República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112012004046-4 B1

(22) Data do Depósito: 24/08/2010

(45) Data de Concessão: 17/02/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO BIFIDOBACTERIUM LONGUM ATCC BAA-999 PARA TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DISTÚRBIOS GASTROINTESTINAIS FUNCIONAIS LIGADOS À ANSIEDADE

(51) Int.Cl.: A61K 35/74; A23K 10/18; A23L 33/135; A61P 1/00.

(52) CPC: A61K 35/74; A23K 10/18; A23L 33/135; A23V 2002/00; A23Y 2300/55.

(30) Prioridade Unionista: 25/08/2009 EP 09168590.9.

(73) Titular(es): SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A..

(72) Inventor(es): PETER MCLEAN; STEPHEN MICHAEL COLLINS; PREMYSL BERCIK; ELENA VERDU DE BERCIK; GABRIELA BERGONZELLI DE GONDA.

(86) Pedido PCT: PCT EP2010062320 de 24/08/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/023689 de 03/03/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/02/2012

(57) Resumo: BIFIDOBACTERIUM LONGUM E DISTÚRBIOS GI FUNCIONAIS. A presente invenção refere-se, de modo geral, ao campo das bactérias probióticas. Em particular, ela se refere ao Bifidobacterium longum, tal como Bifidobacterium longum ATCC BAA-999 e seu uso em composições ingeríveis. A composição descrita na presente invenção pode ser usada para tratar ou prevenir distúrbios GI funcionais.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* ATCC BAA-999 PARA TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE DISTÚRBIOS GASTROINTESTINAIS FUNCIONAIS LIGADOS À ANSIEDADE".**

[001] A presente invenção se refere, de modo geral, ao campo das bactérias probióticas. Em particular, ela se refere ao *Bifidobacterium longum* NCC3001 (ATCC BAA-999), subsequentemente referido como *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 e seu uso em composições ingeríveis. A composição descrita na presente invenção pode ser usada para tratar ou prevenir distúrbios gastrintestinais (GI) funcionais.

[002] Distúrbios GI funcionais (FGIDs) é um grupo de distúrbios que inclui a Síndrome do cólon irritável (IBS) e a Dispepsia funcional, que são condições crônicas associadas com alta morbidade, caracterizadas por desconforto ou dor abdominal, distensão abdominal e, no caso de IBS, hábitos intestinais alterados (diarreia e/ou constipação).

[003] A prevalência de FGIDs na população em geral é relativamente alta, variando entre 15% a 30%, apresentando uma carga econômica substancial. Tem sido sugerido que os custos anuais diretos apenas com IBS estão agora em torno de $41 bilhões de dólares nos 8 países mais industrializados, com custos indiretos adicionais consideráveis (por exemplo, ausência no trabalho, etc.). Os tratamentos atuais para FGIDs demonstram no máximo uma eficácia marginal, que tem sido historicamente relacionada com a pouca compreensão da patogênese da doença.

[004] A fisiopatologia precisa de IBS permanece por ser elucidada.

[005] Estudos recentes têm descrito a inflamação da mucosa e alterações na microflora intestinal em pacientes com IBS e uma correlação da doença com infecções intestinais.

[006] O fato de que alguns probióticos exibem propriedades antibacterianas, antivirais e anti-inflamatórias e de que eles podem restau-

rar o equilíbrio da microbiota intestinal, sugeriu que eles podem se tornar agentes terapêuticos adequados para IBS.

[007] Até agora, vários estudos sobre o efeito de diferentes probióticos em indivíduos com IBS têm sido publicados. Esses estudos sugerem que o uso de probióticos pode ser associado com a melhora nos sintomas de IBS, mas também que nem todos os probióticos possuem igual eficácia em IBS.

[008] Várias meta-análises realizadas recentemente concluíram que existem dados inadequados para comentar a eficácia de outros probióticos (Lynne V McFarland, e outros, World J Gastroenterol 2008 May 7; 14(17): 2650-2661; Nourieh Hoveyda, e outros, BMC Gastroenterology 2009, 9:15).

[009] Consequentemente, foi um objetivo da presente invenção aperfeiçoar o estados da técnica e, em particular, prover à técnica com uma composição que compreenda uma cepa bacteriana alternativa que seja eficaz, facilmente disponível, de baixo custo e segura para a administração sem efeitos colaterais indesejados, que possa ser usada para tratar ou prevenir distúrbios GI funcionais.

[0010] Os presentes inventores se dirigiram para essa necessidade. Eles ficaram surpresos em ver que eles poderiam atingir esse objetivo pelo assunto em questão das reivindicações independentes. As reivindicações dependentes desenvolvem, posteriormente, a ideia da presente da invenção.

[0011] Foi constatado que a eficácia no tratamento e/ou na prevenção de distúrbios GI funcionais depende do gênero bacteriano, da espécie e da cepa usada.

[0012] Consequentemente, uma modalidade da presente invenção é uma composição que compreenda *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 e/ou seu meio de crescimento fermentado para uso no tratamento e/ou na prevenção de distúrbios GI funcionais.

[0013] A presente invenção também se refere ao uso de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 para a preparação de uma composição para tratar e/ou na prevenir distúrbios GI funcionais.

[0014] *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 é uma cepa da espécie *Bifidobacterium longum* que foi constatada ser, em particular, eficaz na obtenção da presente invenção.

[0015] Vantajosamente, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está disponível comercialmente e já foi testado e constatado ser aceitável para a adição a produtos alimentícios, por exemplo.

