

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 38174 A1** (51) Cl. internationale : **A23C 9/12; C12R 1/01; A61K 35/74**
(43) Date de publication : **30.03.2018**

(21) N° Dépôt : **38174**
(22) Date de Dépôt : **10.12.2013**
(30) Données de Priorité : **18.12.2012 IB PCT/IB2012/057431**
(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/IB2013/060774 10.12.2013**
(71) Demandeur(s) : **COMPAGNIE GERVAIS DANONE, 17 boulevard Haussmann F-75009 Paris (FR)**
(72) Inventeur(s) : **LEGRAIN-RASPAUD, Sophie ; GROMPONE, Gianfranco ; CAPRONNIER, Sandrine ; SMOKVINA, Tamara ; DEGIVRY, Marie-Christine ; LESIC, Biliana ; NEUNLIST, Michel**
(74) Mandataire : **CABINET PATENTMARK**

(54) Titre : **SOUCHE DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. ANIMALIS**
(57) Abrégé : L'invention concerne une nouvelle souche de Bifidobacterium animalis ssp. animalis, qui est capable, entre autres, d'améliorer la fonction du système nerveux entérique, et des compositions comprenant ladite nouvelle souche.

الوصف المختصر

سلالة من البيفيدوبكتيريوم الحيواني SSP. حيواني

يتعلق الاختراع بسلالة جديدة من الشفاء "البيفيدوبكتيريوم" الحيواني SSP. الحيواني. هذه السلالة قادرة، من بين أمور أخرى، على تحسين وظيفة الجهاز العصبي المعوي (ENS)، ولا سيما عن طريق زيادة مستويات البيبتيد المعوي النشط وعائيا (VIP)، وذلك على سبيل المثال لتعزيز حركية الأمعاء أو سلامة ووظائف الحاجز. ويمكن بالتالي استخدام هذه السلالة لمنع و / أو التقليل من انزعاج الجهاز الهضمي أو اضطرابات الجهاز الهضمي.

سلالة من البيفيدوبكتيريوم الحيواني SSP. حيواني

- يتعلق الاختراع بسلالة جديدة من الشقاء "البيفيدوبكتيريوم" الحيواني SSP. الحيواني. هذه السلالة قادرة، من بين أمور أخرى، على تحسين وظيفة الجهاز العصبي المعوي (ENS)، ولا سيما عن طريق زيادة مستويات البيبتيد المعوي النشط وعائيا (VIP)، وذلك على سبيل المثال لتعزيز حركية الأمعاء أو سلامة ووظائف الحاجز. ويمكن بالتالي استخدام هذه السلالة لمنع و / أو التقليل من انزعاج الجهاز الهضمي أو اضطرابات الجهاز الهضمي.
- 5 الجهاز العصبي المعوي هو جهاز عصبي متكامل نظم على طول القناة الهضمية في قسمين صغيرة كبيرة ذات وظائف محددة (فيرنس، ج. أوستن. الجهاز العصبي، 87-96,2000: (1-3)81). تقع الضفيرة العصبية المعوية، بين العضلات الطولية والدائرية، تحتوي على خلايا عصبية تشارك بشكل رئيسي في السيطرة على حركية الجهاز الهضمي.
- 10 الضفيرة تحت المخاطية، وتقع بين العضلات الدائرية والغشاء المخاطي، تحتوي على الخلايا العصبية التي تشارك بشكل رئيسي في السيطرة على وظائف حاجز الأمعاء الظهارية. تتحكم العصبونات المعوية في وظائف الجهاز الهضمي عن طريق تحرير الوسائط العصبية التي تعمل على الخلايا المستهدفة المزودة بأعصاب.
- فيما يتعلق بالجهاز الهضمي، الوسائط العصبية VIP الناتجة عن استرخاء العضلات الملساء (العضلة السفلية العاصرة للمريء والمعدة والمرارة)، ويحفز إفراز الماء إلى العصارة البنكرياسية والصفراوية، ويسبب تثبيط إفراز حمض المعدة وامتصاص تجويف الأمعاء. دورها في الأمعاء هو تحفيز إفراز كمية كبيرة من الماء والشوارد، وكذلك توسيع العضلات الملساء في الأمعاء. توسيع الأوعية الدموية الطرفية، وتحفيز إفراز بيكربونات البنكرياس، وتثبيط الغاسترين محفز إفراز حمض المعدة. تعمل هذه الآثار معا لزيادة القدرة على الحركة. وبالتالي، زيادة VIP يحسن بشكل نافع استرخاء عضلات الجهاز الهضمي.
- يتشكل حاجز الظهارية في الأمعاء عن طريق أحادي طبقة مستمر من الخلايا المتخصصة الاستقطاب التي تم ربطها معا بواسطة البروتينات الرابطة المشتركة الضيقة مثل النطقية المسدة-1 (ZO-1) التي تتحكم في نفاذية الحاجز وكذلك قلبية الخلايا الظهارية. في التجارب المخبرية و الحيوية أظهرت الدراسات أن البروبيوتيك يمكن أن يؤثر على مقاومة الظهارية ويخفض النفاذية عن طريق تحويل ZO-1 (Eun et al., APMIS, 119(1):49-56, 2009; Miyauchi et al., J. Dairy Sci., 92(6):2400-8, 2011) الوسائط العصبية التي جمعتها
- 20 ENS تشارك أيضا في تنظيم نفاذية الأمعاء (Hallgren et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. LiverPhysiol., 275 :G95-103,1998 ; Hayden et al., J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 278 :R1589-94,2000 ; Neunlist et al., Am. J. Physiol. Gastrointest. (LiverPhysiol., 285(5) : G1028-36,2003). على سبيل المثال، الخلايا العصبية المركبة المحسنة للأستيل كولين في القولون الناتجة عن الانفصال الوليدي الأمي يؤدي إلى زيادة نفاذية الظهارية داخل الخلايا لدى الفئران
- 25 المقابل، البيبتيد المعوي النشط وعائيا (VIP) المحرر من الخلايا العصبية تحت المخاطية يزيد مقاومة IEB عن طريق ضبط تحرير البروتين الرابط المشترك ZO-1 في الخلايا الظهارية في الأمعاء (Neunlist et al., J. intern. Med., 293 :G198-203, 2007). في المقابل، البيبتيد المعوي النشط وعائيا (VIP) المحرر من الخلايا العصبية تحت المخاطية يزيد مقاومة IEB عن طريق ضبط تحرير البروتين الرابط المشترك ZO-1 في الخلايا الظهارية في الأمعاء (Neunlist et al., J. intern. Med., 293 :G198-203, 2007). مما يعزز دور VIP في تنظيم وظيفة الحاجز هو دراسة حديثة
- 30 (263(6):577-83, 2008).

