN_173_010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000) <i>Bifidobacterium lactis</i>	0,2345	0,01	0,2001	-0,2615	0,05	-0,0825
2	DN 156 0032 (CNCM I- 4321 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Bifidobacterium breve</i>	0,2248	0,01	0,2020	-0,5450	0,00	-0,5723
2	DN 156 007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) <i>Bifidobacterium breve</i>	0,2715	0,02	0,3552	-0,3632	0,01	-0,1281
2	DN 121 0304 (CNCM I- 4318 presentada el 19 de mayo de 2010) <i>Lactobacillus plantarum</i>	0,5976	0,00	0,6813	-0,6269	0,00	-0,3918

* Los valores se proporcionan como una diferencia en comparación con el control, donde no se añadieron cepas bacterianas.

Aunque la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010) reduce los niveles de VIP, resultó con un modelo de TEER (Hirovani *et al*, 2008, *Yakugaku Zasshi Sep*; 128(9): 1363-8) que la incubación con la cepa durante 4 o 6 h no redujo significativamente los valores de TEER, incluso en presencia de daño frente a control. En resumen, las bacterias se cultivaron en TGYH. Las suspensiones de cultivo se lavaron con PBS. Posteriormente, las bacterias (100 ufc/célula) se añadieron al lado apical de las monocapas de células T84. Después de 2 h de incubación, se añadió LPS (L4516, - EPEC - 0127: B8) en el lado apical a 40 ng/ml o no se añadió. Después, tras 2 h y 4 h de incubación, el valor de TEER se midió para evaluar la función de barrera epitelial. Todos los experimentos se realizaron tres veces de forma independiente y por triplicado en presencia y en ausencia de LPS. El valor de T84 en t=0 se estableció en 100 %. En ausencia de LPS la TEER en T4 fue del 98,7 % y en T6 del 100,2 % con la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010); solo para T84 aún era del 100 %. En presencia de LPS, el control T84 en T4 fue 56,2 % comparado con t=0 y con la cepa DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de

2010) 47,9 %; En T6, el control T84 fue de 46,7 % y con la cepa DN_119_0118 (CNCM I- 4279 presentada el 25 de febrero de 2010) 52,2 %.

5 Usando este mismo modelo de TEER especialmente la cepa DN_173_010 (CNCM I- 2494 presentada el 20 de junio de 2000), DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999), DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010) y DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010), todas pertenecientes al grupo A3), mostraron buenos resultados sobre la función de barrera intestinal evaluada por TEER en presencia de LPS. Véase tabla 2.

Tabla 2: Resultados de TEER en presencia de LPS de bacterias seleccionadas que muestran los mejores resultados

Cepa		TEER T4/TEER T0 (%)		TEER T6/TEER T0 (%)	
		Significación	Media empírica	Significación	Media empírica
Control T84			56,20		46,76
DN 173 010 (CNCM I-2494 presentada el 20 de junio de 2000)	<i>B. lactis</i>	***	71,27	***	51,03
DN 156 007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999)	<i>B. breve</i>	***	70,70	***	55,87
DN 121 0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>L. plantarum</i>	***	65,84	***	64,37
DN 156 0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010)	<i>B. breve</i>	***	84,44	***	80,38

*** valor de p <0,05

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende al menos una cepa de bacterias, seleccionada del grupo que consiste en
- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010),
 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010),
 - 5 - DN_116_047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010),
 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), y
 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010),
- para su uso en:
- A) aumento de los niveles de péptido intestinal vasoactivo (VIP) del sistema nervioso entérico, o
 - 10 B) aumento de los niveles de neuronas inmunorreactivas a colina acetil transferasa (ChAT) del sistema nervioso entérico, o
 - C) reducción de los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico.
2. Composición para su uso según la reivindicación 1, para su uso en:
- A3) aumento de VIP, siempre que no se aumente ChAT, o
 - 15 B3) aumento de ChAT, siempre que no se aumente VIP, preferiblemente no estando la resistencia eléctrica (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales reducida o
 - C3) reducción de ChAT, siempre que no se reduzca VIP, o
 - C2) reducción de ChAT y reducción de VIP.
3. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha composición:
- 20 A) aumenta los niveles de VIP del sistema nervioso entérico y se usa en el tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferiblemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de movilidad intestinal, o
 - B) aumenta los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico y se usa en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C, o
 - 25 C) disminuye los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico y se usa en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, SII-D, SII-PI, EII.
4. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición:
- A3) aumenta el VIP siempre que no se aumente ChAT,
- y se usa en:
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII.
- 30 5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición:
- B3) aumenta ChAT, siempre que no se aumente VIP, preferiblemente no estando la resistencia eléctrica (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales reducida,
- y se usa en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C.
- 35 6. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición:
- C3) reduce ChAT, siempre que no se reduzca VIP,
- y se usa en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea y SII-C.
7. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha composición:
- C2) reduce ChAT y reduce VIP,
- 40 y se usa en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infecciones

intestinales, SII-D, SII-PI y EII.