[0016] *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (BL999) pode ser obtido comercialmente de fornecedores especializados, por exemplo, de Morinaga Milk Industry Co. Ltd. do Japão sob a marca registrada de BB536.

[0017] *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (BL999) pode ser cultivado de acordo com qualquer método adequado. Ele pode ser adicionado a produtos em uma forma liofilizada ou seca por pulverização, por exemplo.

[0018] A expressão "*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 (BL999)" pretende incluir a bactéria, partes da bactéria e/ou um meio de crescimento fermentado pela bactéria.

[0019] A composição pode ser qualquer composição, mas é preferivelmente uma composição para ser administrada oralmente, por via enteral ou retal.

[0020] Por exemplo, a composição pode ser uma composição comestível.

[0021] "Comestível" significa um material que é aprovado para consumo humano ou animal.

[0022] Tipicamente, a composição pode ser selecionada do grupo que consiste em uma composição alimentícia, uma composição alimentícia para animais de estimação, um suplemento dietético, uma

bebida e/ou uma composição médica.

[0023] Se a composição da presente invenção for uma composição alimentícia, essa tem a vantagem de que tal composição pode ser distribuída em farmácias, drogarias, mas também em supermercados normais, onde as composições estão facilmente disponíveis para todo mundo.

[0024] O sabor geralmente agradável das composições alimentícias contribuirá adicionalmente para a aceitação do produto. Em particular, crianças pequenas ou animais de estimação são muito mais propensos em consumir prontamente as composições com um sabor que é geralmente aceito.

[0025] Exemplos de produtos alimentícios que são aplicáveis a presente invenção são os iogurtes, leite, leite com sabor, sorvete, sobremesas prontas para consumo, pós para reconstituição, por exemplo, com leite ou água, bebidas lácteas achocolatadas, bebidas maltadas, pratos prontos para consumo, refeições instantâneas ou bebidas para humanos ou composições alimentícias que representam uma dieta completa ou parcial pretendida para animais de estimação ou animais de criação.

[0026] Consequentemente, em uma modalidade, a composição de acordo com a presente invenção é um produto alimentício pretendido para humanos, animais de estimação ou animais de criação.

[0027] A composição pode ser destinada a animais selecionados do grupo que consiste em cães, gatos, porcos, gado, cavalos, cabras, carneiros ou aves domésticas.

[0028] Em uma modalidade preferida, a composição é um produto alimentício destinado a espécies adultas, em particular, adultos humanos.

[0029] A composição da presente invenção pode conter, adicionalmente, hidrocolóides protetores (tais como gomas, proteínas, amidos modificados), ligantes, agentes que formam filmes, agen-

tes/materiais para encapsulação, materiais para barreira/cápsula, compostos de matriz, revestimentos, emulsificantes, agentes tensoativos, agentes solubilizantes (óleos, gorduras, ceras, lecitinas, etc.), adsorventes, veículos, cargas, cocompostos, agentes de dispersão, agentes umectantes, auxiliares do processamento (solventes), agentes fluentes, agentes que mascaram o sabor, agentes para atribuir peso, agentes gelificantes, agentes que formam gel, antioxidantes e antimicrobianos. A composição também pode conter aditivos e adjuvantes farmacêuticos convencionais, excipientes e diluentes incluindo, mas não limitados à água, gelatina de qualquer origem, gomas vegetais, lingninosulfonato, talco, açúcares, amido, goma arábica, óleos vegetais, polialquileno glicóis, agentes flavorizantes, conservantes, estabilizadores, agentes emulsificantes, tampões, lubrificantes, corantes, agentes umectantes, cargas esimilares. Em todos os casos, tais componentes adicionais serão selecionados tendo em conta sua adequabilidade para o receptor pretendido.

[0030] A composição pode ser uma fórmula nutricionalmente completa.

[0031] A composição de acordo com a invenção pode compreender uma fonte de proteína.

[0032] Qualquer proteína dietética adequada pode ser usada, por exemplo, proteínas animais (tais como proteínas do leite, proteínas da carne e proteínas do ovo); proteínas vegetais (tais como proteína de soja, proteína do trigo, proteína de arroz e proteína de ervilha); misturas de aminoácidos livres; ou suas combinações. As proteínas do leite tais como a caseína e o soro do leite e as proteínas da soja são particularmente preferidas.

[0033] As proteínas podem estar intactas ou hidrolisadas ou uma mistura de proteínas intactas e hidrolisadas. Pode ser desejável fornecer proteínas parcialmente hidrolisadas (grau de hidrólise entre 2 a

20%), por exemplo, para indivíduos humanos e/ou animais com risco de desenvolver alergia ao leite de vaca.

[0034] Adicionalmente, fontes de proteína pré-hidrolisada são geralmente mais facilmente digeridas e absorvidas por um trato gastrointestinal prejudicado.

[0035] Se as proteínas hidrolisadas são necessárias, o processo de hidrólise pode ser realizado como desejado e como é conhecido na técnica. Pode ser desejável fornecer proteínas parcialmente hidrolisadas (grau de hidrólise entre 2 e 20%).

[0036] Por exemplo, um hidrolisado de proteína do soro do leite pode ser preparado pela hidrólise enzimática da fração de soro de leite em uma ou mais etapas. Se a proteína do soro do leite usada como material de partida é substancialmente livre de lactose, foi constatado que a proteína sofre muito menos bloqueio de lisina durante o processo de hidrólise. Isso possibilita que a extensão do bloqueio de lisina a ser realizada seja reduzida de cerca de 15% em peso da lisina total para cerca de 10% em peso da lisina; por exemplo, cerca de 7% em peso de lisina, o que aperfeiçoa grandemente a qualidade nutricional da fonte de proteína.