PCT/IB2013/060774

- تبيين أن VIP يزيد مقاومة جدار البكتيريا الليمونية رودنتيوم التي تسبب التهاب القولون لدى الفئران (Colin et al., 2009, 735-50, 297(4): Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.). قامت العديد من الدراسات بقياس تأثير بعض البروبيوتيك على الوسائط العصبية ENS، بما في ذلك VIP. Kamm et al. (العصبية المعدية الحركية 2004, 60-53: 16, .) أظهرت آثار خميرة بولاردي على خفض كالبندون 28K- (.....) و عدم التأثير هذا تم الحصول عليه من معلمات عصبية أخرى (VIP, SP, NF-160, ChAT, الخ) للخنزير الصائم.
- 5 ميتوغرياشوك وآخرون (احتياط تجديد، 2006, 345-342: 9) كشفت أن إعداد التكافلية على حركية الأمعاء الدقيقة والغليظة لدى فئران ويستار الكبيرة في السن يزيد فعالية كهربية عضل الأمعاء الدقيقة والقولون بشكل ملحوظ، وأدت إلى زيادة تحرير mRNA لـ VIP ولكن في تأثير غير كبير على تركيز VIP.
- من المعروف أن السلالات البكتيرية يمكن أن توفر منافع ذات صلة بالصحة. وغالبا ما يشار إلى هذه السلالات باسم البروبيوتيك، وتستخدم في الأطعمة. هناك حاجة للسلالات الجديدة التي يمكن إدخالها في الأطعمة، مع الفوائد معدلة متعلقة بالصحة و / أو مع غيرها من الفوائد مثل الخصائص الحسية و / أو التجهيز.
- 10 في الطلب الدولي WO 2011/148219، تم العثور على تركيب تحوي بكتيريا حمض اللاكتيك لزيادة مستويات VIP في ENS، وبالتالي تحسين وظيفة ENS. وكانت بكتيريا حمض اللاكتيك هذه وخاصة اکتوباكيللوسبلانتاروم CNCM I-43-18، بيفيدوباكثيريوم بريف CNCM I-2219، بيفيدوباكثيريوم حيواني SSP اللبني CNCM I-2494، وبيفيدوباكثيريوم بريف CNCM I-4321.
- 15 في هذا السياق، حدد المخترعون سلالة بكتيرية جديدة التي يمكنها، ضمن أشياء أخرى، تعديل الجهاز العصبي المعوي خصوصا من أجل تعزيز حركية الأمعاء وسلامة وظائف الحاجز، وعلى وجه الخصوص ما يزيد من مستوى VIP أكثر من السلالات التي أفصح عنها في WO 2011/148219. وتصنف هذه السلالة كسلالة من سلالات بيفيدوباكثيريوم الحيواني ذات تصنيف حيواني، وأودعت وفقا لمعاهدة بودابست مع CNCM (المجمع الوطني للثقافات للانظمة المصغرة) باسم سلطة الإيداع الدولية. في 6 مارس 2012 تحت رقم I-4602.
- 20 وبالتالي، فإن الاختراع يتعلق بسلالة B. حيواني SSP. حيواني CNCM I-4602. خصائص هذه السلالة هي كما يلي:
- بنية المستعمرة (على MRS الصلب + سيستياين 72 ساعة في 37 درجة مئوية، وظروف لاهوائية): مستعمرات صغيرة، ومستديرة و بيضاء ومنتظمة وشفافة،
- 25 - المورفولوجيا المجهرية (على MRS السائل + السيستين، 16 ساعة في 37 درجة مئوية، والظروف اللاهوائية): سميكة، واسع، ثنائي القطبين، على شكل عصيات.
- التخثير من الركائز التالية (على قطاع CH 50 API، في MRS API المتوسطة عند 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة) ل - أرابينوز، د-الفركتوز، د-اللبن، د-الجلوكوز، د-المالتوز، د-مليبيوز، د-السكروز، و د-رافينوز.
- التحديد الكيميائي الحيوي (على API 20 A شريط، في API 20 A المتوسط في 36 درجة مئوية لمدة 24 ساعة): انعدام البوغ، ملون غرام موجب، على شكل قضيب، وتحمض بوجود د-الجلوكوز، د-السكروز، د-المالتوز، السالسين، د-
- 30 الفركتوز، ل-أرابينوز، و د-رافينوز، والجيلاتين والإسكولين المتحلل في الماء.

