

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 775**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2008** **E 08838386 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012** **EP 2209527**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas que comprenden *L. acidophilus* y *bifidobacterium lactis* para el uso en el tratamiento de un trastorno intestinal funcional**

30 Prioridad:

11.10.2007 US 979187 P

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

03.04.2013

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)**

**Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:

**LEYER, GREGORY y
OUWEHAND, ARTHUR**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 399 775 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones farmacéuticas que comprenden *L. acidophilus* y *bifidobacterium lactis* para el uso en el tratamiento de un trastorno intestinal funcional

Solicitudes Relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad de la sol. de pat. prov. de EE.UU. de N° de serie 60/979.187, titulada "Probióticos para el Uso en el Alivio de Síntomas Asociados a Trastornos Gastrointestinales", presenta el 11 de octubre de 2007.

La presente invención se describe en las reivindicaciones 1-5

Antecedentes de la Invención

- 10 Para la Fundación Roma (McLean, VA), los criterios de diagnóstico Roma II para los trastornos intestinales funcionales (TIF) se refieren a diversos síntomas localizados en el tracto gastrointestinal (GI) medio o inferior. Los TIF incluyen numerosos subgrupos clínicos, tales como síndrome de intestino irritable (SII), diarrea funcional, estreñimiento funcional, meteorismo abdominal funcional, etc. Estos trastornos se caracterizan por una combinación variable de síntomas GI crónicos o recurrentes que no se deben a anomalías estructurales o bioquímicas en los
- 15 pacientes afectados. El SII es el trastorno GI funcional más común, y afecta a un gran número de adultos en todo el mundo. Debido a que la fisiopatología de SII y otros TIFs no se entiende bien y los regímenes farmacológicos disponibles actualmente son muy limitados, sigue existiendo la necesidad de métodos y composiciones adecuadas para aliviar los síntomas de estos trastornos.

- 20 El documento WO 2007/08 5970 describe el uso de bacterias de ácido láctico en la producción de una composición para inducir la saciedad en un sujeto.

Los documentos FR 2848115 y US 2007/0148147 describen composiciones bacterianas que tienen propiedades de inmunomodulación que comprenden al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, *Lactobacillus plantarum* PTA-4799, *Lactobacillus salivarius* PTA-4800, *Lactobacillus paracasei* PTA-4798, *Bifidobacterium bifidum* PTA-4801 y *Bifidobacterium lactis* PTA-4802.

25 Sumario de la Invención

La presente invención proporciona composiciones probióticas para el uso en el alivio de síntomas asociados a trastornos gastrointestinales, tal como se describe en las reivindicaciones 1-5. En particular, la presente invención proporciona composiciones para el uso en el alivio de síntomas asociados a trastornos intestinales funcionales, síndrome de intestino irritable, diarrea funcional, meteorismo funcional, y otros síntomas.

- 30 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una combinación de *L. acidophilus* y *B. animalis subsp. lactis* Bi-07. En ciertas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona una combinación de *L. acidophilus* NCFM® (PTA-4797) y *B. animalis subsp. lactis* Bi-07 (PTA-4802). En ciertas realizaciones especialmente preferidas adicionales, la composición para el uso en la presente invención se proporciona en forma de un suplemento alimenticio que contiene *L. acidophilus* NCFM® y *Bifidobacterium lactis* Bi-07. En ciertas realizaciones preferidas
- 35 adicionales, los suplementos alimenticios que contienen *L. acidophilus* NCFM® y *Bifidobacterium lactis* Bi-07 se administran a sujetos a una dosis en un intervalo de alrededor de 1×10^9 UFC a alrededor de 2×10^{11} UFC de bacterias probióticas totales/día. En ciertas realizaciones alternativas, la dosis es de alrededor de 2×10^{11} UFC de bacterias probióticas totales/día, sin pretender que la invención se limite a una dosis específica, ya que se considera que las diferentes dosis tendrán uso en diferentes situaciones y/o con pacientes diferentes.

- 40 La presente invención también proporciona métodos y composiciones para el uso en la mejora de los síntomas de meteorismo y distensión en pacientes con TIF. En ciertas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona composiciones que comprenden *L. acidophilus* y *B. animalis subsp. lactis* y métodos para su uso en el alivio de los síntomas de TIF. En ciertas realizaciones especialmente preferidas, la presente invención proporciona composiciones que comprenden *L. acidophilus* NCFM® y *B. animalis subsp. lactis* Bi-07 y métodos para su uso en el
- 45 alivio de los síntomas de TIF.