[0037] A composição também pode conter uma fonte de carboidratos e uma fonte de gordura.

[0038] Se a composição incluir uma fonte de gordura, a fonte de gordura fornece, preferivelmente, 5% a 40% da energia da composição; por exemplo, 20% a 30% da energia. Um perfil de gordura adequado pode ser obtido usando uma mistura de óleo de canola, óleo de milho e óleo de girassol rico em ácido oleico.

[0039] Uma fonte de carboidratos pode ser adicionada à composição.

[0040] A fonte de carboidratos fornece preferivelmente 40% a 80% da energia da composição. Qualquer carboidrato adequado pode ser

usado, por exemplo, sucrose, lactose, glicose, frutose, sólidos de xarope de milho, maltodextrinas e suas misturas. Fibra dietética também pode ser adicionada. A fibra dietética passa através do intestino delgado não digerida pelas enzimas e funciona como um agente de volume e laxante naturais. A fibra dietética pode ser solúvel ou insolúvel e em geral uma mistura dos dois tipos é preferida. Fontes adequadas de fibra dietética incluem a soja, ervilha, aveia, pectina, goma guar, goma guar parcialmente hidrolisada, goma arábica, fruto-oligossacarídeos, oligossacarídeos ácidos, galacto-oligossacarídeos, sialil-lactose e oligossacarídeos derivados de leites animais. Uma mistura de fibra preferida é uma mistura de inulina com fruto-oligossacarídeos de cadeia curta. Preferivelmente, se a fibra está presente, o conteúdo de fibra está entre 2 e 40 g/l da composição como consumida, mais preferivelmente entre 4 a 10 g/l.

[0041] A composição também pode conter minerais e micronutrientes, tais como elementos residuais e vitaminas de acordo com as recomendações dos órgãos governamentais tais como USRDA. Por exemplo, a composição pode conter por dose diária um ou mais dos seguintes micronutrientes nas faixas dadas: 300 a 500 mg de cálcio, 50 a 100 mg de magnésio, 150 a 250 mg de fósforo, 5 a 20 mg de ferro, 1 a 7 mg de zinco, 0,1 a 0,3 mg de cobre, 50 a 200 µg de iodo, 5 a 15 µg de selênio, 1000 a 3000 µg de beta caroteno, 10 a 80 mg de Vitamina C, 1 a 2 mg de Vitamina B1, 0,5 a 1,5 mg de Vitamina B6, 0,5 a 2 mg de Vitamina B2, 5 a 18 mg de niacina, 0,5 a 2,0 µg de Vitamina B12, 100 a 800 µg de ácido fólico, 30 a 70 µg de biotina, 1 a 5 µg de Vitamina D e 3 a 10 µg de Vitamina E.

[0042] Um ou mais emulsificantes de grau alimentício podem ser incorporados na composição, se desejado; por exemplo, ésteres diacetila de ácido tartárico de mono e diglicerídeos, lecitina e mono e diglicerídeos. Similarmente, sais adequados e estabilizadores podem ser

incluídos.

[0043] A composição pode ser administrada oralmente e/ou enteralmente; por exemplo, na forma de um pó para reconstituição com leite ou água.

[0044] De acordo com uma modalidade preferida da presente invenção, a composição compreende pelo menos um outro tipo de outro micro-organismo de grau alimentício.

[0045] Micro-organismos de "grau alimentício" são micro-organismos que são seguros para uso em alimentos.

[0046] Os micro-organismos de grau alimentício são preferivelmente bactérias de grau alimentício ou leveduras de grau alimentício. As bactérias de grau alimentícia podem ser selecionadas do grupo que consiste de bactérias do ácido láctico, bifidobactérias, propionibactérias ou suas misturas. Como leveduras de grau alimentício, podem ser usadas, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e/ou *Saccharomyces boulardii*.

[0047] As bactérias de grau alimentício podem ser bactérias probióticas.

[0048] "Probiótico" significa preparações de célula ou de componentes de células microbianas com efeito benéfico sobre a saúde ou o bem-estar do hospedeiro (Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. e outros "Probiotics: how should they be defined" Trends Food Sci. Technol. 1999:10 107-10).

[0049] Bactérias probióticas são preferivelmente selecionadas do grupo que consiste em bactérias do ácido láctico, bifidobactérias, propionibactérias ou suas misturas. As bactérias probióticas podem ser quaisquer bactérias do ácido láctico ou bifidobactérias com características probióticas estabelecidas. Por exemplo, elas podem ser capazes de promover o desenvolvimento de uma microbiota bifidogênica intestinal.

[0050] Probióticos adequados podem ser selecionados do grupo que

consiste em *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces boulardii* e *Lactobacillus reuteri* ou suas misturas, preferivelmente selecionados do grupo que consiste em *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 (NCIMB10415) e suas misturas.

[0051] Em uma modalidade preferida da presente invenção, a composição contém adicionalmente pelo menos um prebiótico. "Prebiótico" significa substancias alimentícias destinadas a promover o crescimento de bactérias probióticas nos intestinos.

