

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 780 389**

51 Int. Cl.:

A23K 10/18 (2006.01)
A23K 20/163 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61K 35/745 (2015.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 33/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009** **E 18172784 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 3398446**

54 Título: **Composición comestible que comprende Bifidobacterium longum**

30 Prioridad:

15.04.2008 EP 08154550

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.08.2020

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

BERGONZELLI DEGONDA, GABRIELA;
ORNSTEIN, KURT y
CHERBUT, CHRISTINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 780 389 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

Composición comestible que comprende *Bifidobacterium longum*

5 La presente revelación, se refiere, de una forma general, a composiciones comestibles que comprenden probióticos. De una forma más particular, la presente invención, se refiere a composiciones comestibles que comprenden *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, y a su uso para aumentar la expresión del BDNF en el hipocampo (factor neurotrófico derivado del cerebro en el hipocampo – [BDNF, de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a brain-derived neurotrophic factor] -) y / o para tratar o prevenir la ansiedad.

10 Los trastornos de ansiedad, afectan a aproximadamente 40 millones de adultos estadounidenses de una edad de 18 años o superior. Estas cifras, representa, en promedio, un porcentaje de aprox. un 18 % de la población adulta. Un breve período de ansiedad puede ser causado, por ejemplo, por eventos estresantes tales como los consistentes en exámenes o en circunstancias las cuales se consideran como siendo ligeramente embarazosas. No
15 obstante, la ansiedad puede durar mucho más tiempo, tal como por lo menos medio año, y las condiciones de ansiedad pueden continuar volviéndose más severas y agobiantes, si éstas no se tratan. Los trastornos de ansiedad, también pueden acontecer conjuntamente con otras enfermedades mentales o físicas, incluyendo al abuso del alcohol o de sustancias. Los trastornos de ansiedad típicos, son el trastorno del pánico, el trastorno obsesivo compulsivo (OCD – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a obsessive-compulsive disorder] -), el
20 trastorno del estrés postraumático (PTSD – de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a Post-traumatic stress disorder), la fobia social (o trastorno de la ansiedad social), las fobias específicas y el trastorno de ansiedad generalizada (GAD – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a generalized anxiety disorder]-).

25 Hoy en día, se encuentran disponible algunas terapias para los trastornos relacionados con la ansiedad. De una forma general, los trastornos de ansiedad, se tratan mediante medicamentos tales como los antidepresivos, los fármacos contra la ansiedad o los betabloqueantes.

30 Los medicamentos, alteran la química del cerebro y, algunas veces, éstos tienen efectos secundarios graves. También pueden tener interacciones no deseables con medicamentos los cuales se tomen de una forma frecuente. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs - [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a selective serotonin reuptake inhibitors] -) alteran los niveles del neurotransmisor serotonina en el cerebro que fomentan la comunicación de las células cerebrales. Los SSRIs tienen menos efectos secundarios que los antiguos antidepresivos, pero, no obstante, algunas veces producen náuseas o nerviosismo leves, cuando las personas comienzan a tomarlos. Algunas personas, también experimentan una disfunción sexual con los SSRIs.

35 Los tricíclicos, como antidepresivos, provocan, algunas veces, mareos, somnolencia, boca seca y aumento de peso.

40 Los inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOis), son la clase más antigua de medicamentos antidepresivos. Las personas que toman MAOis, no pueden comer una variedad de productos alimenticios y de bebidas (incluyendo al queso y al vino tinto), los cuales contienen tiramina, o tomar ciertos medicamentos. Éstos también pueden interactuar con la cafeína. Los MAOis también pueden provocar confusión, alucinaciones, aumento de la sudoración, rigidez muscular, convulsiones, cambios en la presión arterial o en el ritmo cardíaco y otras afecciones o trastornos potencialmente mortales.

45 Las benzodiacepinas, pueden causar somnolencia y, los pacientes, pueden acostumbrarse a éstas. Los síntomas de abstinencia, a menudo, se informan sólo después del cese de las benzodiacepinas. Éstas también aumentan la ingesta de alimentos y deterioran la memoria.

50 Los betabloqueantes, pueden prevenir los síntomas físicos que acompañan a ciertos trastornos de ansiedad, de una forma particular, la fobia social.

55 La totalidad de estos medicamentos, pueden producir efectos secundarios no deseados. Dado el hecho de que una gran cantidad de personas se encuentran afectadas por trastornos relacionados con la ansiedad, de una forma más o menos severa, sería deseable el hecho de poder tener a disposición, una composición que pueda administrarse de una forma segura sin el riesgo de provocar efectos secundarios.

El documento de patente internacional WO 2004 098 622, describe un procedimiento para tratar la depresión, el cual comprende la administración, a un sujeto, de una cepa bacteriana.

60 No obstante, los presentes inventores han encontrado el hecho de que, la efectividad en el tratamiento y / o prevención de la ansiedad, los trastornos relacionados con la ansiedad y / o los trastornos neurodegenerativos, depende del género bacteriano, de la especie y de la cepa utilizada.

65 Así, por consiguiente, el objetivo de la presente invención, era el de mejorar el estado de la técnica y, de una forma particular, proporcionar, al arte especializado de la técnica, una composición que comprenda una cepa bacteriana la

cual sea eficaz, que sea fácilmente disponible, de un bajo precio y segura de administrar sin que ésta tenga efectos secundarios no deseados, y la cual pueda usarse para tratar o prevenir trastornos relacionados con una reducida expresión del BDNF en el hipocampo, tal como la ansiedad.

5 Los presentes inventores han abordado esta necesidad. Éstos se sorprendieron al ver que podían lograr este objetivo, mediante el contenido de las reivindicaciones independientes. Las reivindicaciones dependientes, desarrollan, de una forma adicional, la idea de la presente invención.

10 Así, en consecuencia, una forma de presentación de la presente invención se trata de una composición comestible la cual comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. El género de bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, se encuentra comercialmente disponible en el mercado.

15 La bacteria del género *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (BL999) puede obtenerse, por ejemplo, de procedencia de la firma Morinaga Milk Industry Co. Ltd. de Japón con la marca BB536. Ésta puede cultivarse según cualquier procedimiento el cual sea adecuado y prepararse, por ejemplo, para la encapsulación o para la adición a productos, en forma liofilizada (secada por congelación) o secada mediante proyección pulverizada.

La presente invención, se revela con referencia a la cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

20 Se encontró el hecho de que, la cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, es particularmente eficaz. "Comestible" significa un material el cual está aprobado para su consumo humano o animal.