Descripción de la invención

- La presente invención proporciona las composiciones probióticas de las reivindicaciones 1-5 para el uso en el alivio de síntomas asociados a trastornos gastrointestinales. En particular, la presente invención proporciona composiciones para el uso en el alivio de síntomas asociados a trastornos intestinales funcionales, síndrome de
- 50 intestino irritable, diarrea funcional, meteorismo funcional, y otros síntomas.

En particular, la presente invención proporciona cultivos probióticos de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* adecuados para el uso con sujetos humanos. En ciertas realizaciones especialmente preferidas, se proporciona *L. acidophilus* en combinación con *B. animalis*. En realizaciones adicionales, se proporciona *B. animalis subsp. lactis* (también denominado "*B. lactis*" en la presente memoria) en combinación con *L. acidophilus* NCFM®. En realizaciones

adicionales, el *B. animalis* subsp. *lactis* (también denominado "*B. lactis*" en la presente memoria) es *B. animalis* subsp. *lactis* es la cepa de la ATCC denominada PTA-4802, y el *L. acidophilus* NCFM® es la cepa de la ATCC denominada PTA-4797.

5 Durante el desarrollo de la presente invención, se descubrió que la administración de estos probióticos proporcionó alivio de los síntomas GI. Así, la presente invención proporciona métodos y composiciones que comprenden una combinación de la bacteria probiótica reivindicada para el uso en el alivio de los síntomas asociados a TIF. En ciertas realizaciones especialmente preferidas, las composiciones tienen uso en el alivio de síntomas tales como meteorismo y distensión.

Definiciones

10 A menos que se indique de otra manera, la práctica de la presente invención implica técnicas convencionales usadas habitualmente en la microbiología alimentaria, suplementos nutricionales, medicina gastrointestinal, epidemiología, biología molecular, microbiología, purificación de proteínas, y uso y desarrollo industrial de enzimas, todas las cuales están dentro de la experiencia de la técnica.

15 Además, los apartados proporcionados en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención, que se pueden considerar como referencia para la memoria descriptiva en conjunto. Por lo tanto, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente mediante referencia a la memoria descriptiva en conjunto. Sin embargo, para facilitar el entendimiento de la invención, más adelante se proporcionan definiciones para diversos términos.

20 A menos que se defina de otra manera en la presente memoria, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comprende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente memoria tienen uso en la práctica de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen en la presente memoria. Por lo tanto, los términos definidos inmediatamente a continuación se describen más completamente mediante referencia a la memoria descriptiva en conjunto. Además, tal como se usa en la
25 presente memoria, los términos singulares "un", "una", y "el/la" incluyen la referencia plural a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Se debe entender que esta invención no se limita a la metodología particular, protocolos, y reactivos descritos, ya que éstos pueden variar, dependiendo del contexto en el que son usados por los expertos en la técnica.

30 Se pretende que toda limitación numérica máxima dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluya toda limitación numérica inferior, como si tales limitaciones numéricas inferiores se escribieran explícitamente en la presente memoria. Toda limitación numérica mínima dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá toda limitación numérica superior, como si tales limitaciones numéricas superiores se escribieran explícitamente en la presente memoria. Todo intervalo numérico dado a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá todo intervalo numérico más estrecho que se halle dentro de dicho intervalo numérico más ancho, como si tales intervalos numéricos más
35 estrechos se escribieran explícitamente en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alimento" se refiere a cualquier artículo nutricional que proporciona nutrición a una planta y/o animal. No se pretende que el término se limite a cualquier artículo particular, ya que se usa con respecto a cualquier sustancia tomada y asimilada por una planta o animal para mantenerlo vivo. Tampoco se pretende que el término se limite a un alimento "sólido", ya que la definición abarca la nutrición líquida.
40 De hecho, en ciertas realizaciones, se prefiere la nutrición líquida más que los artículos de alimentos sólidos. En ciertas realizaciones preferidas, el término se usa de manera específica en referencia a los alimentos para consumo humano.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "forraje" se refiere a cualquier artículo nutricional que proporciona nutrición a animales que no son humanos. No se pretende que el término se limite a cualquier artículo particular, ya que se usa con respecto a cualquier sustancia tomada y asimilada por una planta o animal para mantenerlo vivo. Tampoco se pretende que el término se limite a un alimento "sólido", ya que la definición abarca la nutrición líquida. De hecho, en ciertas realizaciones, se prefiere la nutrición líquida más que los artículos de
45 alimentos sólidos.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "suplemento nutricional" y "suplemento alimenticio" se refieren a cualquier producto que se añade a la dieta. En ciertas realizaciones especialmente preferidas, los suplementos nutricionales se toman por la boca, y a menudo contienen uno o más ingredientes alimenticios, que incluyen, pero sin limitación, vitaminas, minerales, hierbas, aminoácidos, enzimas, y cultivos de organismos. En ciertas realizaciones especialmente preferidas, los probióticos de la presente invención se proporcionan en ausencia de compuestos bioactivos adicionales. Tal como se usa en la presente memoria, "bioactivo" se refiere a
50 composiciones/compuestos que son activos en el organismo. Los bioactivos incluyen enzimas y otras composiciones que tienen diversas funciones, que incluyen, pero sin limitación, la absorción creciente o decreciente de sustancias nutricionales, la modificación de la composición y subproductos metabólicos de la microflora intestinal, la modificación de la expresión del sistema inmunitario intestinal, etc.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "neutraceutico" se refiere a un suplemento alimenticio que se cree y/o se toma para proporcionar beneficios a la salud.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "probiótico" se refiere a un ingrediente alimentario microbiano que es beneficioso para la salud.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "prebiótico" se refiere a un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa a un ser humano y/u otro animal que ingiere el prebiótico. En las realizaciones preferidas, los prebióticos estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un número limitado de tipos bacterianos en el tracto intestinal, de forma que mejora la salud del ser humano y/u otro animal.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "sinbiótico" se refiere a una mezcla de prebióticos y probióticos.