[0052] Os prebióticos podem promover o crescimento de certas bactérias de grau alimentício, em particular de bactérias probióticas, nos intestinos e, portanto, podem intensificar o efeito de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Adicionalmente, vários prebióticos possuem uma influencia positiva, por exemplo, sobre a digestão.

[0053] Preferivelmente, o prebiótico pode ser selecionado do grupo que consiste em oligossacarídeos e, opcionalmente, contêm frutose, galactose, manose, soja e/ou inulina; fibras dietéticas; ou suas misturas.

[0054] A *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 pode ser usada como bactéria viva assim como uma espécie bacteriana não replicante inativada.

[0055] "Não replicante" significa que nenhuma célula viável e/ou unidades que formam colônias podem ser detectadas pelos métodos clássicos de plaqueamento. Tais métodos clássicos de plaqueamento estão resumidos no livro de microbiologia: James Monroe Jay, Martin

J. Loessner, David A. Golden. 2005. Modern food microbiology. 7th edition, Springer Science, New York, N.Y. 790 p. Tipicamente, a ausência de células viáveis pode ser mostrada como se segue: nenhuma colônia visível sobre as placas de ágar ou nenhuma turvação no meio líquido de crescimento depois da inoculação com concentrações diferentes de preparações bacterianas (amostras "não replicantes") e incubação sob condições apropriadas (atmosfera aeróbica e/ou anaeróbica por pelo menos 24 h).

[0056] É preferível que pelo menos parte das *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 estejam vivas na composição e, preferivelmente, cheguem vivas no intestino. Dessa maneira elas podem persistir no intestino e podem aumentar sua eficácia pela multiplicação. Elas também podem ser eficazes pela interação com bactérias comensais e/ou com o hospedeiro.

[0057] Para produtos alimentícios ou medicamentos estéreis especiais, por exemplo, pode ser preferível que a *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 esteja presente em uma forma não replicante na composição. Portanto, em uma modalidade da presente invenção pelo menos uma parte da *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 não está replicando na composição.

[0058] Em aplicações terapêuticas, as composições são administradas em uma quantidade suficiente para pelo menos parcialmente curar ou parar os sintomas da doença e suas complicações. Uma quantidade adequada para obter isso é definida como "uma dose terapeuticamente eficaz". Quantidades eficazes para esse propósito dependerão de vários fatores conhecidos por aqueles versados na técnica, tais como a severidade da doença e o peso e o estado geral do paciente.

[0059] Em aplicações profiláticas, as composições de acordo com a invenção são administradas a um paciente suscetível ou em risco de

outra maneira de desenvolver uma doença particular, em uma quantidade suficiente para pelo menos parcialmente reduzir o risco de desenvolvimento da doença. Tal quantidade é definida como sendo "uma dose profilática eficaz". Novamente, as quantidades precisas dependem de vários fatores específicos do paciente tais como o estado de saúde e o peso do paciente.

[0060] Geralmente, *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 será administrada em uma dose terapeuticamente eficaz e/ou em uma dose profilática efetiva.

[0061] Se a *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está presente em uma forma viável, ela é teoricamente eficaz em qualquer concentração, considerando o fato de que essas bactérias podem colonizar o intestino e se multiplicar.

[0062] Para a composição da presente invenção, geralmente é preferido que a dose diária da composição compreenda entre 10^4 e 10^{12} cfu (unidades formadoras de colônia) de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999. Uma dose diária adequada em particular de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está entre 10^4 a 10^{11} cfu, mais preferivelmente entre 10^4 a 10^{10} cfu.

[0063] A composição da presente invenção também pode compreender entre 10^2 e 10^{10} cfu, preferivelmente 10^2 a 10^9 unidades formadoras de colônia, mais preferivelmente 10^2 a 10^8 cfu de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por grama de peso seco da composição.

[0064] No caso de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 inativada e/ou não replicante, é geralmente preferido que a composição da presente invenção compreenda entre 10^2 e 10^{10} células não replicantes de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por grama de peso seco da composição. Uma dose diária adequada em particular de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 está entre 10^3 a 10^8 células não replicantes, mais preferivelmente entre 10^5 a 10^8 células não replicantes

por grama de peso seco da composição.

[0065] Obviamente, micro-organismos que não se replicam não formam colônias, consequentemente, a expressão células deve ser entendida como a quantidade de micro-organismos não replicantes que é obtida a partir da quantidade especificada de células bacterianas que se replicam. Isso inclui micro-organismos que estão inativados, não viáveis ou mortos ou presentes como fragmentos tais como materiais de DNA ou de parede celular.

[0066] A composição da presente invenção pode ser fornecida em forma de pó que apresenta uma atividade de água inferior a 0,2, por exemplo, na faixa entre 0,19 a 0,05, preferivelmente inferior a 0,15.

[0067] A composição pode ser um pó que não precise de refrigeração. A baixa atividade de água fornece essa estabilidade sem refrigeração e garante que o micro-organismo probiótico, por exemplo, a *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, permanecerá viável mesmo depois de longos períodos de armazenamento. A atividade de água ou a_w é uma medida do estado da energia da água no sistema. Ela é definida como a pressão de vapor da água dividida por aquela da água pura na mesma temperatura; portanto, a água destilada pura tem uma atividade de água de exatamente um.

[0068] Adicionalmente ou alternativamente, o micro-organismo probiótico *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 pode ser fornecido em forma encapsulada.