25 El término "*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999" pretende incluir a la bacteria, a partes de la bacteria y / o un medio de crecimiento fermentado mediante la bacteria.

30 La composición comestible, puede ser un medicamento, pero, de una forma preferible, ésta es una composición alimenticia, una composición alimenticia para animales de compañía o domésticos, un suplemento dietético, un nutracéutico y / o una bebida.

Si la composición de la presente invención se trata de una composición alimenticia, esto tiene la ventaja de que, la composición en cuestión, puede distribuirse en farmacias y en droguerías, farmacias, si bien, ésta, puede también distribuirse en supermercados normales, en donde las composiciones, se encuentran fácilmente disponibles para todo el mundo.

35 El sabor generalmente agradable de las composiciones alimenticias, contribuirá, de una forma adicional, a la aceptación del producto. De una forma particular, los niños pequeños o los animales de compañía o domésticos, tienen muchas más probabilidades de consumir fácilmente las composiciones provistas de un sabor que generalmente le gusta.

40 Los ejemplos de productos alimenticios los cuales son aplicables a la presente invención son los yogures, la leche, la leche aromatizada o saborizada, las cremas heladas o helados, los postres listos para comer, las materias en polvo para la para la reconstitución con, por ejemplo, leche o agua, las bebidas de leche con chocolate, las bebidas de malta, los platos de comida preparada listos para consumir, los platos de comidas o de bebidas instantáneas para humanos, o las composiciones alimenticias que representen una dieta completa o parcial destinada a animales de compañía o domésticos o al ganado.

45 Así, por consiguiente, en una forma de presentación, la composición según la presente invención, se trata de un producto alimenticio destinado a humanos, animales de compañía o domésticos o al ganado. De una forma particular, la composición está destinada a animales seleccionados de entre el grupo que consiste en perros, gatos, cerdos, ganado vacuno, caballos, cabras, ovejas, aves de corral o humanos, y en una forma preferida de presentación, la composición, se trata de un producto alimenticio destinado a especies adultas, de una forma particular a adultos humanos.

50 La composición de la presente invención, puede contener, de una forma adicional, hidrocoloides protectores (tales como los consistentes en las gomas, las proteínas, los almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes / materiales encapsulantes, materiales de barrera / envoltura, compuestos matrices, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, portadores o soportes, cargas de relleno, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, coadyuvantes de procesado (disolventes), agentes fluidificantes, agentes para enmascarar el sabor o aroma, agentes de ponderación, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y agentes antimicrobianos. La composición también puede contener, así mismo, aditivos y adyuvantes farmacéuticos convencionales, excipientes y diluyentes, los cuales incluyen, entre otros, al agua, la gelatina de cualquier origen, las gomas vegetales, el sulfonato de lignina, el talco, los azúcares, el almidón, la goma arábiga, los aceites vegetales, los polialquilenglicoles, los agentes aromatizantes / saborizantes, los conservantes, los estabilizantes, los agentes

emulsionantes, los tampones, los lubricantes, los colorantes, los agentes humectantes, las cargas de relleno y similares. En todos los casos, dichos componentes adicionales, se seleccionarán teniendo en cuenta su idoneidad para el destinatario previsto.

5 La composición puede consistir en una fórmula nutricionalmente completa.

La composición en concordancia con la invención, puede comprender una fuente de proteína.

10 Puede usarse cualquier proteína dietética adecuada, tal como, por ejemplo proteínas animales (tales como las proteínas de la leche, las proteínas de carne y las proteínas de huevo); proteínas vegetales (tales como la proteína de soja, la proteína de trigo, la proteína de arroz y la proteína de guisante); mezclas de aminoácidos libres; o combinaciones de las mismas. Las proteínas de la leche, tales como la caseína y el suero lácteo, y las proteínas de soja, son las que se prefieren, de una forma particular.

15 Las proteínas, pueden encontrarse intactas o hidrolizadas o consistir en una mezcla de proteínas intactas e hidrolizadas. Puede ser deseable suministrar proteínas parcialmente hidrolizadas (de grado de hidrólisis comprendido entre un 2 y un 20 %), tal como, por ejemplo, para sujetos humanos y / o animales en riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca. Si se requieren proteínas hidrolizadas, el proceso de hidrólisis, puede llevarse a cabo según se desee y tal como se conoce en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, un hidrolizado
 20 de proteína de suero lácteo, se puede preparar procediendo a hidrolizar enzimáticamente, la fracción de suero lácteo, en una o más etapas. Si la fracción de suero utilizada como material de partida se encuentra sustancialmente exenta de lactosa, se descubre entonces el hecho de que, la proteína, sufre mucho menos bloqueo de lisina durante el proceso de hidrólisis. Esto permite la reducción de la extensión del bloqueo de lisina, desde un porcentaje de aprox. un 15 % en peso de la lisina total, a un porcentaje de menos de aprox. un 10 %, en peso, de
 25 lisina; tal como, por ejemplo, reduciéndola a un porcentaje de aprox. un 7 %, en peso, de lisina, lo cual, mejora enormemente la calidad nutricional de la fuente de proteína.

La composición también puede contener una fuente de hidratos de carbono y una fuente de grasa.

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

35 Se puede añadir, a la composición, una fuente de hidratos de carbono.

La fuente de hidratos de carbono proporciona, de una forma preferible, del 40% al 80% de la energía de la composición. Se puede usar cualquier hidrato de carbono adecuado, tal como, por ejemplo, la sacarosa, la lactosa, la glucosa, la fructosa, los sólidos de jarabe de maíz, las maltodextrinas y las mezclas de los mismos. También se
 40 puede agregar fibra dietética si así se desea. La fibra dietética pasa a través del intestino delgado sin ser digerida por enzimas y ésta funciona como un agente de creación de volumen y laxante natural. La fibra dietética, puede ser soluble o insoluble y, de una forma general, se prefiere una combinación de los dos tipos. Las fuentes adecuadas de fibra dietética, incluyen a la soja, el guisante, la avena, la pectina, la goma de guar, la goma de guar parcialmente hidrolizada, la goma arábiga, los fructooligosacáridos, los oligosacáridos ácidos, los galacto-oligosacáridos, la sialil-
 45 lactosa y los oligosacáridos derivados de leches animales. Una mezcla de fibras preferida es una mezcla de inulina con fructo-oligosacáridos de cadena más corta. De una forma preferible, si se encuentra presente fibra, ésta se encontrará comprendida en una cantidad situada entre 2 y 40 g/l de la composición, de la forma que se consuma, de una forma preferible, entre 4 y 40 g/l.