- 10 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "dolencia" y "enfermedad" se refieren a cualquier desviación o interrupción de la estructura y/o función normal de cualquier parte del cuerpo, órgano, o sistema que se manifiesta mediante un grupo característico de síntomas y signos. El término abarca las enfermedades con etiología y/o patología conocidas o desconocidas.

- 15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratar" se refiere a proporcionar composiciones que dan como resultado la mejora, y/o curación de una enfermedad, trastorno, o síntoma de una enfermedad o afección.

Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "administración oral," y "por vía oral" se refieren a la toma de alimentos y/o suplementos por la boca.

- 20 Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "prevención de una dolencia" y "prevención de una enfermedad" se refieren a las medidas tomadas para evitar la incidencia de una dolencia/enfermedad. En ciertas realizaciones, las medidas "profilácticas" se toman para evitar la enfermedad/dolencia.

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "síntoma de enfermedad" se refiere a cualquier síntoma de enfermedad y/o afección de un paciente. Se usa en referencia a cualquier señal tal como la percibe el paciente.

- 25 Tal como se usa en la presente memoria, el término "signo de enfermedad" se refiere a una indicación de la existencia de una enfermedad/dolencia. Se usa en referencia a cualquier prueba objetiva de enfermedad que sea perceptible para el médico que lleva a cabo el examen y/u otro profesional de asistencia sanitaria.

- 30 Tal como se usan en la presente memoria, los términos "gastrointestinal" y "GI" se refieren al estómago e intestino en el tracto digestivo de seres humanos y otros animales. Sin embargo, tal como se usa también en el contexto de la presente memoria, la expresión "tracto gastrointestinal" ("tracto GI") se refiere a todo el tubo digestivo, desde la cavidad oral hasta el recto. La expresión abarca el tubo que se extiende desde la boca hasta el ano, en el que el movimiento de los músculos y la liberación de hormonas y de enzimas digieren los alimentos. El tracto gastrointestinal comienza en la boca y sigue hasta el esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto y, finalmente, el ano.

- 35 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "tracto digestivo" se refiere a todos los órganos y estructuras implicados en la digestión de sustancias nutricionales (p.ej., alimentos y bebidas), que incluyen la cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, y órganos accesorios (p.ej., el hígado, páncreas, etc.).

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "flora gastrointestinal" se refiere a los microorganismos que habitan el sistema gastrointestinal de seres humanos y otros animales. En ciertas realizaciones especialmente preferidas, la expresión se usa en referencia a organismos bacterianos, pero no se pretende que el término se limite a ello.

- 40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "intestino" se refiere a los intestinos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "post-prandial" se refiere al momento después de una comida. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "síntomas post-prandiales" se refiere a los síntomas que se dan después de que un sujeto haya ingerido una comida.

- 45 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "trastorno(s) intestinal(es) funcional(es)" ("TIF") se refiere a los trastornos que comprenden una combinación variable de síntomas gastrointestinales crónicos o recurrentes que no se explican por anomalías estructurales o bioquímicas presentes en el tracto digestivo de seres humanos y/u otros animales.