PCT/IB2013/060774

- الكشف عن الأنشطة الإنزيمية (على ZYMAPI قطاع، في 37 درجة مئوية لمدة 4 ساعات). استريز (C4)، ليسين اريلاميداز، سيستيناريلاميداز، α -غالكتوزيداز، β -غالكتوزيداز، و α -جلوكوسيداز.
- ويشمل هذا الاختراع أيضا سلالات متحولة أو سلالات تحولت وراثيا مستمدة من سلالة الاختراع، لا تزال ذات نشاط على VIP. ويمكن لهذه السلالات الطافرة أو المتحولة جينيا ان يكون سلالات حيث تم تحور واحد أو أكثر من الجينات الذاتية للسلالة الأم، على سبيل المثال لتعديل بعض خواصه الاستقلابية (مثل قدرتها على تخمر السكريات، ومقاومته للحموضة والبقاء للتنقل في الجهاز الهضمي، بعد التخمير أو إنتاجه الايض). كما أنها يمكن أن تكون سلالات ناتجة عن التحول الجيني للسلالة الأم عن طريق جينة معنية واحدة أو أكثر، على سبيل المثال من أجل إعطاء السلالة المذكورة ميزات فسيولوجية إضافية، أو للسماح لها بتحرير البروتينات للفائدة العلاجية أو اللقاحية التي يرغب في حقنها عن طريق السلالات المذكورة.
- 5
- 10 السلالة من هذا الاختراع، بالإضافة الى الطفرات الموضحة فيما يلي، يمكن استخدامها كبروبيوتيك. يمكن استخدامها للوقاية و/أو التقليل من الانزعاج الهضمي أو اضطراب الجهاز الهضمي. تقلل هذه السلالة من مستويات البيبتيد المعوي النشط وعائيا (VIP) للجهاز المعوي العصبي قيد الدراسة. يمكن ان تثبط زيادة الاسباب المرضية في المواد الغذائية و/أو في الحالة بعد تناول الدواء. يمكن ان تحدث تحسين خواص حاجز الامعاء، على سبيل المثال عن طريق زيادة المقاومة الكهربائية الفوق ظهارية للخلايا المعوية الظهارية.
- 15
- يمكن ان توفر كمية كبيرة من سلسلة قصيرة من الأحماض الدهنية على التخمر و / أو على الهضم، وعلى سبيل المثال زيادة الإنتاج أو تعديل تركيبة الأحماض الدهنية. ويمكن أن يوفر إنتاج منخفض للغاز على التخمر و / أو على الهضم. يمكن أن يكون لها مقاومة مثيرة للاهتمام لإجهاد المعدة. يمكن أن تقدم خصائص حركية جيدة للجهاز الهضمي، على سبيل المثال عند الثدييات حديثي الولادة، ولا سيما للبشر حديثي الولادة. ويمكن تعزيز نضوج الجهاز العصبي المعوي وذلك من وظيفة الأمعاء وحركية الجهاز الهضمي، وبالتالي على وجه الخصوص انخفاض زمن العبور المعوي، زيادة انقباض عضلات الجهاز الهضمي، وتحسين تمعج الجهاز الهضمي، ومنع تأخر إفراغ المعدة، وزيادة تخلصات منسقة للجهاز الهضمي، تقليل وقت افراغ العقي، وتقليل الوقت الذي تبدأ المعدة والأمعاء فيه الحركة بعد الولادة، والسماح بتغذية معوية مبكرة بعد الولادة، عند الثدييات حديثة الولادة، على سبيل المثال البشر حديثي الولادة. يمكن لهذه السلالة أن تشكل نموا جيدا و / أو البقاء على قيد الحياة في منتجات الألبان المخمرة، على سبيل المثال في وجود فيتامين K.
- 20
- 25 ويتعلق هذا الاختراع أيضا بتركيبة تتألف من واحد أو أكثر من سلالة أخرى من بكتيريا بروبويوتيك أو لا، على سبيل المثال واحد أو أكثر من سلالة بكتيرية مختارة من أجناس ملبنة، لكتوكوس، العقدية، والبفيدوبكتيريا. على وجه الخصوص، يمكن لهذه السلالات الأخرى ان تشمل واحدة أو أكثر من سلالة العقدية الحرة، و / أو واحد أو أكثر من سلالة الملبنة البلغارية.
- هذه التركيبة وفقا للاختراع يمكن أن تشمل سلالة واحدة على الأقل من البكتيريا مختارة من مجموعة تتألف من
- 30 ببفيدوبكتيريوم بريف CNCM I-4321، ببفيدوبكتيريوم بريف