50 La composición, también puede contener, así mismo, minerales y micronutrientes, tales como oligoelementos y vitaminas, en concordancia con las recomendaciones de organismos gubernamentales como las del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA – [de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a United States Department of Agriculture] -). Así, por ejemplo, la composición en cuestión, puede contener, por dosis diaria, uno o más de los siguientes micronutrientes en los rangos que se proporcionan: - de 300 a 500 mg de calcio,
 55 de 50 a 100 mg de magnesio, de 150 a 250 mg de fósforo, de 5 a 20 mg de hierro, de 1 a 7 mg de zinc, de 0,1 a 0,3 mg de cobre, de 50 a 200 µg de yodo, de 5 a 15 µg de selenio, de 1000 a 3000 µg de betacaroteno, de 10 a 80 mg de vitamina C, de 1 a 2 mg de vitamina B1, de 0,5 a 1,5 mg de vitamina B6, de 0,5 a 2 mg de vitamina B2, de 5 a 18 mg de niacina, de 0,5 a 2.0 µg de vitamina B12, de 100 a 800 µg de ácido fólico, de 30 a 70 µg de biotina, de 1 a 5 µg de vitamina D, de 3 a 10 µg de vitamina E.

60 Se pueden incorporar uno o más emulsionantes de calidad alimenticia, en la composición, en el caso en el que se desee; así, por ejemplo, pueden incorporarse ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- y di-glicéridos, lecitina y mono- y di-glicéridos. De una forma similar, se pueden incluir sales y estabilizantes adecuados.

65 La composición, de una forma preferible, es administrable por vía oral o enteral; tal como, por ejemplo en forma de

una materia en polvo para reconstituir con leche o con agua.

En concordancia con una forma preferida de presentación de la presente invención, la composición, comprende por lo menos otro tipo de otro microorganismo de calidad alimentaria.

5 Los microorganismos de "grado alimenticio" son microorganismos los cuales son seguros para su uso en productos alimenticios.

10 Los microorganismos de calidad alimentaria son, de una forma preferible, bacterias de calidad alimentaria o levadura de calidad alimentaria. Las bacterias de calidad alimentaria, pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en las bacterias de ácido láctico, las bifidobacterias, las propionibacterias o las mezclas de las mismas. Como levadura de calidad alimentaria, se puede usar, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y / o *Saccharomyces boulardii*.

15 Las bacterias de grado alimenticio pueden ser bacterias probióticas.

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

20 Las bacterias probióticas se seleccionan, de una forma preferible, de entre el grupo que consiste en las bacterias de ácido láctico, las bifidobacterias, las propionibacterias o las mezclas de las mismas. Las bacterias probióticas, pueden consistir en cualquier bacteria de ácido láctico o bifidobacterias con unas características probióticas establecidas. Así, por ejemplo, también pueden ser capaces de promover el desarrollo de una microbiota intestinal bifidogénica.

25 Los probióticos adecuados, pueden seleccionarse de entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* o mezclas de los mismos, de una forma particular, seleccionándose de entre el grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus reuteri* o mezclas de los mismos, seleccionándose, de una forma preferible, de entre el grupo que consiste en *Lactobacillus johnsonii* (NCC533; CNCM I-1225), *Bifidobacterium longum* (NCC490; CNCM I-2170), *Bifidobacterium longum* (NCC2705; CNCM I-2618), *Bifidobacterium lactis* (2818; CNCM I-3446), *Lactobacillus paracasei* (NCC2461; CNCM I-2116), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* (NCC4007; CGMCC 1.3724), *Enterococcus faecium SF 68* (NCIMB110415) y mezclas de los mismos. En una forma preferida de presentación de la presente invención, la composición, contiene, de una forma adicional, por lo menos un prebiótico. "Prebiótico" significa sustancias alimenticias destinadas a fomentar el crecimiento de bacterias probióticas en los intestinos.

40 Los prebióticos pueden promover el crecimiento de determinadas bacterias de grado alimenticio, de una forma particular de bacterias probióticas, en los intestinos y, así, por lo tanto, éstos pueden mejorar el efecto de la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. De una forma adicional, varios prebióticos, tienen una influencia positiva en, por ejemplo, la digestión.

45 De una forma preferible, el prebiótico, se selecciona de entre el grupo que consiste en los oligosacáridos y opcionalmente, contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y / o inulina; fibras dietéticas; o mezclas de los mismos.

La *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, puede usarse, tanto como una bacteria viva, como también como una especie bacteriana inactivada.

50 Se prefiere el hecho de que por lo menos una parte de la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, se encuentren vivos en la composición y de una forma preferible, que éstas lleguen vivos al intestino. Así, de este modo, éstas pueden persistir en el intestino y aumentar su efectividad mediante la multiplicación. También pueden ser efectivos al interactuar con las bacterias comensales y / o el huésped.

55 Para los productos alimenticios o medicamentos estériles especiales, por ejemplo, podría ser preferible el hecho de que, la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 no se encuentre viva, en la composición. Así, por lo tanto, en una forma de presentación de la presente invención, por lo menos una parte de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 no está viva en la composición.

60 La *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, será eficaz en cualquier concentración.

65 Para la composición de la presente invención, de una forma general, se prefiere el hecho de que, una dosis diaria de la composición comprenda entre 10^4 y 10^{12} ufc (unidades formadoras de colonias) de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Una dosis particularmente adecuada de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 es de 10^5 a 10^{11} cfu, de una forma más preferible de 10^7 a 10^{10} cfu.

La composición de la presente invención también puede comprender, así mismo, entre 10^2 y 10^{10} ufc, de una forma preferible de 10^3 a 10^8 unidades formadoras de colonias, de una forma más preferible, de 10^5 a 10^8 ufc de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, por gramo de peso en seco de la composición.

5 En el caso de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 inactivada, de una forma general, se prefiere el hecho de que, la composición de la presente invención, comprenda entre 10^2 y 10^{10} células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, por gramo del peso en seco de la composición. Una dosis particularmente adecuada de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 es de 10^3 a 10^8 células no replicantes, de una forma más preferible, de 10^5 a 10^8 células no replicantes por gramo del peso en seco de la composición.

Los presentes inventores, se sorprendieron, de una forma particular, al descubrir el hecho de que, la composición de la presente invención, puede usarse con éxito, para aumentar de una forma significativa la expresión del BDNF en el hipocampo.