- 50 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "síndrome de intestino irritable" ("SII") abarca los criterios de diagnóstico Roma II, tal como se conoce en la técnica. En particular, la expresión se usa en referencia a al menos 12 semanas (que no es necesario que sean consecutivas), en los últimos 12 meses, de molestia o dolor abdominal que tiene al menos dos de las tres características siguientes: alivio con la defecación; y/o inicio asociado con un cambio en la frecuencia de las heces; y/o inicio asociado con un cambio en la forma (p.ej., aspecto) de las heces. Los síntomas que también apoyan un diagnóstico de SII incluyen: frecuencia de heces anormal (p.ej., más de 3

movimientos intestinales por día y/o menos de 3 movimientos intestinales por semana); forma anormal de las heces (p.ej., caprinas/duras o sueltas/acuosas); paso anormal de las heces (p.ej., esfuerzo, tenesmo, y/o la sensación de evacuación incompleta); paso de mucosidad; y/o meteorismo y/o la sensación de distensión abdominal.

5 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "meteorismo abdominal funcional" abarca los criterios de diagnóstico Roma II, tal como se conoce en la técnica. En particular, el término se usa en referencia a al menos 12 semanas (que no es necesario que sean consecutivas), en los últimos 12 meses, de la sensación de hinchazón abdominal, meteorismo y/o distensión visible; y criterios insuficientes para un diagnóstico de displasia funcional, síndrome de intestino irritable, u otro trastorno funcional.

10 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "estreñimiento funcional" abarca los criterios de diagnóstico Roma II, tal como se conoce en la técnica. En particular, la expresión se usa en referencia a al menos 12 semanas (que no es necesario que sean consecutivas), en los últimos 12 meses, con al menos dos de los síntomas siguientes: esfuerzo en más de ¼ de las defecaciones; heces caprinas o duras en más de ¼ de las defecaciones; la sensación de evacuación incompleta en más de ¼ de las defecaciones; la sensación de obstrucción/bloqueo anorrectal en más de ¼ de las defecaciones; la necesidad de maniobras manuales para facilitar más de ¼ de las defecaciones (p.ej., evacuación digital, soporte del suelo pélvico); y/o menos de 3 defecaciones por semana.

15 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "diarrea funcional" abarca los criterios de diagnóstico Roma II, tal como se conoce en la técnica. En particular, la expresión se usa en referencia a al menos 12 semanas (que no es necesario que sean consecutivas), en los últimos 12 meses, durante las cuales el sujeto experimenta heces sueltas (p.ej., blandas) o acuosas que están presentes más de ¼ del tiempo, pero sin dolor abdominal.

20 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "trastorno intestinal funcional inespecífico" abarca los criterios de diagnóstico Roma II, tal como se conoce en la técnica. En particular, se refiere a síntomas intestinales en ausencia de enfermedad orgánica que no se ajustan a las categorías definidas de los trastornos intestinales funcionales.

25 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "alivio de síntomas gastrointestinales" se refiere a la reducción o terminación de los síntomas gastrointestinales, que incluyen, pero sin limitación, el meteorismo, dolor abdominal, diarrea, etc.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "morbilidad" se refiere a la dolencia/enfermedad.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "mortalidad" se refiere a la muerte.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "incidencia" se refiere a la proporción a la cual se da cierto suceso, como el número de casos nuevos de una enfermedad específica que se da durante un cierto periodo de tiempo.

30 Tal como se usa en la presente memoria, el término "prevalencia" se refiere al número total de casos de una enfermedad y/o afección específica que existe en una población dada en un cierto momento.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "secuelas" se refiere a dolencia/enfermedad y síntomas/signos que se dan como consecuencia de un suceso de una afección y/o enfermedad. En ciertas realizaciones, las secuelas se dan mucho después de que se haya resuelto la enfermedad/dolencia inicial.

35 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "infección sub-clínica" se refiere a una infección que no da como resultado la producción/observación de signos o síntomas de enfermedad. A menudo, el paciente está infectado con un organismo que provoca una enfermedad, pero no es consciente de la infección.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "infección" se refiere a la invasión y multiplicación de microorganismos patógenos en el organismo.

40 Tal como se usa en la presente memoria, el término "cultivo" se refiere a cualquier muestra o artículo que contiene uno o más microorganismos. Los "cultivos puros" son cultivos en los que los organismos presentes son solamente de una cepa de un género y especie particulares. Esto contrasta con los "cultivos mixtos", que son cultivos en los que hay presentes más de un género y/o especie de microorganismos. En ciertas realizaciones de la presente invención, tienen uso los cultivos puros. Por ejemplo, en ciertas realizaciones especialmente preferidas, tienen uso los cultivos puros de *Lactobacillus* (p.ej., *L. acidophilus*). Sin embargo, en las realizaciones alternativas, tienen uso los cultivos mixtos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones especialmente preferidas, tienen uso los cultivos compuestos de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium*.