PCT/IB2013/060774

- CNCM I-2219، بيفيدوباكثيريوم حيواني SSP، اللبنية CNCM I-2494،
 لاكتوباكيلوسبلانتاروم CNCM I-4318، بيفيدوباكثيريوم ميفيدوم CNCM I-4319، لاكتوباكيلوسرامنوسوس CNCM
 I-4316، ب. بيفيدوم CNCM I-4319، و ل. رامنوسوس CNCM I-4316 تم الكشف عنها في الطلب الدولي WO
 2011/148220. 5
- يمكن لتريكية هذا الاختراع أنتكون في أي شكل مناسبة للتناول، ولا سيما عن طريق الفم. وهذا يشمل المواد الصلبة على
 سبيل المثال، وشبه الصلبة، السوائل، والمساحيق. ويفضل التراكيب السائلة عموما لتسهيل التناول، على سبيل المثال في
 صورة مشروبات.
- أمثلة من تركيبة هذا الاختراع هي تراكيب غذائية، بما في ذلك المنتجات الغذائية. التركيبة يمكن أن تكون على سبيل المثال
 منتجات الألبان، ويفضل منتجات الألبان المخمرة. اختياريًا، سلالات أخرى من بكتيريا حمض اللاكتيك قد تكون موجودة.
 في التجسيد المفضل، سلالات العقديّة الحرة والملبنة البلغارية موجودة. المنتج المخمر يمكن أن يكون في شكل سائل أو
 في شكل مسحوق جاف الذي تم الحصول عليه عن طريق تجفيف السائل المخمر. ويفضل، المنتج المخمر هو منتج
 جديد. المنتج الجديد، والذي لم يمر على خطوات المعالجة الحرارية الشديدة، لديه ميزة أن السلالات البكتيرية الحالية حية.
 المنتج المخمر يمكن على وجه الخصوص أن يكون منتجات الألبان. ويفضل الحليب المخمر و / أو مصّل اللبن المخمر.
 على سبيل المثال، التركيبة الغذائية هي الزبادي أو الحليب المخمر المعتق، في شكل خاثر أو صالح للشرب. المنتج المخمر
 يمكن أيضا أن يكون الجبن أو الخضار المخمرة، مثل فول الصويا المخمر والحبوب والفواكه المعتقة، في شكل خاثر أو
 صالحة للشرب. التركيبة الغذائية الحالية يمكن أن تكون غذاء الرضع، صيغة حليب الأطفال أو تابع لغذاء الأطفال.
 يمكن لتريكية هذا الاختراع أيضا أن تكون نوترسوتيكال أو منتج صيدلاني، مكملات غذائية أو مواد غذائية طبيعية.
 وتشمل تركيبة هذا الاختراع أيضا المكملات الغذائية، والمواد الغذائية الوظيفية. و"المكملات الغذائية" تعين المنتجات
 المصنوعة من مركبات عادة ما تستخدم في المواد الغذائية، ولكن في شكل أقراص، مسحوق، كبسولات، جرة أو أي
 شكل آخر عادة لا ترتبط مع المواد الغذائية، والذي له آثار مفيدة لصحة المرء. و"الأغذية الوظيفية" هي غذاء لديه أيضا
 آثار مفيدة لصحة المرء. على وجه الخصوص، يمكن للمكملات الغذائية والأغذية الوظيفية أن يكون لها تأثير فسيولوجي-
 وقائي أو علاجي - ضد المرض، على سبيل المثال ضد مرض مزمن.
- يمكن لتريكية وفقا للاختراع على سبيل المثال أن تضم ما لا يقل عن 10^5 وحدات مستعمرة مكونة (cfu)، ويفضل أن لا
 يقل عن 10^6 cfu، في الغرام من الوزن الجاف، من سلالة الاختراع، بيفيدوباكثيريوم حيواني SSP. حيواني CNCM
 I-4602. 25
- في تركيبة هذا الاختراع، السلالات البكتيرية، وعلى وجه الخصوص بيفيدوباكثيريوم حيواني SSP. حيواني CNCM I-
 4602، يمكن استخدامها في شكل البكتيريا الكامل التي يمكن أن تعيش أو لا. بدلا من ذلك، فإنها يمكن أن تستخدم في
 شكل بكتيريا محللة أو في شكل كسور بكتيرية. يمكن اختيار الوظائف البكتيرية المناسبة لهذا الاستخدام، على سبيل
 المثال، عن طريق اختبار خصائصها للتخفيف من الآثار على مستويات VIP من نموذج الزرع المشترك الموضح في
 الطلب الحالي. من الأفضل أن الخلايا البكتيرية توجد حية أو كخلايا قابلة للحياة. 30

PCT/IB2013/060774

عندما تكون البكتيريا في شكل البكتيريا الحية، فإن التركيب قد يشمل عادة 10^5 الى 10^{13} cfu، ويفضل على الأقل 10^6 cfu أكثر تفضيلاً على الأقل 10^7 cfu، و يبقى أكثر تفضيلاً أن يكون على الأقل 10^8 cfu، ومن الأفضل على الأقل 10^9 cfu لكل غرام من الوزن الجاف للتركيب. في حالة تركيبات، يتوافق هذا بشكل عام من 10^4 الى 10^{12} cfu / مل، ويفضل على الأقل 10^5 cfu / مل، و أكثر تفضيلاً على الأقل 10^6 cfu / مل، لا يزال أكثر تفضيلاً على الأقل 10^7 cfu / مل، والأكثر تفضيلاً على الأقل 10^9 cfu / مل. 5

