(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 900 380**

(51) Int. CI.:

A61K 36/064 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2018 PCT/EP2018/071726**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2019 WO19030371**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2018 E 18762232 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.09.2021 EP 3664894**

(54) Título: **Saccharomyces boulardii para el tratamiento de los trastornos del ánimo**

(30) Prioridad:

11.08.2017 EP 17306065

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2022

(73) Titular/es:

BIOCODEX (100.0%)
7 avenue Gallieni
94257 Gentilly Cedex, FR

(72) Inventor/es:

SIMON O'BRIEN, EMMANUELLE;
VERLEYE, MARC y
LE GUERN, MARIE-EMMANUELLE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Saccharomyces boulardii para el tratamiento de los trastornos del ánimo

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un fármaco para la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular para la prevención o tratamiento de trastornos depresivos o trastornos de ansiedad y la ansiedad.

Antecedentes de la técnica

Los trastornos de ansiedad son un grupo de problemas psicológicos y neurológicos que se manifiestan en muchas formas de miedo y ansiedad anormales o patológicos. Por lo tanto, la quinta edición del Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5™) y la 10ª Revisión de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconocen una amplia diversidad de trastornos de ansiedad, tales como ansiedad por separación, mutismo selectivo, fobia específica, fobia social, trastorno de pánico, agorafobia, ansiedad generalizada trastorno, trastorno de ansiedad por una sustancia/fármaco y trastorno de ansiedad inducido por otra afección médica.

Aunque los principales enfoques de la lucha contra estos trastornos siguen siendo la terapia conductual y los fármacos de tipo ansiolítico o antidepresivo, en particular las benzodiazepinas, tales como diazepam (Valium®) o alprazolam (Xanax®), que actualmente constituyen el tratamiento farmacológico de referencia, también se exploran otros enfoques para limitar los efectos secundarios de estos últimos compuestos.

Por lo tanto, Desbonnet et al. (2010) Neuroscience 170:1179 -1188 han demostrado, por ejemplo, que *Bifidobacterium infantis* 35624 permitió reducir las conductas depresivas medidas por la prueba de natación forzada en el modelo de depresión inducida por separación materna en ratas. Sin embargo, la eficacia del probiótico es limitada en comparación con el antidepresivo utilizado en este estudio, concretamente, citalopram.

Por lo tanto, sigue siendo necesario identificar otras alternativas a los ansiolíticos actuales que tengan una eficacia comparable a la de estos últimos.

Saccharomyces boulardii, también llamada *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, es una cepa particular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este probiótico está principalmente indicado en complemento de la rehidratación para el tratamiento de la diarrea. Su utilidad se ha establecido en particular en niños (Villarruel et al. (2007) Acta Paediatr 96:538-541; Szajewska et al. (2007) Aliment Pharmacol Ther 25:257-264) y para la diarrea asociada con la toma de antibióticos (Surawicz et al. (1989) Gastroenterology 96:981-988; Kotowska et al. (2005) Aliment Pharmacol Ther 21:583-590) o infecciones por *Clostridium difficile* (Surawicz et al. (2000) Clin Infect Dis 31:1012-1017).

Sumario de la invención

La presente invención surge de la demostración inesperada, por parte de los inventores, de que la administración de células de levadura *Saccharomyces boulardii* en ratones redujo la ansiedad en estos ratones.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso:

- en la prevención o el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo en un individuo, y/o
- en la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o para su uso como antidepresivo, en un individuo y/o
- en la prevención o el tratamiento de trastornos de ansiedad o la ansiedad, o para su uso como ansiolítico, en un individuo.

En una realización particular de la invención, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso como se ha definido anteriormente están en combinación con al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular a la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica o fármaco que comprende células de levadura *Saccharomyces boulardii* como principio activo y opcionalmente al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular en la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad, o para el uso como antidepresivo o ansiolítico.

En una realización particular de la invención, la composición farmacéutica o el fármaco para un uso como se ha definido anteriormente comprende al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de trastornos

del estado de ánimo en un individuo, en particular a la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión o trastornos de ansiedad o la ansiedad.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la prevención o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo en un individuo, en particular un procedimiento para la prevención o el tratamiento de un trastorno depresivo o depresión, o un trastorno de ansiedad o la ansiedad en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de células de levadura *Saccharomyces boulardii*.