50 Tal como se usa en la presente memoria, el término "*Lactobacillus*" se refiere a miembros del género *Lactobacillus*, en la familia *Lactobacillaceae*. Estas bacterias son bacterias anaerobias facultativamente Gram-positivas que representan una parte importante del grupo bacteriano denominado a menudo "bacterias de ácido láctico". Se han identificado diversas especies de *Lactobacillus*, que incluyen, pero sin limitación, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, etc. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a cualquier especie particular de *Lactobacillus*, en ciertas realizaciones especialmente preferidas, tiene uso *L. acidophilus* NFCM en la presente invención. Se pretende que el género incluya las especies que se han reclasificado

(p.ej., debido a cambios en la especificación de los organismos como resultado de las investigaciones genéticas y de otro tipo) o renombrado con fines de comercialización y/o de otro tipo.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "*Bifidobacterium*" se refiere a los miembros del género *Bifidobacterium*. Estas bacterias son bacterias anaerobias Gram-positivas que son una de las cepas principales de bacterias presentes en la flora gastrointestinal. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ninguna especie particular de *Bifidobacterium*, en ciertas realizaciones especialmente preferidas, tiene uso *B. lactis* Bi-07 en la presente invención. Se pretende que el género incluya las especies que se han reclasificado (p.ej., debido a cambios en la especificación de los organismos como resultado de las investigaciones genéticas y de otro tipo) o renombrado con fines de comercialización y/o de otro tipo.

10 Tal como se usa en la presente memoria, el término "antimicrobiano" se refiere a cualquier compuesto que inhibe el crecimiento o destruye microorganismos. Se pretende que el término se use en su sentido más amplio e incluye, pero sin limitación, compuestos tales como antibióticos producidos de manera natural o sintética. También se pretende que el término abarque los compuestos y elementos que son útiles para inhibir el crecimiento o destruir microorganismos.

15 Tal como se usa en la presente memoria, las expresiones "medio microbiológico", "medio de cultivo", y "medio" se refieren a cualquier sustrato adecuado para el cultivo y la reproducción de microorganismos. El término abarca los medios sólidos colocados en placas, así como los sistemas de cultivo microbiano semi-sólidos y líquidos.

Parte Experimental

El ejemplo siguiente se proporciona para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención, y no se debe considerar limitante del alcance de la misma.

20 En la descripción experimental que sigue, son aplicables las abreviaturas siguientes: °C (grados centígrados); H₂O (agua); gm (gramos); µg y ug (microgramos); mg (miligramos); ng (nanogramos); µl y ul (microlitros); ml (mililitros); mm (milímetros); nm (nanómetros); µm y um (micrómetros); M (molar); mM (milimolar); µM y uM (micromolar); U (unidades); seg (segundos); min(s) (minuto/minutos); hr(s) (hora/horas); de y DE (desviación estándar); PBS (solución salina taponada con fosfato [NaCl 150 mM, tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7.2]); p/v (peso respecto de volumen); v/v (volumen respecto de volumen); UFC (unidades formadoras de colonias); a. (años; años de edad); Becton Dickinson (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD); (Difco Laboratories, Detroit, MI); GIBCO BRL o Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); UNC (Universidad de Carolina del Norte); y ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA).

30 Los organismos usados en el desarrollo de la presente invención fueron *L. acidophilus* NCFM® (PTA-4797) y *B. animalis subsp. lactis* Bi-07 (PTA-4802). Estas cepas se cultivaron a 37 °C, en medio MRS (p.ej., Difco, Becton Dickinson) que contenía un 0,05% de cisteína. Los cultivos se incubaron durante 48-72 horas en jarras anaerobias BBL GASPAK™ que contenían una atmósfera de H₂/CO₂ (Becton-Dickinson). Para la producción a gran escala, las cepas se cultivaron en medios de fermentación, se recogieron mediante centrifugación y se crioestabilizaron mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. La disolución crioestabilizada se liofilizó.

35 La presente invención se estudió mediante el uso de un estudio controlado por placebo, con doble enmascaramiento, aleatorizado, prospectivo, para determinar la eficacia de las bacterias probióticas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) en pacientes con TIF. La duración total del estudio fue de 14 semanas. Hubo un periodo de cribado de 2 semanas para determinar la elegibilidad, los síntomas predominantes, y la gravedad en el momento inicial. Esto fue seguido por una fase de tratamiento de 8 semanas, en la que los pacientes se distribuyeron aleatoriamente en 2 grupos de tratamiento (es decir, tratamiento activo con el suplemento probiótico o placebo). La aleatorización se mantuvo oculta al paciente y a los investigadores. También hubo una fase de seguimiento de 4 semanas tras la interrupción de la fase de tratamiento.