سلالة أو تركيبة هذا الاختراع هو مناسبة بشكل خاص لاستخدامها في الوقاية و / أو تقليل الانزعاج الهضمي أو اضطرابات الجهاز الهضمي. ويمكن تناولها في حالة من الانزعاج المعوي أو اضطراب الأمعاء. بالتالي فمن المفيد استخدامها في الوقاية أو معالجة عدم راحة الأمعاء أو اضطراب الأمعاء. هذا الانزعاج أو الاضطرابات التي على سبيل المثال تشمل عدم الراحة المرتبطة بالغاز أو اضطرابات، النفخ، انتفاخ البطن، وآلام في البطن، والإمساك، وفي بعض الحالات الحادة لمتلازمة القولون العصبي (IBS)، ومرض التهاب الأمعاء (IBD). 10

وفقاً لحالة واحدة معينة، السلالة CNCM I-4602، أو التركيب وفقاً للاختراع هو للاستخدام لزيادة مستويات البيبتيد المعوي (VIP) فازو نشطة في الجهاز العصبي المعوي لدى الحالة. على وجه الخصوص، هذه الزيادة في مستوى VIP مفيدة لتحسين حركة المعدة والأمعاء، وتحسين التمعج المعوي و / أو التقليل من نفاذية الأمعاء، ولا سيما في حالة وجود اضطراب مختار من مجموعة تتألف من حركية الأمعاء و / أو اضطراب النفاذية، متلازمة القولون العصبي (IBS) مثل IBS-C، IBS-D، و IBS-PI، ومرض التهاب الأمعاء (IBD)، والإمساك، والالتهابات المعوية، أو في حالة مختارة من مجموعة تتألف من كبار السن والرضع، والسمنة، الذين وظيفتهم المعوية على العموم تتحسن. IBS، أو القولون التشنجي، هو اضطراب أمعاء وظيفي يتميز بألم مزمن في البطن، وعدم الراحة، والنفخ، وتغيير عادات الأمعاء في حالة عدم وجود أي سبب عضوي للكشف. الإسهال أو الإمساك يمكن ان تسود، IBS يصنف على أنه IBS-D أو IBS-C على التوالي، أو كلاهما بالتناوب. IBS قد يحدث بعد الإصابة بالتهاب، ويسمى بعد ذلك IBS-PI (العدوى المسبقة)، وأحداث الحياة المجهدة، أو بداية النضج دون أي مؤشرات طبية أخرى. 15

ويمكن بالتالي استخدام تركيبة هذا الاختراع لعلاج و / أو الوقاية من اضطراب مختار من مجموعة تتألف من اضطرابات حركية الأمعاء، اضطراب نفاذية الأمعاء، IBS (بما في ذلك IBS-D، IBS-C، و IBS-PI)، IBS، الإمساك، والالتهابات المعوية، وخاصة لدى كبار السن أو الذين يعانون من السمنة المفرطة أو عند الرضع. تفاصيل أو مزايا الاختراع الحالي يمكن العثور عليها في المثال غير المحدود أدناه. 20

مثال 1: تأثير بكتيريا حمض اللاكتيك على إنتاج الخلايا العصبية VIP في نموذج الزرع من

ENS الزرع الأولي والخلايا T84

تم دراسة استجابات مختلفة من الخلايا العصبية المعوية الأولية على إنتاج VIP تلي تفاعل 107 سلالات بروتينيك، بما في ذلك بكتيريا حمض اللاكتيك وبشكل خاص البفيدوبكتيريا. 30

السلالات البكتيرية وظروف النمو

PCT/IB2013/060774

كانت تنمو العصيات اللبنية في الإنسان، روقوسا وشارب (MRS) متوسطة (تشخيص بيوكار، بوفي، فرنسا) في 37 ° C في ظروف هوائية لمدة 24 ساعة.

وكانت البفيدوبكتيريا تزرع في وسط محدد الذي يتألف من بيتون تريبتون (بيكتون ديكنسون، الولايات المتحدة الأمريكية) تستكمل أساسا مع الجلوكوز (سيغما، فرنسا)، خلاصة الخميرة (بيكتون ديكنسون، الولايات المتحدة الأمريكية)، وهيمن (كالبيوشم، فرنسا) ونمت عند 37 درجة C في ظروف لاهوائية لمدة 24 ساعة. B. حيواني SSP. اللبني اللبنية المستزرعة في MRS المتوسطة (تشخيص بيوكار)، على أن تستكمل مع السيستين (سيغما، فرنسا)، ونمت عند 37 درجة مئوية في ظروف لا هوائية لمدة 24 ساعة.

الحصول على نموذج الزرع المشترك ENS الزرع الأولي والخلايا T84

10 نموذج الزرع، مقتبس من النموذج الذي وضعه موريز وآخرون. (Biochem. Biophys. Res. Commun., 577-82, 2009) : 382(3) مع الخلايا العصبية المعوية المزروعة مع الخلايا الظهارية في الأمعاء T84 كانت تستخدم لفحص البكتيريا.

تم الحصول على الزرع الأولي ENS الفران كما هو موضح سابقا (Chevalier et al., J. Physiol., 1963-75, 2008) : 586(7)

15 وكان خط خلايا T84 المزروعة في 1: 1 (DMEM-F12، GIBCO) تستكمل مع حرارة غير نشطة 10% FBS و 50 وحدة دولية / مل من البنسيلين و 50 u غ/مل ستربتوسين. تم تصنيف الخلايا في 12 مرشح ترانسويل جيد (كورنينج، نيويورك الولايات المتحدة الأمريكية) في مناطق ذات كثافة من 2×10^5 خلية / إدراج وزرعت للحصول على التقاء. قبل 24 ساعة من إقامة الزرع المشترك، تم استبدال مستنبت من خلايا T84 ب ENS الابتدائية المتوسطة.