En una realización particular del procedimiento según la invención, las células de levadura están en combinación con al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular a la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad.

La presente invención también se refiere al uso de células de levadura *Saccharomyces boulardii* para la preparación de un fármaco destinado a la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular a la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad.

En una realización particular del uso como se ha definido anteriormente en la invención, el fármaco comprende al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular a la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión o trastornos de ansiedad o la ansiedad.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica o un fármaco que comprende como principio activo:

- células de levadura *Saccharomyces boulardii*, y
- al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular a la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad, opcionalmente en combinación con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también se refiere a productos que contienen:

- células de levadura *Saccharomyces boulardii*, y
- al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular a la prevención o el o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad, como producto de combinación para el uso separado, simultáneo o secuencial para la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo, en particular para la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad, o para su uso como un antidepresivo o ansiolítico.

Descripción detallada de la invención

Como punto preliminar, se recordará que el término "comprende" significa "incluye", "contiene" o "abarca", es decir, que cuando un objeto "comprende" un elemento o varios elementos, también se pueden incluir en el objeto otros elementos distintos de los mencionados. Por el contrario, la expresión "que consiste en" significa "constituido por", es decir, que cuando un objeto "consiste en" uno o más elementos, el objeto no puede incluir otros elementos diferentes de los mencionados.

Además, como comprenderán bien los expertos en la técnica, la expresión "sustancia o composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad" es sinónimo de la expresión "sustancia o composición para su uso en un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad".

Trastornos del estado de ánimo

Como se entiende en esta invención, "la prevención o el tratamiento" de los trastornos del estado de ánimo, incluyendo trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad, tiene como objetivo tratar terapéuticamente, aliviar o prevenir, de manera profiláctica, trastornos del estado de ánimo, en particular, trastornos depresivos o depresión, o ansiedad trastornos o la ansiedad.

Los "trastornos del estado de ánimo" se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen en particular trastornos depresivos o depresión y trastornos de ansiedad o la ansiedad. Los "trastornos depresivos" se conocen bien por los expertos en la técnica y se definen en particular en el capítulo "Trastornos depresivos" ("*Depressive Disorders*") en las páginas 155 a 188 de la quinta edición del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales ("*Diagnostic and statistical manual of mental disorders*", 5ª edición, DSM-5™, 2013, American Psychiatric

Association) y corresponden en particular a las clases F20.4, F25.1, F31.3, F31.4, F31.5, F32, F33, F41.2, F92.0 de la décima revisión de la clasificación internacional de enfermedades versión 2016 (ICD-10:2016).

Preferentemente, los trastornos depresivos según la invención son el trastorno depresivo inducido por una sustancia/fármaco, trastorno disruptivo con desregulación del estado de ánimo, depresión mayor, trastorno depresivo persistente, trastorno depresivo inducido por otra afección, así como, de manera más general, cualquier trastorno depresivo especificado y no especificado.

Los "trastornos de ansiedad" y la "ansiedad" se conocen bien por los expertos en la técnica y se definen en particular en el capítulo "Trastornos de ansiedad" ("*Depressive Disorders*") en las páginas 189 a 233 de la quinta edición del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales («Diagnostic and statistical manual of mental disorders», 5ª edición, DSM-5™, 2013, American Psychiatric Association) y corresponden en particular a las clases F06.4, F40, F41, F93 y F94 de la décima revisión de la clasificación internacional de enfermedades versión 2016 (ICD-10:2016).

Preferentemente, los trastornos de ansiedad o la ansiedad según la invención son la ansiedad por separación, mutismo selectivo, fobia específica, fobia social, trastorno de pánico, agorafobia, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad inducido por una sustancia/fármaco, y trastorno de ansiedad inducido por otra afección médica, así como más generalmente cualquier trastorno de ansiedad especificado y no especificado.

Células de levadura

Saccharomyces boulardii, abreviada *S. boulardii,* es una levadura bien conocida por los expertos en la técnica. Se describe en particular en Hennequin et al. (2001) J. Clin. Microbiol. 39:551-559. Como se entiende en esta invención, las nomenclaturas "*Saccharomyces boulardii*" y "*Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*" (abreviada *S. cerevisiae* var. *Boulardii*) se consideran equivalentes.