[0069] Foi constatado que a encapsulação de bactérias tem vantagens terapêuticas e técnicas. A encapsulação aumenta a sobrevida das bactérias e, portanto, o número de bactérias vivas que chegam ao intestino. Adicionalmente, as bactérias são liberadas gradativamente, permitindo uma ação prolongada das bactérias sobre a saúde do indivíduo. As bactérias podem ser micro-encapsuladas, por exemplo, como descrito pela FR2443247 (Société dês Produits Nestlé), incorpora-

da aqui por referencia. Resumidamente, as bactérias podem ser liofilizadas ou secas por pulverização e incorporadas em um gel.

[0070] Os presentes inventores ficaram surpreendidos, em particular, ao constatar que a composição da presente invenção pode ser usada com sucesso para aumentar significativamente a expressão de BDNF pelo hipocampo.

[0071] BDNF (Fator neurotrófico derivado do cérebro) é um fator de crescimento de uma família única de fatores de crescimento polipeptídicos. BDNF e outros fatores neurotróficos, por exemplo, NGF (fator de crescimento de nervo), NT-3 (neurotrofina-3) e NT-4 (neurotrofina-4) são essenciais para a saúde e o bem-estar do sistema nervoso.

[0072] Esse efeito poderia explicar, possivelmente, o efeito observado contra distúrbios funcionais do intestino.

[0073] A expressão "distúrbio GI funcional" se refere a um grupo de distúrbios intestinais que são caracterizados por queixas abdominais sem causa estrutural ou bioquímica que possa explicar os sintomas.

[0074] Distúrbios GI funcionais são bem conhecidos por aqueles versados na técnica e são descritos e definidos, por exemplo, como distúrbios gastrointestinais funcionais com sintomas atribuíveis ao trato gastrointestinal médio ou inferior por Longstrecht e outros, em GASTROENTEROLOGY 2006; 130:1480-1491, por exemplo.

[0075] O distúrbio GI funcional pode ser selecionado do grupo que consiste em síndrome do cólon irritável; dispepsia funcional; constipação funcional; diarreia funcional; dor abdominal funcional; distensão funcional, síndrome da dor epigástrica, síndrome do desconforto pós-prandial ou suas combinações.

[0076] Distúrbios GI funcionais que podem ser tratados ou prevenidos pelo assunto em questão da presente invenção compreendem a ansiedade ligada a distúrbios GI funcionais, por exemplo.

[0077] A ansiedade é um estado psicológico ou fisiológico que re-

sulta em uma sensação desagradável que está tipicamente associada com desconforto, medo ou aflição. A ansiedade é, por exemplo, uma resposta normal ao estresse. Ela pode ajudar a pessoa a lidar com uma situação difícil no trabalho ou na escola, mas – quando excessiva – resulta em distúrbios da ansiedade, um grupo dos quais é a ansiedade ligada a distúrbios GI funcionais.

[0078] Os inventores – sem desejar estar ligados a teoria – acreditam atualmente que o mecanismo subjacente pelo qual as composições da presente invenção são eficazes, está relacionado a modulação do eixo bidirecional microbiano-intestino-cérebro, possivelmente associado, significativamente, com fatores psicológicos.

[0079] Está claro para aqueles versados na técnica que quaisquer características descritas nesse pedido podem ser combinadas livremente sem se afastar do escopo da presente invenção como descrita. Em particular, todas as características descritas para a composição da presente invenção são aplicáveis ao uso da presente invenção e vice-versa.

[0080] Características e vantagens adicionais da presente invenção resultam dos Exemplos e Figuras a seguir.

[0081] A Figura 1 mostra o resultado de um teste com uma caixa escura/caixa clara: tempo total gasto na caixa clara, latência para reentrar na caixa clara e latência para descida em camundongos infectados com *Trichuris muris* (Tm). Tm-meio e Tm-B. longum são camundongos infectados com Tm tratados com meio fresco (controle negativo) e *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, respectivamente; um grupo Tm tratado com a cepa de *L. rhamnosus* (L.rh) é mostrado para comparação.

[0082] Figura 2 mostra os resultados da hibridização in situ na região hipocampal cerebral de camundongos infectados com *Trichuris muris* (Tm). Tm-B. longum são camundongos infectados com Tm tratados com *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999; um grupo Tm tra-

tado com a cepa de *L. rhamnosus* é mostrado para comparação. A quantificação de sinais 35S foi realizada por auto-radiografia e análise da imagem (painel direito superior).

[0083] A Figura 3 mostra os resultados sobre a inflamação colonica medida pelo ensaio da atividade de mieloperoxidase (painel esquerdo) e infiltração de célula mononuclear (painel direito) em camundongos infectados com *Trichuris muris* (Tm). Tm-meio e Tm-B. longum são camundongos infectados com Tm tratados com meio fresco (controle negativo) e *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, respectivamente; um grupo Tm tratado com a cepa de *L. rhamnosus* é mostrado para comparação.

EXEMPLOS:

Materiais e Métodos

Condições da cultura bacteriana:

[0084] Probióticos (*Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 e *L. rhamnosus* NCC4007 para comparação) foram cultivados sob condições anaeróbicas em caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, BioMerieux) (bifidobactéria com cisteína 0,5%). Depois de 24 h a 37ºC, o número de bactérias foi avaliado pela medida da densidade óptica a 600 nm (1 OD600 = 10^8 bactérias/mL). As células bacterianas foram peletizadas e re-suspensas posteriormente em uma concentração de 10^{10}/mL em seu meio de cultura usado. Alíquotas de 1 mL foram mantidas congeladas até o uso.