15 El BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) es un factor de crecimiento de una familia única de factores de crecimiento de polipéptidos los cuales influyen en la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y la muerte de células neuronales y no neuronales. BDNF y los otros factores neurotróficos, tales como, por ejemplo, el NGF (factor de crecimiento nervioso -[de sus siglas, en idioma inglés, correspondientes a nerve growth factor] -), la NT-3 (neurotropina-3) y la NT-4 (neurotrofina-4) son esenciales para la salud y el bienestar del sistema nervioso, y median las actividades de orden superior, tales como el aprendizaje, la memoria, el comportamiento, además de su papel en la supervivencia celular. Las alteraciones de los niveles de neurotrofina se han implicado en trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Alzheimer, de Huntington y de Parkinson, así como también en trastornos psiquiátricos los cuales incluyen a la depresión y al abuso de sustancias (Chao et al., 2006, Clin. Sci., 20 110: 167 - 173).

Una forma de presentación de la presente invención, es así, por consiguiente, la composición comestible que comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, para aumentar la expresión del BDNF en el hipocampo.

30 La presente invención también se refiere, así mismo, al uso de la composición anteriormente descrita, arriba, para la preparación de una formulación para aumentar la expresión de BDNF en el hipocampo.

La *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 y / o la composición de la presente invención pueden usarse, así, por consiguiente, para tratar o prevenir los trastornos relacionados con una disminución de la expresión del BDNF en el hipocampo. La administración de una dosis efectiva de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 también ayudará, así mismo, a atenuar la disminución de la expresión del BDNF en el hipocampo.

En consecuencia, la composición de la presente invención puede usarse para tratar o prevenir la ansiedad, y / o los trastornos relacionados con la ansiedad, así como sus síntomas.

40 De una forma notable, la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, y / o la composición de la presente invención también pueden usarse para reducir la cantidad de medicación necesaria para tratar o prevenir los trastornos relacionados con una disminución de la expresión del BDNF en el hipocampo.

45 Otras características y ventajas de la presente invención, resultarán a raíz de los ejemplos y figuras que se facilitan a continuación:

50 La Figura 1, muestra el resultado de un test de ensayo de caja negra / caja brillante: tiempo total pasado en caja brillante y tiempo de espera o demora para volver a ingresar a la caja brillante y de un test de ensayo de regresión progresiva en ratones infectados con *Trichuris muris* (Tm). TM-medium y Tm-B. longum son ratones infectados con Tm tratados con medio fresco (control negativo) y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, respectivamente; Se muestra un grupo Tm tratado con la cepa de *L. rhamnosus* (*L. rh*) para comparación.

55 La Figura 2, muestra los resultados de la hibridación in situ en la región del hipocampo cerebral de ratones infectados con un *Trichuris muris* (Tm). Tm-B. longum son ratones infectados con Tm, tratados con *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; Se muestra un grupo Tm de ratones tratados con la cepa de *L. rhamnosus* para comparación. La cuantificación de las señales de ^{35}S se realizó mediante autorradiografía y análisis de imagen (panel superior derecho).

60 La Figura 3, muestra los resultados obtenidos en la inflamación del colon medida mediante el ensayo de actividad mieloperoxidasa (panel izquierdo) y la infiltración de células mononucleares (panel derecho) en ratones infectados con *Trichuris muris* (Tm). TM-medium y Tm-B. longum son ratones infectados con Tm, tratados con medio fresco (control negativo) y *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; Se muestra un grupo Tm de ratones tratados con la cepa de *L. rhamnosus* para comparación.

65

La Figura 4, muestra el resultado de un test de ensayo de caja negra / caja brillante: tiempo total pasado en la caja brillante y tiempo de espera o demora para volver a ingresar a la caja brillante y de un test de ensayo de regresión progresiva, en ratones con colitis crónica inducida por DSS. DSS-medium y DSS-B. longum son ratones con colitis inducida por DSS, tratados con medio fresco (control negativo) o *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, respectivamente.

La Figura 5, muestra los resultados de la hibridación in situ en la región del hipocampo cerebral de ratones con colitis crónica inducida por DSS (dextrano sulfato sódico). DSS-medium y DSS-B. longum son ratones con colitis inducida por DSS tratados con medio fresco (control negativo) o *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, respectivamente. La cuantificación de las señales de ³⁵S se realizó mediante autorradiografía y análisis de imagen (panel superior derecho).

La Figura 6, muestra los resultados obtenidos en la inflamación del colon medida mediante el ensayo de actividad mieloperoxidasa (panel izquierdo) y la infiltración de células mononucleares (panel derecho) en ratones con colitis crónica inducida por DSS. DSS-medium y DSS-B. longum son ratones con colitis inducida por DSS tratados con medio fresco (control negativo) o *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, respectivamente.

La Figura 7, muestra el resultado de un test de ensayo del comportamiento similar a la ansiedad (test de ensayo de regresión progresiva) realizada en ratones con colitis crónica inducida por DSS y tratada adicionalmente con medio fresco (MRS, control negativo) o con diferentes especies de *Bifidobacterium*. La cepa de *B. longum* ensayada, era la *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; Los resultados obtenidos con las cepas de *B. lactis*, *B. animalis* y *B. infantis* se muestran a efectos de comparación.

Ejemplos:

Los ratones infectados crónicamente con el parásito *Trichuris muris* mostraron un aumento en el comportamiento similar a la ansiedad en dos tests de ensayo del comportamiento: 1) En el test de ensayo de caja negra / caja brillante, los animales infectados mostraron una disminución en el tiempo pasado en la caja brillante y un aumento del tiempo de espera o demora para volver a ingresar a la caja brillante; 2) En el test de ensayo de regresión progresiva, la infección aumentó el tiempo de espera o demora para bajar del pedestal (Figura 1). El efecto sobre el comportamiento se correlacionó con una normalización de la disminución mediada por *Trichuris muris* en los niveles de BDNF en el hipocampo solo observada en ratones tratados con *B. longum* (Figura 2). Por el contrario, el tratamiento con *B. longum* y *L. rhamnosus* redujo la actividad mieloperoxidasa y la infiltración mononuclear previamente inducida por la infección por *Trichuris muris* (Fig. 3), lo cual indica el hecho de que, la normalización del comportamiento, era independiente del efecto antiinflamatorio de la bacteria.