Como se entiende en esta invención, la expresión "células de levadura" incluye células de levadura viables o muertas, enteras o en forma de desechos. Preferentemente, al menos parte de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención son viables, en particular viables y cultivables, y más preferentemente una mayoría de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención son viables, en particular viables y cultivables.

La viabilidad de una célula de levadura se puede determinar en particular mediante tinción con azul de metileno y observación microscópica. El número de células viables y cultivables, que define la vitalidad, puede estimarse determinando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) comprendidas en la muestra.

A modo de ejemplo, el número de UFC de células de levadura en una muestra líquida que comprende levaduras se puede determinar esparciendo un volumen determinado de la muestra en un medio sólido, por ejemplo agar, permitiendo el crecimiento de las levaduras e incubando el medio sólido durante un período de tiempo, por ejemplo 48 h, ya una temperatura, por ejemplo 30 °C, lo que permite el crecimiento de colonias de levadura. El número de colonias en relación con el volumen esparcido en el medio sólido permite determinar el número de UFC comprendidas en la muestra. Se describe en particular un protocolo detallado para la determinación de las UFC según la invención en Toothaker y Elmer (1984) Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26:552-556, en el párrafo "Assay for S. boulardii". Además, cuando la muestra de levadura está en forma de un sólido, por ejemplo, un polvo liofilizado, es preferible determinar el número de UFC comprendidas en la muestra después de haber tomado una determinada masa de la muestra en una solución acuosa, en particular agua destilada o una solución de NaCl al 0,9 % a pH 7.

Una "levadura" según la invención es un hongo preferentemente unicelular. Las células de levadura según la invención son de la especie *Saccharomyces boulardii*. *Saccharomyces boulardii* se conoce bien por los expertos en la técnica y se describe en particular en Hennequin et al. (2001) J. Clin. Microbiol. 39:551-559.

De forma especialmente preferente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se obtienen a partir de fármacos de las marcas Ultra-Levure®, Bioflor®, Codex®, Econorm®, Enflor®, Enterol®, Florastor®, Floratil®, Florestor®, Inteflora®, Perenterol®, Perenteryl®, Precosa®, Reflor®, Ultra-Levura®, o a partir de depósitos hechos a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, EE.UU.) bajo la referencia 74012 o a la Colección Nacional de Cultivos y Microorganismos (CNCM, Francia) bajo la referencia I-745.

Preferentemente, también se liofilizan las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención, tales como las células de levadura *Saccharomyces boulardii* de la marca Ultra-Levure®, Bioflor®, Codex®, Econorm®, Enflor®, Enterol®, Florastor®, Floratil®, Florestor®, Inteflora®, Perenterol®, Perenteryl®, Precosa®, Reflor® o Ultra-Levura®.

Ventajosamente, la viabilidad y la vitalidad de las células de levadura obtenidas a partir de liofilizados son superiores a las que se pueden obtener con otros procedimientos de conservación de las células de levadura.

Como se entiende en esta invención, "liofilización" es un procedimiento de conservación en el que las células de levadura se congelan y a continuación se someten a una sublimación del agua congelada que contienen para dar un

liofilizado en forma de polvo de levadura seca que contiene preferentemente menos del 2 % de agua y más preferentemente menos del 1 % de agua. Preferentemente, las células de levadura liofilizadas se obtienen a partir de concentrados de células de levadura. Puede usarse cualquier tipo de procedimiento de liofilización de células de levadura conocido por los expertos en la técnica. Sin embargo, las células de levadura se liofilizan preferentemente de acuerdo con la invención usando el siguiente procedimiento de liofilización:

- cultivar las células de levadura en un medio nutritivo líquido hasta que las células alcancen una fase estacionaria;
- concentrar las células de levadura cultivadas y congelar el concentrado;
- liofilizar el concentrado.

Las células de levadura *Saccharomyces boulardii* liofilizadas están en forma de polvo.

Individuo

El individuo según la invención es un animal, preferentemente un mamífero, y más preferentemente un ser humano. Como será evidente para los expertos en la técnica, el individuo según la invención tiene un trastorno del estado de ánimo según la invención, en particular un trastorno depresivo o depresión según la invención o un trastorno de ansiedad o ansiedad según la invención, o tiene riesgo de presentar un trastorno del estado de ánimo según la invención, en particular un trastorno depresivo o depresión según la invención o un trastorno de ansiedad o ansiedad según la invención, es decir, un individuo según la invención necesita un tratamiento antidepresivo o ansiolítico.