Animais:

[0085] Camundongos machos BALB/c ou AKR (Harlan, Canadá) foram adquiridos com idade de 6 a 8 semanas e abrigados em uma Unidade convencional livre de patógenos específico na McMaster University Central Animal Facility. Todos os experimentos foram realizados com a aprovação do McMaster University Animal Care Committee.

Experimento:

Infecção crônica com T. muris:

[0086] Camundongos AKR machos foram alimentados por gavagem com T. muris (300 ovos/camundongo) (n=26) ou com placebo (n=9). Os camundongos infectados foram alimentados por gavagem diariamente com L. rhamnosus, B. longum ou MRS fresco a partir do dia 30 por 10 dias. Os camundongos não infectados foram alimentados por gavagem com MRS fresco em uma base diária do dia 30 ao dia 40. No final da administração do probiótico ou do placebo, os camundongos foram submetidos aos testes da caixa escura/caixa clara e de redução. Os camundongos foram sacrificados em seguida e amostras de tecido foram obtidas. Amostras de cólon foram fixadas em formalina para análise histológica ou foram rapidamente congeladas para determinação por MPO. Os cérebros foram congelados instantaneamente em nitrogênio líquido e armazenados para a hibridização *in situ*.

Teste de comportamento:

Teste da caixa escura/caixa clara:

[0087] O comportamento ansioso foi avaliado individualmente nos camundongos usando a caixa escura/caixa clara como descrito na literatura. Resumidamente, cada camundongo foi colocado Np centro de uma caixa com iluminação brilhante (30x30 cm) conectada por uma abertura (10x3 cm) a uma caixa escura menor (30x15 cm). O comportamento locomotor de cada camundongo na caixa clara foi registrado por 10 min por uma camera de vídeo digital e armazenado em um computador para uma análise *off-line*. Vários parâmetros foram avaliados por um observador cego incluindo o tempo total gasto na caixa clara, a latência para re-entrar na caixa clara (tempo gasto na caixa escura depois da primeira entrada) e o número de passagens (número de passagens da caixa escura para a caixa clara).

Teste da descida:

[0088] O comportamento ansioso foi avaliado usando o teste da

descida como descrito na literatura. Resumidamente, cada camundongo foi colocado no centro de uma plataforma elevada (7,5 cm de diâmetro, 3 cm de altura) posicionada no centro de um piso preto. A latência para descer do pedestal foi medida por um cronômetro; a duração máxima do teste foi de 5 min.

Histologia:

[0089] Amostras de cólon foram fixadas em formalina 10% e depois coradas com hematoxilina-eosina. As lâminas foram examinadas sob microscópio para avaliar o infiltrado inflamatório agudo e crônico.

Ensaio de atividade de mieloperoxidase:

[0090] A fim de avaliar a inflamação intestinal aguda, o ensaio de atividade de mieloperoxidase (MPO) foi realizado em tecidos congelados como descrito previamente. A atividade de MPO é expressa em unidades por mg de tecido, onde uma unidade de MPO é definida como a quantidade da enzima capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto em temperatura ambiente.

Hibridização *in situ* no CNS:

[0091] Os níveis de BDNF no hipocampo e CRH no hipotálamo (núcleo paraventricular) foram avaliados pelas hibridizações *in situ* usando sondas de RNA marcadas com 35S em cortes de cérebro congelados como descrito previamente (Whitfield e outros, 1990; Foster e outros, 2002). Resumidamente, os cérebros foram removidos e congelados rapidamente pela imersão em 2-metilbutano a -60ºC e armazenados a -70ºC. O corte criostático de seções coronais com 12 µm de espessura foram montados descongelados em lâminas cobertas com gelatina, secos e armazenados a -35ºC. As seções de tecido foram fixadas com formaldeído 4%, acetiladas com anidrido acético 0,25% em trietanolamina-HCl 0,1 M, pH 8.0, desidratadas e desengorduradas com clorofórmio. Uma sonda de ribonucleotídeo antissenso de BNDF (presente do Dr. James Lauterborn e Dr. C. Gall, University

of California Irvine) e uma sonda de ribonucleotídeo antissenso de CRH (presente do Dr. James Hermam, University of Cincinnati) foram transcritas do plasmídeo linearizado usando o sistema Riboprobe (Promega Biotech, Burlington, ON) com α-35S-UTP (atividade específica > 1000 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA) e as polimerases T3 e T7, respectivamente. As sondas radiomarcadas foram diluídas em um tampão de hibridização (NaCl 0,6 M, Tris 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, pH 8.0, sulfato de dextran 10%, DNA de esperma cisalhado de salmão 0,01%, RNA total de levedura 0,05%, tipo XI, tRNA de levedura 0,01%, 1X solução de Denhardt) e aplicadas as seções de cérebro (aproximadamente 500.000 COM/seção). As lâminas foram incubadas por uma noite a 55°C em uma câmara umidificada. Para reduzir a ligação não específica da sonda, as laminas foram lavadas em solução de RNase 20 µg/mL por 30 min em temperatura ambiente, seguido por 1 h cada em 2x SSC a 50ºC, 0,2X SSC a 55ºC e 60ºC. As laminas foram desidratadas e secas com ar para a auto-radiografia. As lâminas e modelos de plástico 14C foram colocados em cassetes de raios X, colocados em frente a um filme (BioMax MR; Eastman Kodak, Rochester, NY) por 5 dias e revelados (Kodak Medical X-Ray Processor). Imagens auto-radiográficas do filme de seções de cérebro e dos modelos foram digitalizadas com uma câmara compacta com lentes Nikon de 60 mm usando o programa QCapture (Qicam; Quorum Technologies Inc., Guelph, ON) e um sistema de análise de imagem à base de computador Macintosh com o programa Image (http://rsb.info.nih.gov.nih-image). A transmitância luminosa através do filme foi medida delineando a estrutura sobre o monitor. Para o mRNA de BDNF, a transmitância foi convertida para níveis de radioatividade usando a curva de Rodbard aplicada aos modelos. Para o mRNA de CRH, a característica de fatiamento de níveis foi utilizada para medir a transmitância luminosa e a área de sinal de mRNA. A DPM calculada foi então multi-