45 Los sujetos se reclutaron de la clínica GI de pacientes ambulatorios de los hospitales de la Universidad de Carolina del Norte, de las instalaciones clínicas locales, y mediante anuncios. Los cálculos de potencia para este estudio se basaron en los efectos informados de los probióticos sobre el dolor abdominal (véase, p.ej., Niedzielin et al., Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., 13:1143-1147 [2001]), ya que es un síntoma fundamental de SII. Los cálculos de potencia indicaron que el estudio tenía una potencia adecuada.

50 Se determinó que los sujetos que cumplieron todos los criterios de inclusión siguientes fueron elegibles para este estudio: se recibió el consentimiento informado firmado; 18 - 65 años de edad; paciente ambulatorio; presencia de SII, o diarrea funcional, o meteorismo funcional según los criterios Roma II para trastornos GI funcionales, y el sujeto había tenido los síntomas anteriores durante al menos dos semanas, a pesar de la terapia actual (para los pacientes con diarrea, se usó la definición de una media de ≥2 movimientos intestinales por día, o una puntuación media de ≥ 4 en la escala de forma de heces de Bristol por semana); los síntomas del sujeto fueron síntomas de una gravedad leve a moderada (la gravedad de los síntomas se determinó en el momento inicial y al final del periodo de cribado de 2 semanas para determinar la elegibilidad antes de la aleatorización); el sujeto había tenido una sigmoidoscopia flexible normal o colonoscopia en los últimos 5 años (los sujetos han tenido que someterse a una colonoscopia si la edad es > 50 a.).

Los sujetos potenciales se excluyeron si fueron aplicables cualquiera de los siguientes criterios: el sujeto tuvo inflamación o anomalía estructural del tracto digestivo (p.ej., enfermedad inflamatoria intestinal (EII), úlcera duodenal (UD) o úlcera gástrica (UG), obstrucción, o colelitiasis sintomática); el sujeto tuvo síntomas graves relacionados con TIF en el momento inicial; el sujeto tiene un estado médico grave e inestable; el sujeto tiene diabetes mellitus insulino dependiente; el sujeto tuvo un diagnóstico psiquiátrico mayor o un intento de suicidio en los últimos dos años; el sujeto tuvo un historial de abuso del alcohol o de sustancias en dos años; el sujeto tiene resultados de laboratorio anormales (que incluyen ALT o AST > 2,5 veces el nivel normal, creatinina sérica >2,0 mg/dl, valor de TSH anormal sin tratar); el sujeto había sido tratado por una neoplasia maligna en los últimos 5 años (excepto cáncer de piel BCC o SCC); al sujeto se le había diagnosticado deficiencia de lactasa, y esto podría haber explicado sus síntomas (es decir, los síntomas se resolvieron o se redujeron de manera significativa con una dieta exenta de lactosa); el sujeto participó en un estudio farmacológico en los últimos 21 días; el sujeto recibió un tratamiento con antibióticos durante las últimas 8 semanas (para los sujetos en tratamiento con antibióticos, fue necesario un periodo de reposo farmacológico de 8 semanas); el sujeto se había sometido previamente a cirugía gástrica o intestinal significativa; o la sujeto estaba embarazada o lactando, o no estaba dispuesta a mantener un tratamiento anticonceptivo eficaz durante el transcurso del estudio.

Se incluyeron cincuenta y siete (57) sujetos distribuidos aleatoriamente (mujeres y hombres) que cumplieron los criterios Roma II para trastornos intestinales funcionales (TIF), SII, o diarrea funcional, y que tuvieron al menos 6 meses de síntomas recurrentes en este estudio. De estos, 30 se distribuyeron aleatoriamente en el grupo de tratamiento activo y 27 se asignaron al grupo de placebo. De estos individuos, 33 fueron pacientes de SII (17 en el grupo activo y 16 en el grupo de placebo); 21 fueron pacientes de TIF (TIF no SII) (12 en el grupo activo y 9 en el grupo de placebo); 3 fueron pacientes de diarrea funcional (1 en el grupo activo y 2 en el grupo de placebo). La siguiente tabla proporciona información demográfica para cada uno de los individuos en los grupos activo y de placebo.