8. Composición que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionadas del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010),
- 5 - DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010),
- DN_116_047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010),
- DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), y
- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010),

para su uso en:

- 10 - tratamiento y/o prevención de un trastorno intestinal, preferiblemente tratamiento y/o prevención de un trastorno de movilidad intestinal, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C, o
- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D, SII-PI y EII, o
- 15 - tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII.

9. Composición para su uso según la reivindicación 8, en donde la cepa de bacterias se selecciona del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010), y
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010),

20 para su uso en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII.

10. Composición para su uso según la reivindicación 8, en donde la cepa de bacterias se selecciona del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_116_047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010),
- 25 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), y
- DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010),

para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C.

11. Composición para su uso según la reivindicación 8, que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- 30 - DN_156_0032 (CNCM I-4321 presentada el 19 de mayo de 2010), y
- DN_121_0304 (CNCM I-4318 presentada el 19 de mayo de 2010),

para su uso en:

- 35 A) aumento de los niveles de péptido intestinal vasoactivo (VIP) del sistema nervioso entérico, preferiblemente para su uso en A3) aumento de VIP, siempre que no se aumente ChAT.

12. Composición para su uso según la reivindicación 11, para su uso en:

- tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII y EII.

13. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para su uso en el tratamiento y/o prevención de dichos trastornos encontrados en personas mayores, bebés o personas obesas.

- 40 14. Composición para su uso según la reivindicación 8, que comprende al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en las siguientes cepas:

- DN_116_047 (CNCM I-4317 presentada el 19 de mayo de 2010),
 - DN_154_0067 (CNCM I-4320 presentada el 19 de mayo de 2010), y
 - DN_119_0118 (CNCM I-4279 presentada el 25 de febrero de 2010),
- para su uso en:

- 5 B) aumento de los niveles de ChAT del sistema nervioso entérico, preferiblemente B3) aumento de ChAT, siempre que no se aumente VIP.
15. Composición según la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C.
- 10 16. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en la mejora de la movilidad gastrointestinal, mejora del peristaltismo intestinal y/o reducción de la permeabilidad intestinal.
17. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición es un producto lácteo, preferiblemente un producto lácteo fermentado.
- 15 18. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición comprende al menos 10^5 , preferiblemente al menos 1×10^6 , ufc de al menos una cepa de bacterias seleccionada del grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias por g de peso seco.
19. Método de selección de cepas de bacterias, comprendiendo dicho método las etapas de:
- a) Organizar un cocultivo de células epiteliales intestinales y células neuronales entéricas, en donde dichas células epiteliales intestinales están presentes como una monocapa y en donde dichas células neuronales entéricas están presentes en el lado basolateral de la monocapa,
- 20 b) Añadir cepas de bacterias al lado apical o luminal de la monocapa de células epiteliales intestinales, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 4 a 400 células bacterianas por cada célula epitelial,
- c) Incubar el cocultivo con la cepa de bacterias del ácido láctico,
- d) Preferiblemente aislar las células neuronales,
- 25 e) Medir la cantidad de VIP, ChAT, sustancia P, nervios de óxido de nitrógeno, PACAP y/o ATP producidos por las células neuronales y, opcionalmente, adicionalmente por la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de la capa de células epiteliales intestinales.
20. Método según la reivindicación 19, en donde la cepa de bacterias pertenece al grupo que consiste en lactobacilos y bifidobacterias.
- 30 21. Composición que comprende al menos una cepa DN_156_007 (CNCM I-2219 presentada el 31 de mayo de 1999) para su uso en:
- tratamiento y/o prevención de un trastorno de la movilidad intestinal, o
 - tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en estreñimiento y SII-C, o
 - tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en diarrea, infección intestinal, SII-D y SII-PI, o
- 35 - tratamiento y/o prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en SII.