بعد يوم واحد من وصول الخلايا الظهارية للالتقاء، تم نقل مرشحات ترانسويل الى 12 لوحات المصنفة في الجزء السفلي مع الخلايا العصبية المعوية. كانت الظهارية والخلايا العصبية المزروعة فيالوسط للخلايا الظهارية.

تم غسل البكتيريا المزروعة في BPS و تم إعادة تعليقها في وسط دولبيكو لتعديل وسط النسر (DMEM): خليط من المغذيات F-12 (لحم الخنزير) (1: 1)، الذي يحتوي على 1% من N-2 الملحق (تقنيات الحياة، سيرجي بوتنواز، فرنسا). تم اختبار كل سلالة من البكتيريا على الأقل في ثلاث نسخ من أجل إجراء تحليل التباين. أضيفت سلات في مرشح الفصل في MOI من 40 بكتيريا / خلايا ظهارية. كعنصر تحكم، لم تتم إضافة أي بكتيريا. بعد 8 ساعات من الحضانة المشتركة، مرشح الفصل يحتوي على الخلايا الظهارية وتم إزالة البكتيريا وتم الحفاظ على ENS الأولية المزروعة لمدة 22 ساعة في الحاضنة (95% الجوية، 5% CO2) عند 37 درجة مئوية. في أبار المراقبة، حفزت الخلايا العصبية مع 40 MK KCI عندما أجريت قياسات VIP

قياسات VIP

ثم، تم جمع الخلايا ENS من لوحات 12 واستخدمت لإعداد مستخلصات البروتين لتقدير حجم الببتيد المعوي فازو نشط (VIP). لتحديد VIP داخل الخلايا، تم استخراج البروتينات داخل الخلايا باستخدام RIPA العازلة للتحلل (ميليور، بيليريك، MA، الولايات المتحدة الأمريكية) يحتوي على كوكتيل مثبط البروتياز (التشخيص روش، مويلا، فرنسا). تم قياس كمية VIP باستخدام انزيم تحليل المناعه المضاف (EIA) مجموعة (مخابر شبه الجزيرة، باشم، SA).

طريقة إحصائية لنموذج ENS

PCT/IB2013/060774

جميع قيم VIP المحدد للسلاسلات تم تطبيعها بالسيطرة السلبية (T84) وفقا للمعادلة التالية: (VIPstrain- VIPT84) / .VIPT84

يتم تصنيف السلاسلات وفقا لقيمة التطبيع المقدر لها المتحصل عليه من النموذج المختلط مع سلالة كآثر ثابت. أعطى النموذج القيمة P المرتبطة بكل سلالة تقدر القيمة الطبيعية. إذا كانت القيمة P أقل من 5% (0.05)، يكون تأثير السلالة كبير .

5

النتائج

يتم عرض النتائج في الجدول 1 أدناه

مراقبة او خصائص البكتيريا	مرجع السلالة او رقمالايدياع	نسبة ارتفاع VIP مقابل الحكم السالب (T84)	قيمة P
KCI كمراقب إيجابي	-	17.5 %	< 0.0005
البيفيدوبكتيريوم الحيواني SSP. حيواني	CNCM I-4602	62.5%	< 0.0005
لاكتوباسيلوسبلانتاروم	CNCM I-4318	59.8%	< 0.0005
بيفيدوبكتيريوم بريفي	CNCM I-2219	27.2%	0.018
البيفيدوبكتيريوم الحيواني SSP. اللبني	CNCM I-2494	23.5%	0.006
بيفيدوبكتيريوم ملونقوم	-	22.8%	0.033
بيفيدوبكتيريوم بريفي	CNCM I-4321	22.5%	0.008
بيفيدوبكتيريوم مبيفيدوم	-	0.18%	0.038
لاكتوباسيلوس كاسي	-	-17.4%	0.049
لاكتوباسيلوسجونسوني	-	-19.4%	0.03
بيفيدوبكتيريوم بريفي	-	-20.0%	0.02
بيفيدوبكتيريوم بريفي	-	-21.6%	0.014
بيفيدوبكتيريوم ملونقوم	-	-21.4%	0.009
بيفيدوبكتيريوم ملونقوم	-	-24.1%	0.008
بيفيدوبكتيريوم ملونقوم	-	-25.7%	0.004
بيفيدوبكتيريوم ملونقوم	-	-33.1%	0.0003
بيفيدوبكتيريوم ملونقوم	W11 (LMG P-21586)	.25.7%	0.004
بيفيدوبكتيريوم ملونقوم	-	-35.0%	0.0007

PCT/IB2013/060774

تستخدم KCI كمراقب إيجابي، لزيادة مستوى VIP في المتوسط بنسبة 15.7%. استطاعت تسعة سلالات تحقيق زيادة كبيرة في مستوى VIP من 18،0 إلى 5،62. الجدول 1 يعطي النتائج التي تم الحصول عليها عن 7 منهم. من بين 9 سلالات، B. حيواني. SSP حيواني CNCM I-4602 تبين زيادة VIP على أعلى مستوى. كانت هناك زيادة 62.5% مقابل المستوى في غياب أي سلالة .