Tabla 1. Datos Demográficos de los Grupos Activo y Placebo		
	Grupo Activo (n=30)	Grupo de Placebo (n=27)
Edad (media; D.E.)	36,0; 10,9	37,0; 14,7
Sexo (% de mujeres)	72,4	71,4
Nivel Educativo (% en cada categoría):		
Algún Curso de Educación Secundaria	3,3	0,0
Graduado de Educación Secundaria	30,0	7,4
Algún curso de Universidad o Escuela Técnica	23,3	40,7
Completados 4 Años de Universidad	20,0	25,9
Nivel Educativo (% en cada categoría):		
Algún Curso de Departamento de Postgrado	23,3	11,1
Completado el Postgrado	3,3	14,8
Raza/Etnia:		
Asiático	0,0	7,4
Afroamericano	16,7	3,7
Blanco	83,3	85,2
Otro	0,0	3,7

Estado Civil:		
Soltero/Nunca Casado	46,7	53,6
Casado/Cohabitación	46,7	39,3
Separado/Divorciado	6,7	7,1

Los sujetos se vieron en la clínica 4 veces durante este estudio: (1) al comienzo del periodo de cribado (semana -2); (2) al comienzo de la fase de tratamiento (semana 0); (3) a la mitad de la fase de tratamiento (semana 4); y (4) al final de la fase de tratamiento (semana 8). Se contactó con los sujetos por teléfono dos semanas (semana 10) y cuatro semanas (semana 12) después de la finalización de la fase de tratamiento. En cada una de las visitas de estudio, se estudiaron en los sujetos las medidas de respuesta primarias y secundarias mediante el uso de las siguientes herramientas: GSA ("ansiedad específica de síntomas gastrointestinales") Dem Med ("descriptores médicos principales") (visita 1 solamente); inicio del cuestionario de síntomas (visita 1 solamente); cuestionario de tratamiento antibiótico/probiótico (visita 1 solamente); escala de satisfacción; BDI - II ("Inventario de Depresión de Beck-II"); Calidad De Vida (SII-QOL); cuestionario de síntomas asociados a la alimentación; índice de gravedad de SII; medicaciones concomitantes; y revisión de sucesos adversos.

Durante (semana 12) y al final (es decir, semana 14) de la fase de seguimiento, se contactó con los sujetos por teléfono y se les pidió que enviaran sus tarjetas diarias. Se pidió a los sujetos que registrasen sus síntomas en las tarjetas diarias comenzando al inicio del periodo de cribado y terminando 4 semanas después de haber interrumpido el tratamiento. Los sujetos registraron el número de movimientos intestinales, la consistencia de las heces para cada movimiento intestinal, el dolor abdominal, el meteorismo, y los síntomas post-prandiales. Además, los sujetos registraron el número de píldoras tomadas cada día. Durante las conversaciones telefónicas, se preguntó a los sujetos sobre el alivio global de sus síntomas GI funcionales, el bienestar global, las medicaciones concomitantes, y sobre el estado de cualquier suceso adverso del estudio (si lo hubo). Los síntomas de los sujetos se puntuaron diariamente.

Se sometió a todos los sujetos a diversos análisis de laboratorio, que incluyeron una prueba de aliento para determinar el sobrecrecimiento bacteriano y la intolerancia a la lactosa durante el periodo de cribado (semana -2 a 0). Los que obtuvieron resultados negativos durante los últimos 24 meses fueron aceptables; los pacientes que fueron positivos se excluyeron. Se llevaron a cabo análisis de sangre para estudiar la seguridad del tratamiento, y al final del cribado y antes del comienzo del tratamiento (semana 0) (momento inicial), a la mitad del tratamiento (semana 4) y al final del tratamiento (8 semanas). Esto incluyó la VSG (velocidad de sedimentación eritrocitaria) como marcador de inflamación, recuento de sangre completa con plaquetas y recuento diferencial (hematocrito, hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos, y recuento diferencial que incluyó: neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, cayados), sodio, cloruro, potasio, calcio, fósforo, creatinina, BUN, proteínas totales, pruebas de función hepática, albúmina, y prueba de embarazo en sangre. Los resultados de laboratorio obtenidos dentro de los seis meses de la visita de cribado se usaron como valores iniciales. Los resultados de laboratorio se registraron para cada paciente. Aunque la investigación de la microflora fecal fue una opción, se tomó la decisión de no llevar a cabo este aspecto de la investigación, aunque es un aspecto que se podría incluir en investigaciones posteriores.

Tal como se indicó anteriormente, los sujetos se asignaron a uno de dos grupos de tratamiento, concretamente tratamiento activo frente a placebo. El grupo de tratamiento activo recibió suplementos que contenían *L. acidophilus* NCFM® y *Bifidobacterium lactis* Bi-07. Los pacientes del grupo de tratamiento activo recibieron dosis orales de cantidades equivalentes de cada organismo a 1×10^{11} UFC totales (5×10^{10} UFC por cepa). El placebo y los productos probióticos se administraron dos veces por día en forma de cápsula, para una dosis diaria total de 2×10^{11} UFC.