El efecto de *B. longum* se confirmó en el modelo de ratón de colitis inducida por DSS crónica. Incluso si es menos importante que el impacto de la infección por *Trichuris muris*, el DSS aumentó la ansiedad (Fig. 4) y tendió a disminuir los niveles de BDNF en el hipocampo (Fig. 5) El tratamiento de ratones DSS con *B. longum* disminuyó la ansiedad incluso por debajo de los niveles de los ratones de control, tal como se evidencia en el test de ensayo de caja negra / caja brillante por un aumento del tiempo total pasado en la caja brillante y una disminución del tiempo de reingreso a la caja brillante y el número de cruces (Fig. 4) y también mediante una reducción del tiempo de espera o demora para bajar del pedestal observado en el test de ensayo de reducción (Fig. 4). De una forma adicional, en concordancia con los tests de ensayo del comportamiento, el tratamiento con *B. longum*, aumentó los niveles de BDNF en el hipocampo, con respecto a los niveles basales (Fig. 5). De una forma similar a lo observado en el modelo de infección por *Trichuris muris*, *B. longum*, disminuyó la inflamación del colon (Fig. 6).

Con objeto de determinar el hecho de si la capacidad de *B. longum* para normalizar el comportamiento alterado era común a otras bifidobacterias, medimos el efecto sobre el comportamiento de *B. longum* en paralelo con otras tres especies de *Bifidobacterium*: una *B. lactis*, una *B. animalis* y una *B. infantis*: utilizando el modelo de colitis inducida por DSS y el test de ensayo de regresión progresiva (Fig. 7). Además de la *B. longum*, ninguna de las otras especies de *Bifidobacterium* ensayadas pudo disminuir el tiempo de espera o demora desde el pedestal, lo cual indica claramente el hecho de que no es posible extrapolar esta propiedad particular de *B. longum* a otras especies del género *Bifidobacterium*.

Materiales y procedimientos:

Condiciones del cultivo bacteriano.

Se procedió al cultivo de los probióticos, en condiciones anaeróbicas, en un caldo de cultivo del tipo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, BioMerieux) (bifidobacterias con un contenido del 0,5 % de cisteína). Después de un transcurso de tiempo de 24 horas a una temperatura de 37 °C, se procedió a estimar el número de bacterias, midiendo la densidad óptica a 600 nm (1 OD600 = 10⁸ bacterias / ml). Las células bacterianas, se sedimentaron por centrifugación a 5000 X g, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos a una temperatura de 4 °C y éstas se resuspendieron adicionalmente a una concentración de 10¹⁰ / ml en su medio de cultivo ya usado. Alícuotos de 1 ml, se

mantuvieron congelados hasta su uso.

Animales

- 5 Se procedió a comprar ratones machos BALB / co AKR (Harlan, Canadá), de una e 6 - 8 semanas y éstos se alojaron en una unidad convencional específica, exenta de patógenos, en la Instalación Central de Animales de la Universidad McMaster. La totalidad de los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de Cuidado de Animales de la Universidad McMaster.

10 Diseño

Infección crónica por *Trichuris muris* (ver figura 8, panel A):

- 15 Se procedió a alimentar por sonda los ratones AKR machos con *T. muris* (300 huevos / ratón) (n = 26) o con placebo (n = 9). Los ratones infectados, se alimentaron por sonda, diariamente con *L. rhamnosus*, *B. longum* o MRS fresco desde el día 30 durante 10 días. Los ratones no infectados fueron evaluados con MRS fresco diariamente desde el día 30 hasta el día 40. Al final de la administración de probióticos o placebo, los ratones se sometieron a tests de ensayo e caja negra / caja blanca y de regresión progresiva. Los ratones, se sacrificaron, posteriormente y se obtuvieron muestras de tejido. Las muestras de colon se fijaron en formalina para análisis histológico o se congelaron rápidamente para la determinación de MPO. Los cerebros, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron para hibridación in situ.

Colitis crónica por DSS (ver figura 8, panel B):

- 25 Los ratones AKR machos (n = 20) fueron tratados con tres ciclos de dextrano sulfato de sodio (DSS) al 3% (MP Biomedicals, Solon, Ohio, EE. UU.) (Un ciclo consiste en 1 semana de DSS seguido de 1 semana de lavado). Un grupo adicional de ratones (n = 10) recibió únicamente agua potable con placebo. Los ratones infectados se criaron diariamente con *B. longum* u otras Bifidobacterias durante 2 semanas durante el último ciclo de tratamiento con DSS. A los ratones de control, se les administró, por sonda, diariamente, MRS, durante 2 semanas. Al final de la administración de probióticos o placebo, los ratones se sometieron a pruebas de caja negra / caja blanca y / o de regresión progresiva. Los ratones, se sacrificaron, posteriormente y se obtuvieron muestras de tejido. Las muestras de colon, se fijaron en formalina para análisis histológico o se congelaron rápidamente para la determinación de MPO. Los cerebros, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron para hibridación in situ.

35 Pruebas de comportamiento

Caja negra / caja brillante (ver figura 8, panel C):

- 40 El comportamiento de ansiedad, se evaluó individualmente, en los ratones, mediante la utilización de una caja negra / una caja blanca, tal como se describe en la literatura especializada. En resumen, cada ratón, se colocó en el centro de una caja blanca iluminada (de 30 x 30 cm) conectada por una abertura (de 10 x 3 cm) a una caja negra más pequeña (de 30 x 15 cm). El comportamiento locomotor de cada ratón, en una caja blanca se registró durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, con una cámara de video digital y se almacenó en una computadora u ordenador, para un análisis fuera de línea. Un observador cegado, evaluó varios parámetros, incluyendo el tiempo total que pasó en la caja blanca, el tiempo de espera o demora para volver a ingresar al cuadro blanco (tiempo que permaneció en la caja negra, después de la primera entrada) y el número de pasos o tránsitos (número de veces que ha pasado del cuadro negro al cuadro blanco).

Test de ensayo de regresión progresiva (ver figura 8, panel D):

- 50 Se procedió a evaluar el comportamiento de ansiedad, mediante el test de ensayo de regresión progresiva, tal como se describe en la literatura especializada. En resumen, se procedió a emplazar cada ratón, en el centro de una plataforma elevada (7,5 cm de diámetro, 3 cm de altura) colocada en el centro de un piso negro. Se midió el tiempo de espera o demora para bajar del pedestal, mediante la utilización de un cronómetro; La duración máxima del test de ensayo, era de 5 minutos.

Histología

- 60 Se procedió a fijar las muestras de colon en formol al 10 % y, a continuación, éstas se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los portaobjetos se examinaron con microscopía óptica para evaluar el infiltrado inflamatorio agudo y crónico.