5 من جهة أخرى، تم ملاحظة أن 15 سلالات بشكل ملحوظ ($P > 0.05$) خفضت مستوى VIP. تم الإشارة إلى النتيجة ل 10 من هذه السلالات 15 في الجدول 1.

السلالات الأخرى التي تم اختبارها لم تظهر أي اثر كبير على VIP ($P > 0.05$) ، بما في ذلك بيفيدوبكتيريوم لونقوم ل NCC 2705 (CNCM I-2618)، لاكتوباسيلوسرامنوسوس (ATCC 53103) GG، بيفيدوبكتيريومانفانتيس UCC 3564، بيفيدوبكتيريوم لونقوم Bb536، البيفيدوبكتيريوم الحيواني SSP. اللبني Bi-07 (ATCC SD 5220) ، لاكتوباسيلوسجونسوني (CNCM I-1225) La1 ، لاكتوباسيلوسبلانتاروم (DSM 229v) 10 (9843)، و لاكتوباسيلوسروتري (ATCC 55730) SD 2112

15

20

25

30

عناصر الحماية

1. سلالة البيفيدوبكتيريوم الحيواني ذو الخصائص الحيوانية أودعت في 6 مارس 2012 تحت رقم I-4602 مع CNCM (المجمع الوطني للثقافة و المنظمات المصغرة). 5
2. التركيب يتألف من سلالة من عنصر الحماية 1 و على الأقل سلالة أخرى من البكتيريا مختارة من مجموعة تتألف من بيفيدوبكتيريوم بريف CNCM I-4321، بيفيدوبكتيريوم بريف CNCM I-2219، البيفيدوبكتيريوم الحيواني SSP. اللبني CNCM I-2494، لاكتوباسيلوسبلانتاروم CNCM I-4318، بيفيدوبكتيريوم ميبفيدوم CNCM I-4319، و لاكتوباسيلوسر امنوسوس CNCM I-4316. 10
3. التركيب وفقا لعنصر الحماية 2، والذي هو منتج الألبان، ويفضل أن منتجات الألبان المخمرة 15
4. التركيب وفقا لعنصر الحماية 2 أو 3، والتي تتكون من ما لا يقل عن 10^5 cfu، ويفضل أن لا يقل عن 10^6 cfu، في الغرام من الوزن الجاف، من البيفيدوبكتيريوم الحيواني SSP. الحيواني CNCM I-4602. 20
5. السلالة من عنصر الحماية 1 أو تركيبية أي من عناصر الحماية 2-4، للاستخدام في الوقاية و / أو الحد من عدم راحة المعدة والأمعاء أو اضطرابات المعدة والأمعاء. 25
6. السلالة من عنصر الحماية 1 أو تركيبية أي من عناصر الحماية 2-4، لاستخدامها في زيادة مستويات البيبتيد المعوي VIP النشط وعانها في الجهاز العصبي المعوي للحالة. 30
7. السلالة من عنصر الحماية 1 أو تركيبية أي من عناصر الحماية 2-4، لاستخدامها في تحسين حركية المعدة والأمعاء، وتحسين المقاومة المعوية و / أو التقليل من نفاذية الأمعاء. 35
8. السلالة أو التركيبية للاستخدام من عنصر الحماية 5، حيث يعطى للحالة التي تعاني اضطراب مختار من مجموعة تتألف من اضطرابات حركية الأمعاء، اضطراب نفاذية الأمعاء، ومتلازمة القولون العصبي (IBS)، ومرض التهاب الأمعاء (IBD)، والإمساك، والالتهابات المعوية. 40



**RAPPORT DE RECHERCHE
AVEC OPINION SUR LA BREVETABILITE**
(Conformément aux articles 43 et 43.2 de la loi 17-97 relative à la
protection de la propriété industrielle telle que modifiée et
complétée par la loi 23-13)

Renseignements relatifs à la demande	
N° de la demande : 38174	Date de dépôt : 10/12/2013 ; Date d'entrée en phase nationale : 11/06/2015
Déposant : COMPAGNIE GERVAIS DANONE	Date de priorité: 18/12/2012
Intitulé de l'invention : SOUCHE DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. ANIMALIS	
Le présent document est le rapport de recherche avec opinion sur la brevetabilité établi par l'OMPIC conformément aux articles 43 et 43.2, et notifié au déposant conformément à l'article 43.1 de la loi 17-97 relative à la protection de la propriété industrielle telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.	
Les documents cités par l'examineur dans la partie rapport de recherche sont joints au présent document	
Le présent rapport contient des indications relatives aux éléments suivants :	
Partie 1 : Considérations générales	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 1 : Base du présent rapport	
<input type="checkbox"/> Cadre 2 : Priorité	
<input type="checkbox"/> Cadre 3 : Titre et/ou Abrégé tel qu'ils sont définitivement arrêtés	
Partie 2 : Rapport de recherche	
Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 4 : Remarques de clarté	
<input checked="" type="checkbox"/> Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle	
<input type="checkbox"/> Cadre 6 : Observations à propos de certaines revendications dont aucune recherche significative n'a pu être effectuée	
<input type="checkbox"/> Cadre 7 : Défaut d'unité d'invention	
Examineur: M. Bendaoud	Date d'établissement du rapport : 23/03/2018
Téléphone: 212 5 22 58 64 14/00	