A lo largo del estudio, se dejó que los sujetos mantuvieran sus medicaciones actuales, estables (≥ 1 mes) (estas incluyeron antiespasmódicos, suplementos de fibra, medicaciones antidiarreicas y/o laxantes, y antidepressivos). Sin embargo, se pidió a los pacientes actualmente con medicaciones "anti-gas" para sus síntomas intestinales que interrumpieran estas medicaciones al menos 7 días antes de la visita de cribado (es decir, no se permitió a los sujetos tomar estas medicaciones en la última semana antes de entrar en la fase de cribado del estudio). Para los que tomaban antibióticos por cualquier razón, fue necesario un período de reposo farmacológico de al menos 8 semanas antes de unirse al estudio. También se pidió a los sujetos que se abstuvieran de estas medicaciones durante el resto del estudio. Se pidió a los participantes que mantuvieran las mismas medicaciones para evitar cualquier cambio en sus medicaciones estables, y que evitaran tomar ninguna medicación voluntaria (es decir, a discreción) durante la participación en el estudio. Los cambios en las medicaciones durante el periodo de estudio se revisaron en cada visita de estudio y se registraron.

Además, se dejó que los sujetos consumieran probióticos involuntarios (es decir, yogures). Sin embargo, se les pidió que evitaran los yogures enriquecidos en bacterias y las leches fermentadas durante el estudio. Además, no se permitieron los suplementos probióticos durante el estudio, y se pidió a los sujetos que dejaran estos suplementos al menos 8 semanas antes de unirse al estudio.

5 Se llevó a cabo el análisis de los datos para determinar el cambio significativo en todas las puntuaciones de las medidas de respuesta y análisis de laboratorio entre el pretratamiento (es decir, el final de la fase de cribado [semana 0]), la finalización de la fase de tratamiento (semana 8), y la finalización del período de seguimiento (semana 12). Se realizaron determinaciones del grado de respuesta de cada una de las medidas de valoración específicas para determinar la respuesta global y la respuesta sintomática más específica/positiva. La medida del grado de respuesta incluyó el alivio global de los síntomas GI funcionales, todos los síntomas funcionales relacionados con GI, el índice de gravedad de SII, y la calidad de vida relacionada con la salud. El análisis se llevó a cabo para todo el grupo de TIF y, de una manera extrapolada, por separado para cada subgrupo (es decir, SII, diarrea funcional, y trastorno intestinal funcional no SII). La tolerabilidad y seguridad del tratamiento se analizó con respecto a la incidencia de sucesos adversos y cambios en los análisis de laboratorio. Se mantuvo un registro actualizado de los sucesos adversos informados y de las anomalías de laboratorio para cada paciente y para toda la población en estudio.

15 Los resultados indicaron que el meteorismo y la distensión mejoraron significativamente en el grupo de tratamiento probiótico, en comparación con el grupo de placebo a las 4 semanas ($4,10 \pm 3$ frente a 17 ± 3 , $p=0,009$, respectivamente), y mostraron una tendencia intensa de mejora a las 8 semanas ($4,26 \pm 3$ frente a $5,84 \pm 3$, $p=0,06$, respectivamente). Los análisis secundarios con el uso solamente del subgrupo de SII ($n=33$) mostraron resultados similares con una mejora significativa en el meteorismo y la distensión en el grupo probiótico ($n=17$), en comparación con el grupo de placebo ($n=15$) ($4,24 \pm 3$ frente a $6,73 \pm 3$, $p=0,03$, respectivamente). Estos resultados indican que los suplementos alimenticios que contenían *L. acidophilus* NCFM® y *Bifidobacterium lactis* Bi-07 (2×10^{11} UFC de bacterias probióticas totales/día) mejoraron significativamente los síntomas de meteorismo y distensión en los pacientes con TIF. Así, se contempla que estos probióticos tendrán uso en el tratamiento de pacientes con estos trastornos. De manera importante, se indica que estos probióticos se proporcionaron a los sujetos sin la adición de otros bioactivos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* para el uso en la mejora de los síntomas de un trastorno intestinal funcional.
- 5 2. La composición que comprende *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* para el uso según la reivindicación 1, proporcionada en forma de un suplemento alimenticio.
3. La composición que comprende *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* para el uso según la reivindicación 1, en la que dichos *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* se deben administrar a dicho individuo a una dosis de 1×10^9 a 2×10^{11} UFC de bacterias probióticas totales/día.
- 10 4. La composición que comprende *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* para el uso según la reivindicación 1, en la que dichos *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* se deben administrar a dicho individuo a una dosis de 2×10^{11} UFC de bacterias probióticas totales/día.
5. La composición que comprende *L. acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* para el uso según la reivindicación 1, en la que dichos síntomas del trastorno intestinal funcional comprenden meteorismo y distensión.