Ensayo de actividad mieloperoxidasa

- 65 Con objeto de evaluar la inflamación intestinal aguda, se procedió a llevar a cabo un ensayo de actividad

mieloperoxidasa (MPO) en tejidos congelados, tal como se ha descrito anteriormente, arriba. La actividad de MPO se expresa en unidades por mg de tejido, en donde, una unidad de MPO se define como siendo una cantidad de la enzima capaz de convertir 1 μmol de peróxido de hidrógeno en agua, en un transcurso de tiempo de 1 minuto, a la temperatura ambiente.

5

Hibridación in situ en el SNC

Se procedió a evaluar los niveles de BDNF en el hipocampo, mediante hibridaciones in situ, utilizando sondas de ARN marcadas con ^{35}S , en secciones de cerebro congeladas, tal como se ha descrito anteriormente (Whitfield et al., 1990; Foster et al., 2002). En resumen, se procedió a retirar los cerebros y éstos se congelaron rápidamente, mediante inmersión en 2-metilbutano, a una temperatura de $-60\text{ }^\circ\text{C}$, y éstos se almacenaron a una temperatura de $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Las secciones coronales de $12\text{ }\mu\text{m}$ de espesor cortadas mediante criostato se montaron, con descongelación sobre portaobjetos recubiertos con gelatina, éstas se secaron, y se almacenaron a una temperatura de $-35\text{ }^\circ\text{C}$. Las secciones de tejido, se fijaron con formaldehído al 4 %, éstas se acetilaron con anhídrido acético al 0,25 % en trietanolamina-HCl 0,1 M, pH 8,0, se deshidrataron y se deslipidizaron con cloroformo. La sonda de ribonucleótidos BDNF antisentido se transcribió de un plásmido linealizado mediante la utilización del sistema Riboprobe (Promega Biotech, Burlington, ON) con $\alpha\text{-}^{35}\text{S}$ -UTP (actividad específica $> 1000\text{ Ci / mmol}$; Perkin-Elmer, Boston, MA) y polimerasas T3 y T7 respectivamente. Las sondas radiomarcadas se diluyeron en un tampón de hibridación (NaCl 0,6 M, Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0, sulfato de dextrano al 10%, ADN de esperma de salmón cortado al 0,01%, ARN de levadura a un 0,05 % total, tipo XI, ARNt de levadura al 0,01%, 1X solución de Denhardt) y aplicado a secciones del cerebro (aproximadamente 500,000 CPM / sección). Los portaobjetos se incubaron durante el transcurso de toda la noche a una temperatura de $55\text{ }^\circ\text{C}$, en una cámara humidificada. Para reducir la unión no específica de la sonda, los portaobjetos se lavaron en una solución de RNasa de $20\text{ }\mu\text{g / ml}$ durante un transcurso de tiempo de 30 minutos a la temperatura ambiente, seguido de 1 hora cada uno en 2XSSC a $50\text{ }^\circ\text{C}$, 0,2XSSC a $55\text{ }^\circ\text{C}$ y $60\text{ }^\circ\text{C}$. Los portaobjetos se deshidrataron y se secaron al aire, para autorradiografía. Los portaobjetos y los patrones estándar de plástico de C^{14} , se emplazaron en casetes de rayos X, se colocaron en una película (BioMax MR; Eastman Kodak, Rochester, NY) durante 5 días y se revelaron (Procesador de rayos X médico Kodak). Las imágenes de películas autorradiográficas de secciones y estándares del cerebro, se digitalizaron con una cámara de estado sólido, mediante una lente Nikon de 60 mm, utilizando el software informático QCapture (Qicam; Quorum Technologies Inc., Guelph, ON) y un sistema de análisis de imágenes por computadora Macintosh con un software informático de imágenes del tipo "software Image" (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>). La transmitancia de luz a través de la película se midió perfilando (describiendo) la estructura en el monitor. Para el ARNm de BDNF, la transmitancia, se convirtió a niveles de radiactividad, mediante la utilización de la curva de Rodbard aplicada a los patrones estándar. Los DPM calculados, se multiplicaron por área para realizar una medición de densidad integrada. Las ilustraciones se realizaron directamente de las imágenes capturadas.

35

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar o medianas, con rangos intercuartiles, de la forma apropiada. Los datos, se analizaron mediante un test de ensayo ANOVA de dos vías, o mediante un test de ensayo t, no apareado, según corresponda. Un valor de $p < 0,05$ se consideraba como siendo estadísticamente significativo.

40

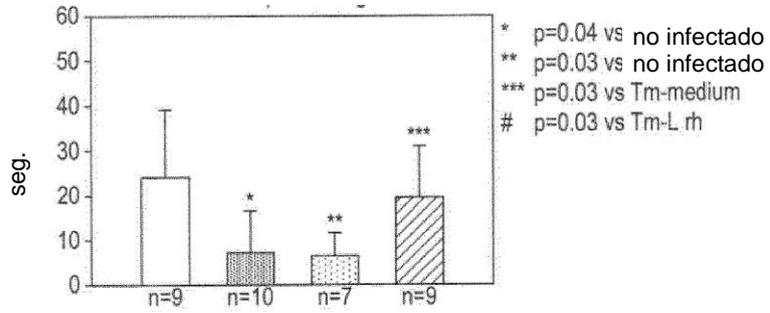
REIVINDICACIONES

- 1.- Composición comestible que comprende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.
- 5 2.- Composición según la reivindicación 1, en donde, la composición, es una composición alimenticia, una composición alimenticia para animales de compañía, un suplemento dietético, una bebida y / o composición médica.
- 10 3.- Composición según una de las reivindicaciones 1 - 2, en donde, la composición, comprende, de una forma adicional, por lo menos otro tipo de otra bacteria de calidad alimentaria, en donde, las bacterias de calidad alimentaria, se seleccionan, de una forma preferible de entre el grupo que consiste en bacterias de ácido láctico, bifidobacterias, propionibacterias o mezclas de las mismas.
- 15 4.- Composición según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, la composición, contiene, de una forma adicional, por lo menos un prebiótico.
- 20 5.- Composición según la reivindicación 4, en donde, el prebiótico, se selecciona de entre el grupo que consiste en oligosacáridos y opcionalmente contiene fructosa, galactosa, manosa, soja y / o inulina; fibras dietéticas; o mezclas de los mismos.
- 25 6.- Composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde, por lo menos una parte de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, se encuentra viva en la composición.
- 7.- Composición según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde, por lo menos una parte de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, no se encuentra viva en la composición.
- 30 8.- Composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, la composición, comprende entre 10^4 y 10^{10} células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, por dosis diaria.
- 9.- Composición según una de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, la composición, comprende entre 10^2 y 10^8 células no replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, por g del peso en seco de la composición.
- 10.- Composición según las reivindicaciones 1 a 9 para aumentar la expresión del BDNF en el hipocampo.