plicada pela área para produzir uma medida de densidade integrada. As ilustrações foram feitas diretamente das imagens capturadas,

Análise Estatística:

[0092] Os dados são apresentados como média ± desvio padrão ou medianas com faixas inter-quartis como apropriado. Os dados foram analisados usando ANOVA com dois fatores, teste t ou teste t não pareado como apropriado. Um valor de p de < 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo.

Resultados:

[0093] Camundongos cronicamente infectados com o parasita Trichuris muris mostraram um aumento no comportamento semelhante a ansiedade em dois testes de comportamento: 1) No teste da caixa escura/caixa clara, ao animais infectados mostraram uma diminuição no tempo gasto na caixa clara e um aumento na latência para re-entrar no caixa clara; 2) No teste da descida, a infecção aumentou a latência para descer do pedestal (Figura 1). O tratamento com *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, mas não com *L. rhamnosus* NCC4007, induziu uma redução no comportamento semelhante a ansiedade em direção a normalidade. O efeito sobre o comportamento foi correlacionado com uma normalização da diminuição mediada por *Trichuris muris* nos níveis de BDNF no hipocampo por *B. longum* apenas (Figura 2). Ao contrário, o tratamento com *B. longum* assim como com *L. rhamnosus* resultou em uma redução da atividade de mieloperoxidase e a infiltração mononuclear previamente induzida pela infecção com *Trichuris muris* (Figura 3), indicando que a normalização do comportamento era independente do efeito anti-inflamatório das bactérias.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para uso no tratamento e/ou prevenção de um distúrbio gastrointestinal (GI) funcional ligado à ansiedade, selecionado do grupo que consiste em síndrome do intestino irritável, dispepsia funcional, constipação funcional, diarréia funcional, dor abdominal funcional, inchaço funcional, síndrome da dor epigástrica, síndrome da angústia pós-prandial e suas combinações, caracterizada pelo fato de que compreende *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 e um veículo aceitável;

sendo que pelo menos 5% das *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 são viáveis na dita composição; e

sendo que a dita composição compreende entre 10^4 e 10^{10} células de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por dose diária.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que é selecionada do grupo que consiste em uma composição alimentícia, uma composição alimentícia para animais de estimação, um suplemento dietético, uma bebida e/ou uma composição médica.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que contém ainda pelo menos um prebiótico.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o prebiótico é selecionado do grupo que consiste em oligossacarídeos, e, opcionalmente, contém frutose, galactose, manose, soja e/ou inulina; fibras dietéticas; ou misturas das mesmas.

5. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que pelo menos 10% das *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 são viáveis na composição.

6. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que pelo menos 15% das *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 são viáveis na composição.

7. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que pelo menos 80% das *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 não estão se replicando na composição.

8. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que pelo menos 90% das *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 não estão se replicando na composição.

9. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que pelo menos 95% das *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 não estão se replicando na composição.

10. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que compreende entre 10^2 e 10^8 células de *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 por g de peso seco da composição.

11. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que contém ainda uma fonte de proteína, que compreende proteína do soro de leite hidrolisada.

12. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que está na forma de pó, que apresenta uma atividade de água inferior a 0,2.

13. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que está na forma de pó, que apresenta uma atividade de água de 0,19 a 0,05.

14. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizada pelo fato de que está na forma de pó, que apresenta uma atividade de água inferior a 0,15.