Otra sustancia

Como se entiende en esta invención, la expresión "otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, en particular para la prevención o el tratamiento de un trastorno depresivo o depresión, o de un trastorno de ansiedad o la ansiedad" se refiere en particular a cualquier compuesto o probiótico, diferente de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* destinado a tratar, atenuar o prevenir trastornos del estado de ánimo, en particular trastornos depresivos o depresión, o trastornos de ansiedad o la ansiedad. Por lo tanto, la sustancia es preferentemente una sustancia antidepresiva, también llamada "antidepresivo", o una sustancia ansiolítica, también llamada "ansiolítico".

Como se entiende en esta invención, el término "antidepresor" o "antidepresivo" se refiere en particular a cualquier compuesto o probiótico, diferente de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* destinado a tratar, atenuar o prevenir los trastornos depresivos.

Como se entiende en esta invención, el término "ansiolítico" se refiere en particular a cualquier compuesto o probiótico, diferente de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* destinado a tratar, atenuar o prevenir los trastornos de ansiedad o la ansiedad.

Como se entiende en esta invención, el término "probiótico" representa cualquier microorganismo, preferentemente viable, administrado a un individuo, en particular con vistas a mejorar su estado de salud.

Preferentemente, la otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, en particular para la prevención o el tratamiento de un trastorno depresivo o depresión, o de un trastorno de ansiedad o la ansiedad, se selecciona del grupo que consiste en:

- una benzodiazepina, tal como bromazepam, clobazam, prazepam, lorazepam, clorazepato dipotásico, clotiazepam, loflazepato de etilo, oxazepam, diazepam, alprazolam o clonazepam;
- un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, tal como citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, sertralina o paroxetina;
- un inhibidor de la monoaminooxidasa (MOA), tal como moclobemida o iproniazida;
- un inhibidor de la recaptación de serotonina y catecolamina, en particular norepinefrina, tal como duloxetina, venlafaxina, milnacipran, imipramina, amitriptilina, clomipramina, dosulepina, doxepina, mirtazapina o mianserina; o
- etifoxina, hidroxizina, buspirona, tianeptina, aglomelatina o captodiamina.

Además, en una realización particular de la invención, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención no se administran con otra sustancia ansiolítica o antidepresiva, o destinada a la prevención o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, en particular para la prevención o el tratamiento de un trastorno depresivo o depresión, o de un trastorno de ansiedad o la ansiedad, y la composición farmacéutica, el fármaco o los productos según la invención no comprenden ninguna otra sustancia ansiolítica o antidepresiva, o destinada a la

prevención o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, incluyendo la prevención o el tratamiento de un trastorno depresivo o depresión, o un trastorno de ansiedad o la ansiedad, diferente de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención.

En otra realización particular de la invención, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* no se administran con otro probiótico, y la composición farmacéutica, el fármaco o los productos según la invención no incluyen ningún otro probiótico diferente de *Saccharomyces boulardii*.

En otra realización particular más de la invención, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* no se administran con ácido orótico o una sal del mismo, o con *Bifidobacterium longum*, en particular *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999, y la composición farmacéutica, el fármaco o los productos según de la invención no comprenden ácido orótico o una sal del mismo, o *Bifidobacterium longum*, en particular *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999.

Administración

Preferentemente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii*, la composición farmacéutica, el fármaco y los productos según la invención se encuentran en una forma adecuada para la administración oral. Por lo tanto, las células de levadura *Saccharomyces boulardii*, la composición farmacéutica, el fármaco y los productos según la invención están o se presentan preferentemente en forma de cápsulas o sobres de polvo.

También preferentemente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se administran a una dosis de $0{,}5.10^8$ a 100.10^{10} UFC/kg/d o a una dosis de 0,00125 g/kg/d a 25 g/kg/d.

También preferentemente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se administran a una dosis de 0,5 g/kg a 10 g/kg, más preferentemente a una dosis de 1 a 6 g/kg e incluso más preferentemente a una dosis de aproximadamente 3 g/kg, en particular 1, 2, 3, 4 o 5 veces al día.

Como comprenderán los expertos en la técnica, la cantidad de células de levadura a administrar por unidad de masa (kg) se refiere a la masa del individuo al que están destinadas las células de levadura. Además, cuando la cantidad de células de levadura a administrar se expresa en unidad de masa (g), las células de levadura están preferentemente en forma liofilizada.