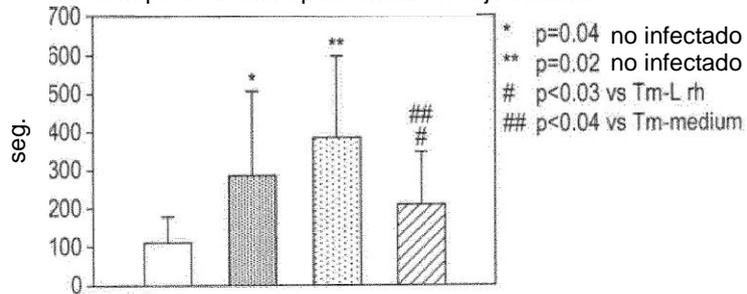
FIG 1

Comportamiento semejante a la ansiedad

Tiempo total de permanencia en la caja brillante



Tiempo de demora para entrar en caja brillante



Tiempo de demora para la regresión progresiva

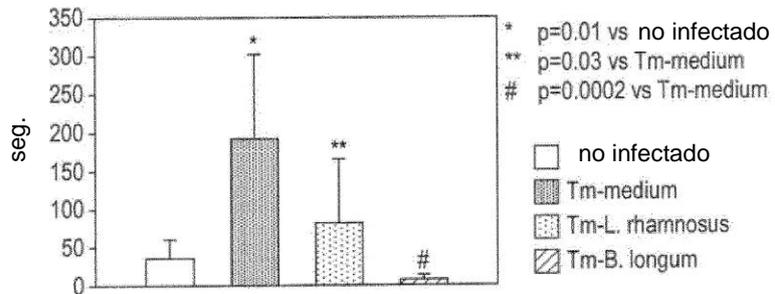


FIG.2

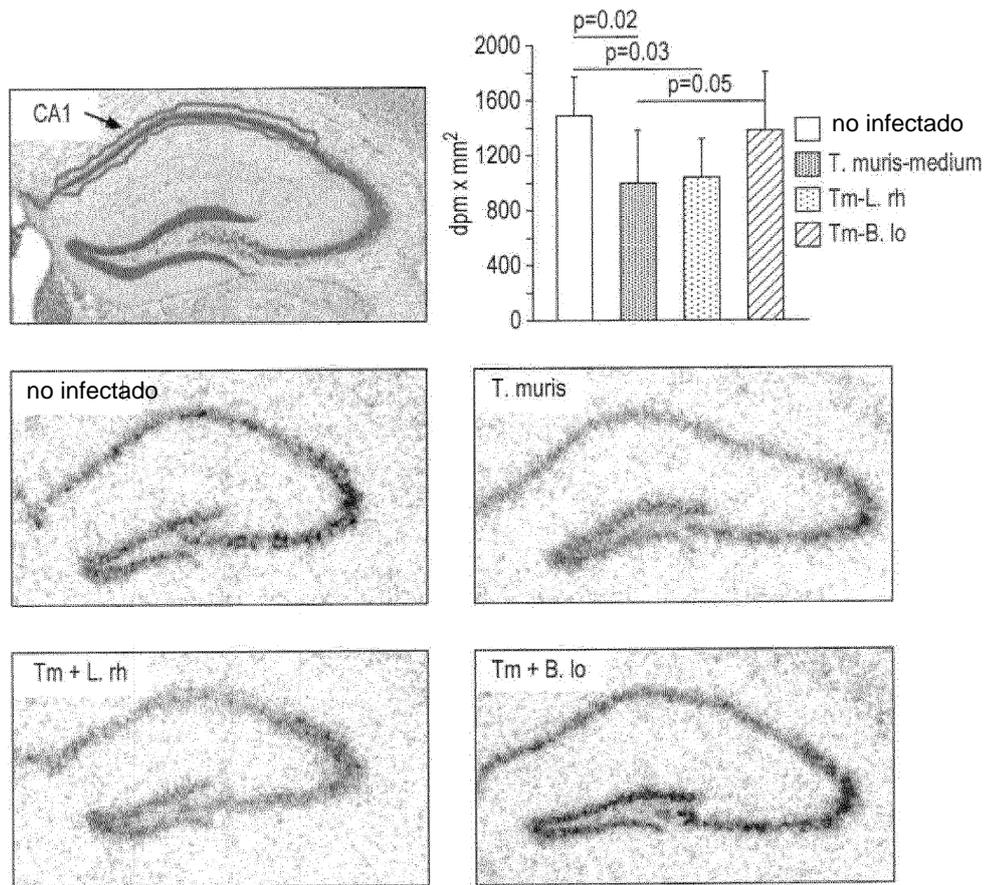


FIG.3
Inflamación crónica