Partie 1 : Considérations générales		
Cadre 1 : base du présent rapport		
Les pièces suivantes de la demande servent de base à l'établissement du présent rapport :		
<ul style="list-style-type: none"> • <u>Description</u> 8 Pages • <u>Revendications</u> 8 		
Partie 2 : Rapport de recherche		
Classement de l'objet de la demande :		
CIB : A 23C 9/12, A 61K 35/74, C 12R 1/01		
Bases de données électroniques consultées au cours de la recherche :		
EPOQUE, Orbit		
Catégorie*	Documents cités avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	N° des revendications visées
A	WO201 114821 9 ; 11/12/2011 ; GERVAIS DANONE SA [FR]; LEGRAIN-RASPAUD	1-8
A	WO2011 48220 ; 01/12/2011 ; GERVAIS DANONE SA [FR]; LEGRAIN-RASPAUD	1-8
A	"Vasoactive intestinal peptide ameliorates intestinal barrier disruption associated with Citrobacter rodentium-induced colitis", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: GASTROINTESTINAL AND LIVER PHYSIOLOGY, vol. 297, no. 4, 24/09/2009; Conlin VS, Wu X, Nguyen C, Dai C, Vallance BA, Buchan AM, Boyer L, Jacobson K.	1-8
*Catégories spéciales de documents cités :		
<p>-« X » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>-« Y » document particulièrement pertinent ; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>-« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>-« P » documents intercalaires ; Les documents dont la date de publication est située entre la date de dépôt de la demande examinée et la date de priorité revendiquée ou la priorité la plus ancienne s'il y en a plusieurs</p> <p>-« E » Éventuelles demandes de brevet interférentes. Tout document de brevet ayant une date de dépôt ou de priorité antérieure à la date de dépôt de la demande faisant l'objet de la recherche (et non à la date de priorité), mais publié postérieurement à cette date et dont le contenu constituerait un état de la technique pertinent pour la nouveauté</p>		

Partie 3 : Opinion sur la brevetabilité*Cadre 4 : Remarques de clarté*

a) Les revendications 1, 5, 6 et 7 ne satisfont pas à l'exigence de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini, conformément à l'article 35 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13.

b) La traduction des revendications 1 et 5 à 7 est imprécise et/ou erronée, et laisse subsister un doute quant à la signification de la caractéristique technique à laquelle elle se rapporte, au point que l'objet de ladite revendication n'est pas clairement défini.

Le CNCM n'est pas "التجمع الوطني الثقافي للمنظمات الصغيرة" « l'assemblée nationale culturelle des organisations miniatures » de même que la souche revendiquée n'améliore pas la « résistance des intestins ».

Cadre 5 : Déclaration motivée quant à la Nouveauté, l'Activité Inventive et l'Application Industrielle

Nouveauté (N)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non
Activité inventive (AI)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non
Possibilité d'application Industrielle (PAI)	Revendications 1-8 Revendications aucune	Oui Non

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure

D1 : WO201148219 ; 11/12/2011 ; GERVAIS DANONE SA; LEGRAIN-RASPAUD

1. Nouveauté (N) :

Aucun des documents mentionnés ci-dessus ne décrit l'utilisation de la souche de *Bifidobacterium animalis animalis* déposée en CNCM 1-4602, d'où l'objet de la revendication 1 est nouveau. Par la suite toutes les revendications dépendantes le sont.

2. Activité inventive (AI) :

La présente demande concerne la nouvelle souche CNCM 1-4602, capable d'améliorer la fonction du système nerveux entérique, en particulier en augmentant les peptides intestinaux vaso-actifs, la souche peut donc être utilisée pour prévenir ou traiter des problèmes gastro-intestinaux.

D1 qui est considéré comme l'art antérieur le plus proche de l'objet de l'inventio décrit des bactéries lactique, les souches CNCM 1-431 8, 9 CNCM 1-221, CNCM 1-2494 et CNCM 1-4321. Lesdites souches augmentent les niveaux de peptides intestinaux vaso-actifs dans le même modèle de coculture que dans la présente demande (D1, tableau 1, page 18). Cependant, la présente demande montre que la souche CNCM 1-4602 augmente le niveau de peptides intestinaux vaso-actifs plus que les souches de D1 (Les résultats expérimentaux

présentés dans le tableau 1, page 8 de la demande, 62,5% d'augmentation par rapport au témoin négatif).

Le problème technique à résoudre peut donc être considéré comme la fourniture d'une souche de bactérie de l'acide lactique améliorée pour la prévention ou le traitement de troubles gastro-intestinaux.

La souche CNCM 1-4602 spécifique ne découle pas de manière évidente, compte tenu de l'avantage technique fournie par ladite souche, à savoir une augmentation plus forte des niveaux VIP, elle est considérée comme plus qu'un simple choix arbitraire. Elle est donc inventive.

Par conséquent, l'objet des revendications 1-8 est conforme au critère d'activité inventive selon l'article 28 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13

3. Possibilité d'application industrielle (PAI) :

L'objet de la présente invention est susceptible d'application industrielle au sens de l'article 29 de la loi 17-97 telle que modifiée et complétée par la loi 23-13, parce qu'il présente une utilité déterminée, probante et crédible