Preferentemente, la composición farmacéutica, el fármaco o los productos según la invención, comprenden las células de levadura *Saccharomyces boulardii* en una dosis de 50 mg a 250 mg. Además, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso como se ha definido anteriormente se administran preferentemente en una dosis unitaria de 50 mg a 250 mg.

Como se entiende en esta invención, la expresión "en combinación" o "producto de combinación" significa que (i) las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención y (ii) la otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de un trastorno del estado de ánimo, en particular la prevención o el tratamiento de un trastorno depresivo o depresión, o un trastorno de ansiedad o la ansiedad según la invención pueden combinarse dentro de la misma composición farmacéutica o el mismo fármaco y, por lo tanto, administrarse juntos, o administrarse por separado, es decir, según las vías de administración separadas y/o regímenes de administración separados, siempre que se administren por separado los periodos respectivos de actividad anti trastornos del estado de ánimo de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* y la otra sustancia se superponga total o parcialmente, en particular para que puedan cooperar para ejercer un efecto anti trastornos del estado de ánimo sinérgico.

La invención se explicará adicionalmente de manera no limitativa con la ayuda de las figuras y los siguientes Ejemplos.

Descripción de las figuras

Figura 1

La figura 1 muestra un diagrama de cajas del tiempo transcurrido (en segundos) en los cuadrantes abiertos (eje vertical) por los ratones de control (vehículo, = 20), por los ratones tratados con diazepam (diazepam, n = 10), así como por ratones tratados con células de levadura *Saccharomyces boulardii* (SB, n = 10). Los ratones tratados con SB (3 g/kg, p.o.) durante 12 días o con una sola administración de diazepam (1 mg/kg, i.p.) pasaron significativamente más tiempo en los cuadrantes abiertos que los ratones de control. Se realizó un ANOVA de un factor de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn. El símbolo de tres estrellas (***) representa $p < 0{,}05$.

Figura 2

La figura 2 muestra un diagrama de cajas del porcentaje de tiempo transcurrido en los cuadrantes abiertos (eje vertical) por los ratones de control (vehículo, n = 20), por los ratones tratados con diazepam (diazepam, n = 10), así como por ratones tratados con las células de levadura *Saccharomyces boulardii* (SB, n = 10). Los ratones tratados con SB (3 g/kg, p.o.) durante 12 días o con una sola administración de diazepam (1 mg/kg, i.p.) pasaron

significativamente más tiempo en los cuadrantes abiertos que los ratones de control. Se realizó un ANOVA de un factor de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn. El símbolo de tres estrellas (***) representa p <0,05.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Los inventores evaluaron los efectos de un tratamiento crónico con *Saccharomyces boulardii* (SB) sobre el comportamiento de ansiedad basal de ratones CD1 en el modelo animal de ansiedad llamado laberinto en cero elevado inicialmente descrito por Shepherd et al. (1994) Psychopharmacology (Berl). 116:56-64 y luego retomado por otros (véanse, por ejemplo, Kulkarni et al. (2007) Methods Find Exp Clin Pharmacol. 29: 343-348 y Braun et al. (2011) Pharmacol. Biochem. Behav. 97:406-415).

1. Materiales y procedimientos

1.1. Animales

Se utilizan ratones macho adultos CD1 (producción Charles River) de 7 semanas de edad y con pesos comprendidos entre 27 y 37 gramos en el momento de su llegada después de la aclimatación de al menos 1 semana en la instalación para animales. Las condiciones de alojamiento son las siguientes: tª ambiente = 22 ± 2 °C; alimento "A04" seguro, agua del grifo como agua para beber, ciclo de luz/oscuridad: 12 h/12 h (luz: 7 h/19 h - oscuridad: 19 h/7 h). Los ratones se alojan a razón de 10 por jaula en jaulas del tipo 1500U. Los experimentos se realizan según las recomendaciones europeas (directiva 2010/63/UE) para el uso de animales de laboratorio y se han validado y aprobado por el comité de ética (número de proyecto 2200.01).