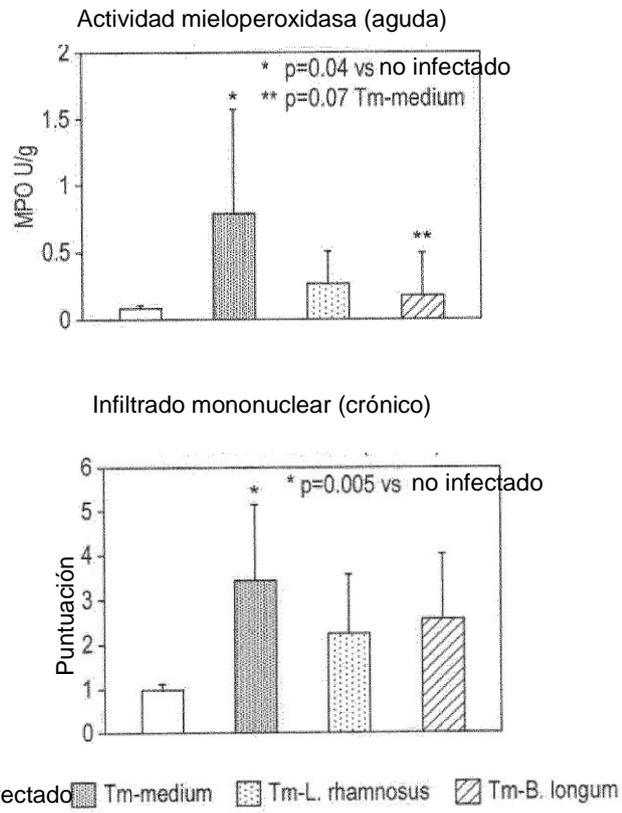


FIG 4

Comportamiento semejante a la ansiedad

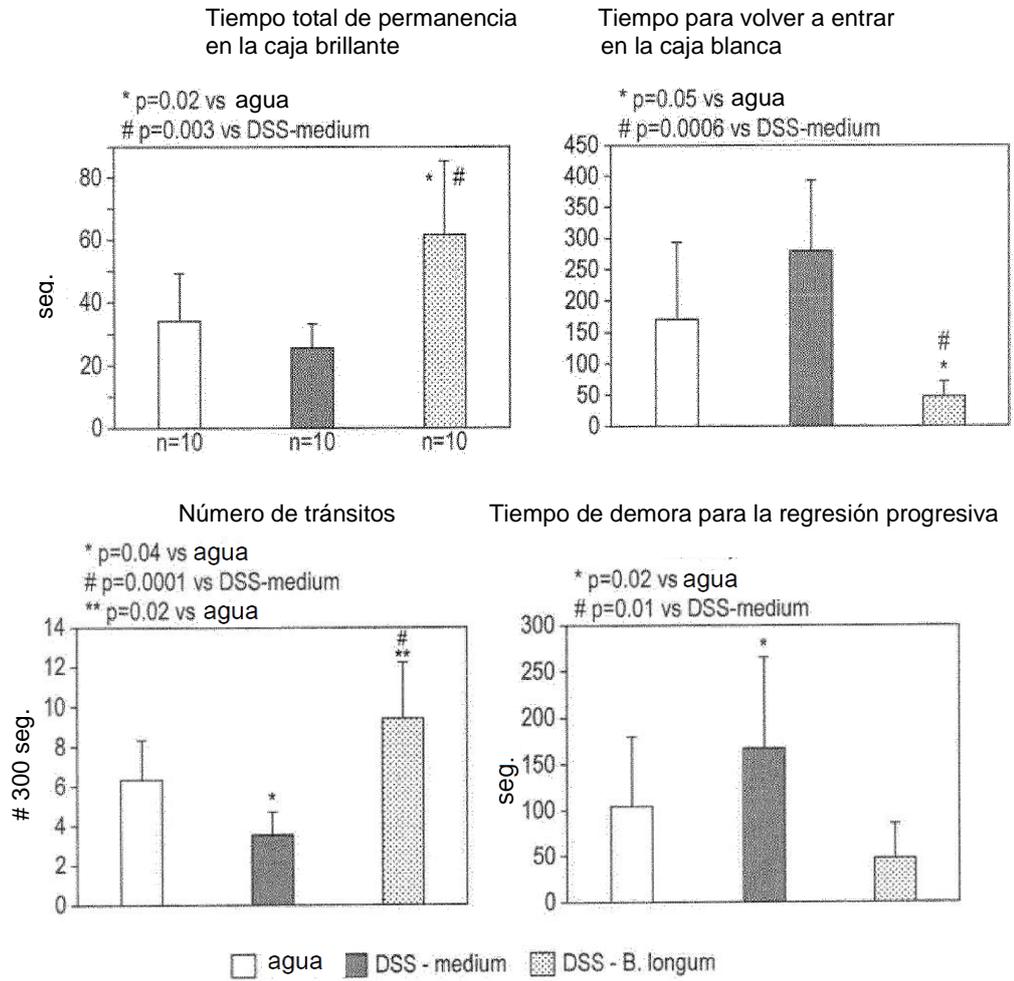


FIG. 5

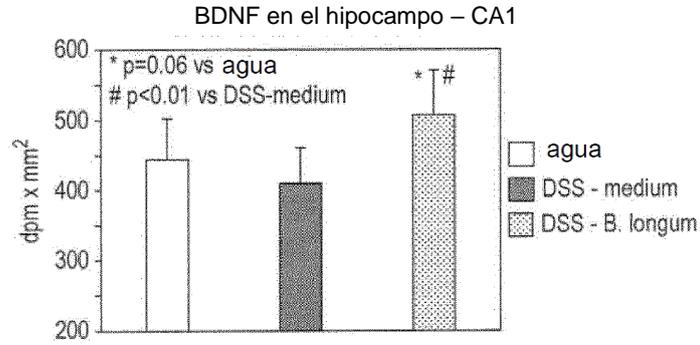


FIG. 6

Inflamación

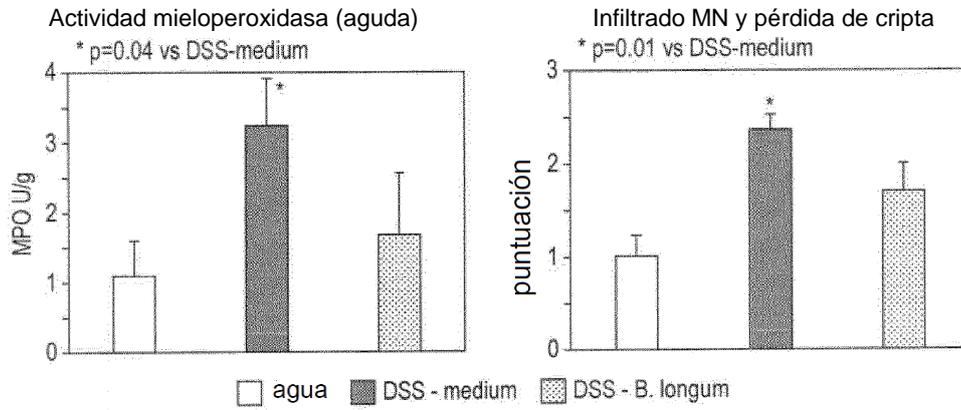


FIG 7

Comportamiento semejante a la ansiedad
Test de ensayo de regresión progresiva

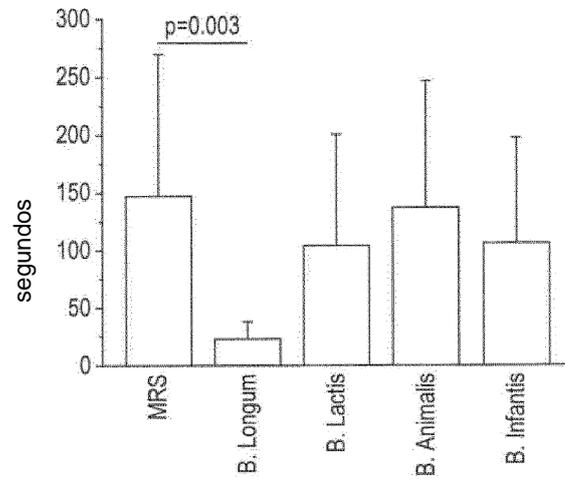


FIG 8