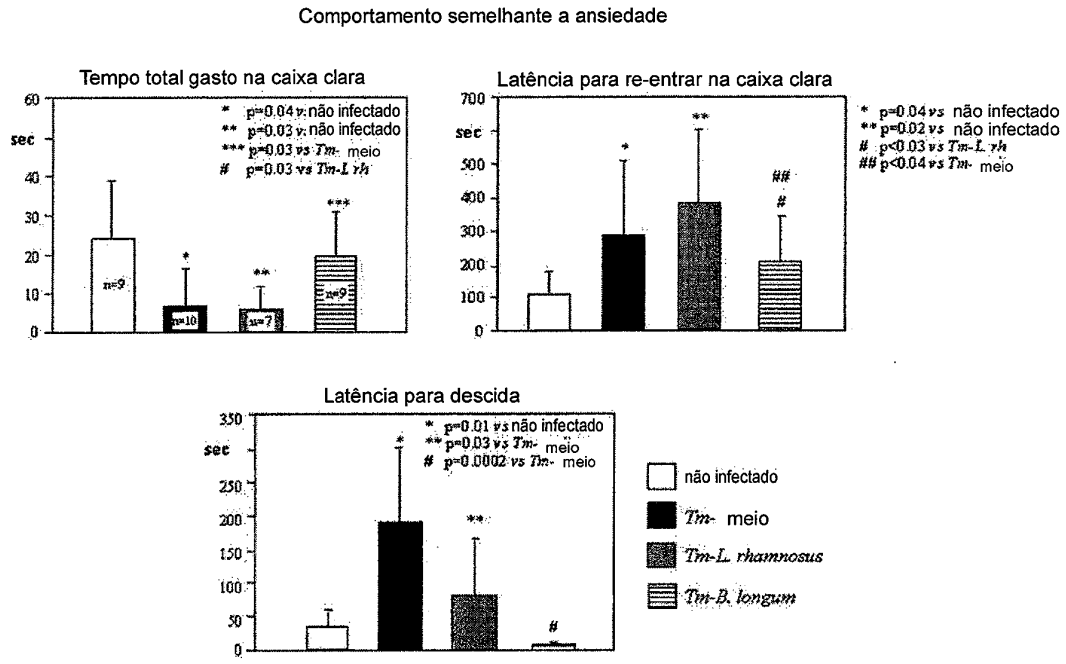

Comportamento semelhante a ansiedade
Tempo total gasto na caixa clara
sec
* p=0.04 vs não infectado
** p=0.03 vs não infectado
*** p=0.03 vs Tm- meio
# p=0.03 vs Tm-L rh
n=9
n=10
n=7
n=9
Latência para re-entrar na caixa clara
sec
* p=0.04 vs não infectado
** p=0.02 vs não infectado
# p<0.03 vs Tm-L rh
p<0.04 vs Tm- meio
Latência para descida
sec
* p=0.01 vs não infectado
** p=0.03 vs Tm- meio
# p=0.0002 vs Tm- meio
não infectado
Tm- meio
Tm-L. rhamnosus
Tm-B. longum

FIG. 1

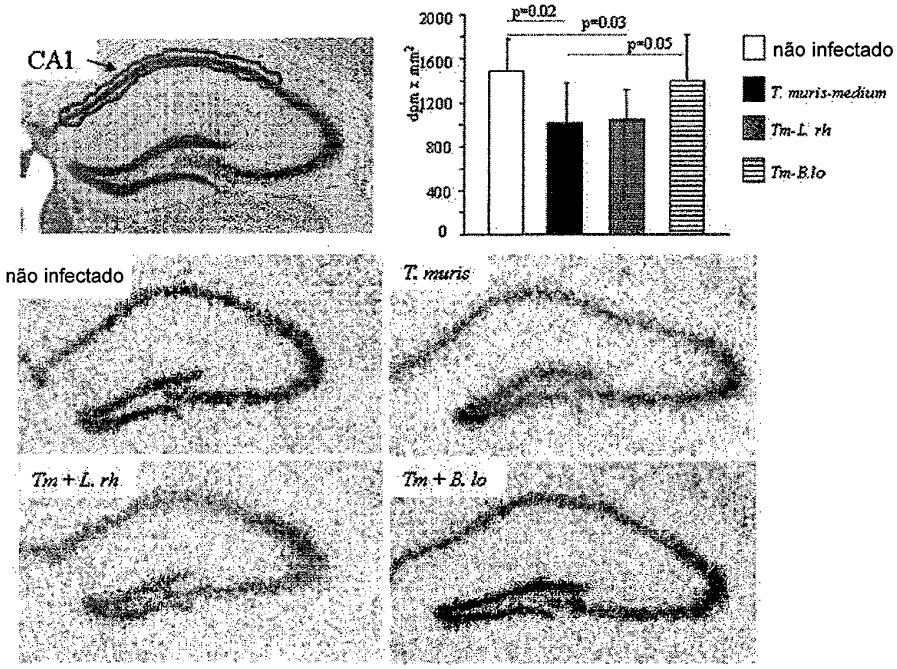

CA1
p=0.02
p=0.03
p=0.05
2000
1600
1200
800
400
0
não infectado
T. muris-medium
Tm-L. rh
Tm-B.lo
não infectado
T. muris
Tm + L. rh
Tm + B. lo

FIG. 2

Inflamação do Cólon

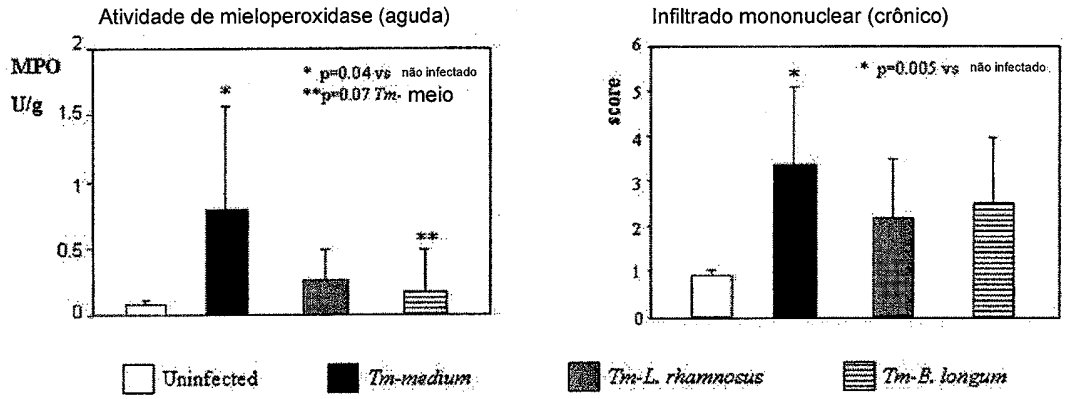


FIG. 3