1.2. Tratamiento

Un grupo de ratones (n = 10) recibió células de levadura *Saccharomyces boulardii* (SB) CNCM I-745 liofilizadas (lote 9289 con una vitalidad de 31 x 10^9 UFC/g) solubilizadas en agua del grifo, por vía oral a una dosis de 3 g/kg y con un volumen de 10 ml/kg, 2 veces al día durante 12 días (de 9h30 a 10h30 y de 15h30 a 16h30). Un segundo grupo de ratones (n = 10) recibió diazepam (Valium®, Roche, lote F1081F01), un ansiolítico de referencia, a una dosis de 1 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) con un volumen de 10 ml/kg, 30 minutos antes la prueba conductual. El grupo de control (n = 10) correspondiente al tratamiento SB recibió el vehículo líquido solo (agua) con la misma frecuencia y por la misma vía de administración que los animales tratados. El grupo control (n = 10) correspondiente al tratamiento con diazepam recibió el vehículo líquido (NaCl al 0,9 %) con la misma frecuencia y por la misma vía de administración que los animales tratados. Como los resultados de los 2 grupos de control no fueron significativamente diferentes, sus resultados se combinaron para aclarar los gráficos.

1.3. Protocolo

El laberinto en cero elevado consiste en una plataforma redonda (2 cuadrantes abiertos y 2 cuadrantes cerrados) de 50 cm de diámetro y 5 cm de ancho ubicada a 40 cm del suelo. Una pared opaca de 15 cm de altura delimita los cuadrantes cerrados y un borde de 3 mm rodea las zonas abiertas. La luminosidad fue de 30 lux en áreas abiertas y de 3 lux en áreas cerradas. Los movimientos de los animales se detectan mediante un suelo de infrarrojos y se analizan mediante el software VideoTrack V2.5 (ViewPoint). Después de una habituación de al menos 45 minutos, la prueba comienza cuando el animal se coloca en el centro de un cuadrante cerrado y dura 5 minutos.

La entrada a un nuevo cuadrante se considera cuando el animal coloca las cuatro patas en la zona. Los parámetros medidos son: el tiempo empleado y el porcentaje de tiempo pasado en los cuadrantes abiertos. Un mayor nivel de ansiedad se asocia normalmente con una menor cantidad de tiempo en cuadrantes abiertos (zonas más propensas a la ansiedad), sinónimo de actividad exploratoria reducida.

1.4. Análisis estadístico

Los resultados se expresan mediante la media ± SEM. Los resultados se analizan mediante el análisis de varianza unidireccional de Kruskal-Wallis (ANOVA) [tratamiento]. Si el resultado es estadísticamente significativo, se realiza una prueba de comparación múltiple (Dunn) entre los grupos para determinar cuáles difieren al nivel del 5 % (SigmaStat, V3.5, Systat Software Inc.).

2. Resultados

Los resultados del experimento muestran que los ratones tratados con las células de la levadura *Saccharomyces boulardii* (SB) 2 veces al día durante 12 días pasan significativamente más tiempo en los cuadrantes abiertos que los ratones de control (71,6 segundos para los ratones tratados con SB frente a 31,2 s para los ratones de control, o el 23,9 % frente al 10,4 % del tiempo) (p <0,05). Los ratones tratados con diazepam, el ansiolítico de referencia, también pasaron significativamente más tiempo en los cuadrantes abiertos en comparación con los controles (91,9 s o el 30,6 % del tiempo para los ratones tratados con diazepam) (p <0,05) (figuras 1 y 2).

Conclusión

Los resultados de este estudio muestran que un tratamiento crónico de 2 semanas con *Saccharomyces boulardii* en ratones macho CD1 aumenta significativamente el tiempo de permanencia en los cuadrantes abiertos del laberinto en cero elevado, al igual que una administración de diazepam. Por lo tanto, estos resultados demuestran un efecto beneficioso de la levadura *Saccharomyces boulardii* sobre la ansiedad.

EJEMPLO 2

Los efectos antidepresivos de la levadura *Saccharomyces boulardii* se evalúan mediante la administración crónica en ratones macho adultos CD1 en la prueba de natación forzada.

La prueba de natación forzada, bien conocida por los expertos en la técnica, permite medir los efectos antidepresivos de un compuesto farmacológico. Esta prueba se basa en el trabajo de Porsolt et al. (1977) Act. Int. Pharmacodyn. Ther. 229:327-336 y se ha utilizado convencionalmente desde entonces para predecir la eficacia clínica de compuestos antidepresivos.

Brevemente, esta prueba tiene lugar en un recipiente cilíndrico lleno de agua (altura del agua 10 cm) a 23 °C. El ratón se coloca en este recipiente durante 6 minutos y se mide la duración de la inmovilidad del animal durante los últimos 4 minutos.

Los compuestos antidepresivos administrados antes de esta prueba reducen significativamente el tiempo de inmovilidad de los animales.

REIVINDICACIONES

1. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo en un individuo.

2. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso según la reivindicación 1, en la prevención o el tratamiento de trastornos depresivos, en particular seleccionadas del grupo que consiste en trastorno depresivo inducido por una sustancia/fármaco, trastorno disruptivo con desregulación del estado de ánimo, depresión mayor, trastorno depresivo persistente, trastorno depresivo inducido por otra afección médica, y cualquier trastorno depresivo especificado y no especificado, o depresión, o para su uso como antidepresivo, en un individuo.

3. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la prevención o tratamiento de trastornos de ansiedad o la ansiedad, en particular seleccionadas del grupo que consiste en ansiedad por separación, mutismo selectivo, fobia específica, fobia social, trastorno de pánico, agorafobia, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad por una sustancia/fármaco, trastorno de ansiedad causado por otra afección médica y cualquier trastorno de ansiedad especificado y no especificado, o para su uso como ansiolítico, en un individuo.

4. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, estando las células de levadura *Saccharomyces boulardii* liofilizadas.

5. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, estando las células de levadura *Saccharomyces boulardii* en una forma adecuada para una administración oral, en particular en forma de cápsulas o sobres de polvo.

6. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, administrándose las células de levadura a una dosis de 0,00125 a 25 g/kg/d.

7. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en combinación con al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo.

8. Composición farmacéutica o fármaco que comprende células de levadura *Saccharomyces boulardii* como principio activo y opcionalmente al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo, en particular trastornos depresivos o depresión, en particular seleccionados del grupo que consiste en trastorno depresivo inducido por una sustancia/fármaco, trastorno disruptivo con desregulación del estado de ánimo, depresión mayor, trastorno depresivo persistente, trastorno depresivo inducido por otra afección médica y cualquier trastorno depresivo especificado y no especificado, o trastornos de ansiedad o la ansiedad, en particular seleccionados del grupo que consiste en ansiedad por separación, mutismo selectivo, fobia, fobia social, trastorno de pánico, agorafobia, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de ansiedad inducido por una sustancia/fármaco y trastorno de ansiedad inducido por otra afección médica.

9. Composición farmacéutica o fármaco para su uso según la reivindicación 8, en la que las células de levadura *Saccharomyces boulardii* se liofilizan.

10. Composición farmacéutica o fármaco para su uso según la reivindicación 8 o 9, en una forma adecuada para la administración oral, en particular en forma de cápsulas o sobres de polvo.

11. Composición farmacéutica o fármaco para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende las células de levadura *Saccharomyces boulardii* en una dosis unitaria de 50 a 250 mg.

12. Composición farmacéutica o fármaco para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo.

13. Composición farmacéutica o fármaco que comprende como principio activo:

- células de levadura *Saccharomyces boulardii*, y

- al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo,

opcionalmente en combinación con al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. Productos que contienen:

- células de levadura *Saccharomyces boulardii*, y

- al menos otra sustancia destinada a la prevención o el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo,

como un producto de combinación para su uso separado, simultáneo o secuencial para la prevención o tratamiento de trastornos del estado de ánimo, en particular en la prevención o tratamiento de trastornos depresivos o depresión, o trastorno de ansiedad o la ansiedad, o para su uso como antidepresivo o ansiolítico.

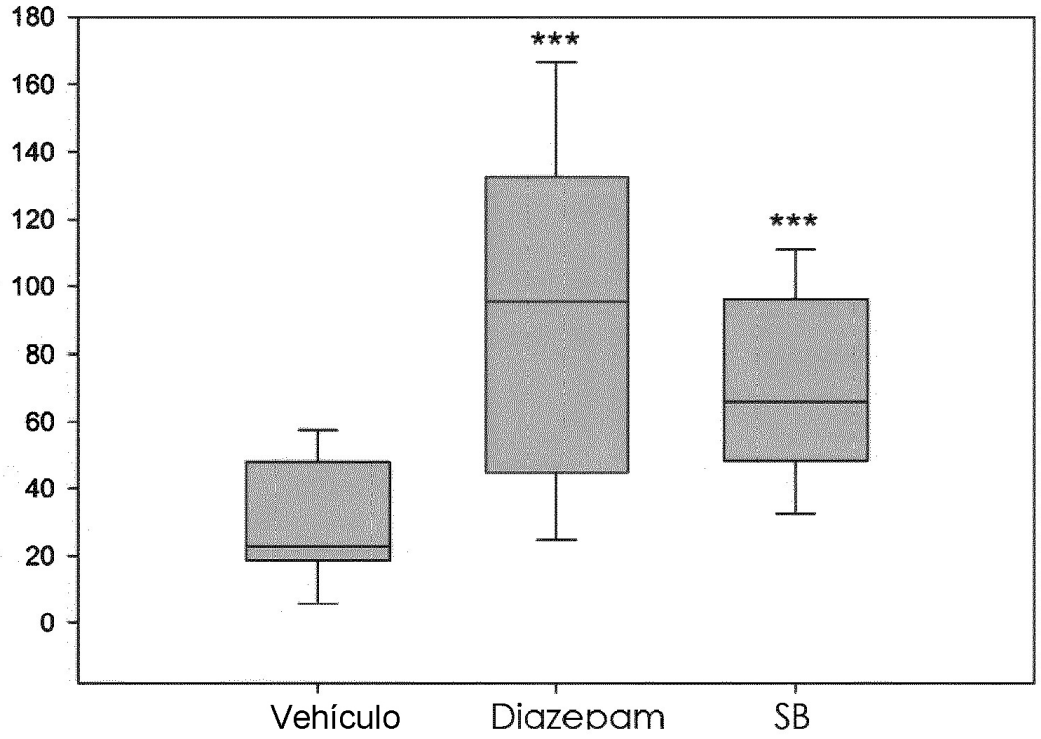


Figura 1

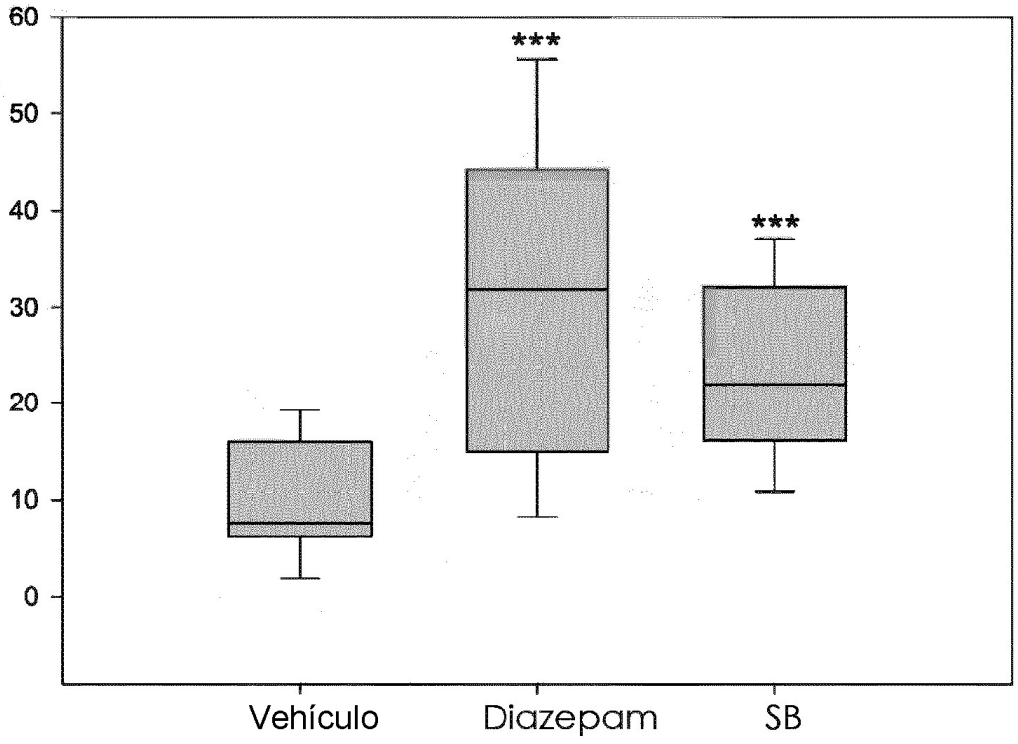


Figura 2