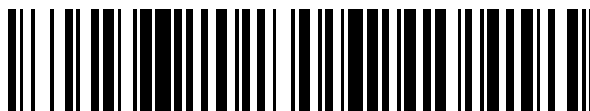


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 253**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74

(2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011** **E 11719626 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015** **EP 2685994**

54 Título: **Bacterias probióticas que tienen actividad antioxidante y uso de las mismas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.02.2016

73 Titular/es:

PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)

Via E. Mattei 3

28100 Novara, IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI;

STROZZI, GIAN PAOLO y

MOGNA, LUCA

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 561 253 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

Bacterias probióticas que tienen actividad antioxidante y uso de las mismas

5 La presente invención se refiere a ciertas cepas bacterianas para su uso en el tratamiento de estrés oxidativo.

Es muy sabido que todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Cualquier alteración en el estado redox puede producir efectos tóxicos debido a la producción, y posterior acumulación, de peróxidos y radicales libres. Es únicamente el exceso de los mismos lo que implica el estrés oxidativo que parece asociarse a muchas patologías humanas, tales como: aterosclerosis, hipertensión arterial, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, diabetes mellitus, colitis, artritis reumatoide.

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio entre los niveles de radicales libres producidos durante el metabolismo normal de las células y los niveles de antioxidantes endógenos, que son capaces de proteger a los tejidos del daño oxidativo. La rotura de este equilibrio, debido tanto a un aumento en la producción de radicales como a una disminución en los niveles de antioxidantes, produce como consecuencia el comienzo de alteraciones en la estructura y función de nuestras células. Una célula posee fisiológicamente la capacidad de realizar acción antioxidante y, por tanto, protectora contra radicales libres gracias a la presencia de mecanismos de defensa específicos, tanto de una naturaleza enzimática como no enzimática.

Aún cuando nuestras células poseen una capacidad de defensa, muchos factores de nuestra vida cotidiana contribuyen a disminuirla.

Es muy sabido, por ejemplo, que el humo del tabaco y el consumo de alcohol y fármacos, además de una excesiva exposición no controlada a radiación ionizante, pueden contribuir a reducir la capacidad de defensa de las células.

Además, el ritmo de la vida cotidiana, combinado con una dieta desequilibrada que contiene poca fruta, verduras y pescado, no permite ciertamente que nuestro cuerpo reciba la suplementación adecuada de vitaminas, minerales y oligoelementos que tienen alta actividad antioxidante. Por tanto, es necesario suplementar la dieta con una cantidad de sustancias antioxidantes específicas que realmente son capaces de desempeñar una actividad antioxidante dentro del cuerpo humano.

En particular, es necesario tener una composición que, una vez introducida en el cuerpo, sea capaz de suplementar la cantidad de sustancias antioxidantes normalmente presentes en el cuerpo, de tal forma que contribuyan a reducir el estrés oxidativo.

Finalmente, es necesario tener una composición que sea eficazmente capaz de mantener las defensas antioxidantes altas después de que se haya inducido estrés oxidativo por factores externos, por ejemplo, después del consumo de fármacos.

La materia objeto de la presente invención se refiere a tales composiciones como se exponen en las reivindicaciones adjuntas que comprenden ciertas bacterias probióticas para su uso en el tratamiento de estrés oxidativo.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención se describen más adelante en la descripción y se reivindicarán en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

La Figura 1 se refiere a un histograma que muestra los valores de actividad antioxidante total (TAA) con respecto a:

- C (muestra de control bajo condiciones iniciales),
- T2 (muestra de control tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^8 /día bajo condiciones iniciales),
- C+DOX (muestra de control tratada con doxorubicina),
- T1+DOX (muestra tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^9 /día y doxorubicina),
- T2+DOX (muestra tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^8 /día y doxorubicina), y
- T3+DOX (muestra tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^7 /día y doxorubicina).

La Figura 2 se refiere a un histograma que muestra los valores de concentración de glutatión en plasma (la forma antioxidante de glutatión se denomina glutatión reducido, GSH), como una evaluación de la capacidad antioxidante, con respecto a:

- C (muestra de control bajo condiciones iniciales),
- T2 (muestra de control tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^8 /día bajo condiciones iniciales),

- C+DOX (muestra tratada con doxorubicina),
- T1+DOX (muestra tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^9 /día y doxorubicina),
- T2+DOX (muestra tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^8 /día y doxorubicina), y
- T3+DOX (muestra tratada con las bacterias probióticas de la presente invención a la dosis de 10^7 /día y doxorubicina).

La Tabla 1 muestra, a modo de ejemplo, un grupo de microorganismos que tienen aplicación válida en el contexto de la presente invención.

El solicitante realizó una intensa actividad de investigación, después de lo cual encontró que las cepas bacterianas que pertenecen a una especie seleccionada del grupo que comprende *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* y *Bifidobacterium lactis* muestran una actividad antioxidante significativa, gracias a la que es posible usar las cepas seleccionadas en una composición para su uso como medicación para reducir el estrés oxidativo.

Ventajosamente, la composición de la presente invención tiene aplicación en casos en los que el estrés oxidativo se induce como resultado del consumo de fármacos por un sujeto que está recibiendo tratamientos médicos.

En una realización preferida, la composición de la presente invención puede comprender una mezcla de cepas que contiene una o más cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Lactobacillus acidophilus*, por ejemplo, dos o tres cepas; una o más cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Lactobacillus brevis*, por ejemplo, dos o tres cepas; y una o más cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Bifidobacterium lactis*, por ejemplo, dos o tres cepas.

En una realización preferida, la composición de la presente invención comprende una mezcla que contiene al menos una cepa seleccionada del grupo que comprende:

- *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) depositada por Probiotal SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23032, y/o
- *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) depositada por Probiotal SpA Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23033, y/o
- *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) depositada por Probiotal SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23034.

Ventajosamente, la mezcla de cepas bacterianas consiste en *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) DSM 23032, *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) DSM 23033 y *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) DSM 23034.

En el contexto de la presente invención, las cepas bacterianas pueden estar en forma de bacterias vivas o bacterias muertas o componentes celulares de las mismas, extractos celulares y/o bacterias inactivadas, lisadas o permeabilizadas. La composición de la presente invención puede ser una composición alimenticia, por ejemplo, una composición simbiótica, o incluso un suplemento o una composición farmacéutica.

En una realización preferida, la composición puede comprender además una o más cepas bacterianas de entre aquellas enumeradas en la Tabla 2.

Preferentemente, la composición puede comprender además de una a seis cepas, incluso más preferentemente de una a tres cepas seleccionadas de entre aquellas enumeradas en la Tabla 2.

Cepas particularmente preferidas se seleccionan de entre aquellas enumeradas en la Tabla 2, identificadas con el número presente en la columna de la izquierda: N°. 5, N°. 20, N°. 42, N°. 49, N°. 80, N°. 81, N°. 92, N°. 93, N°. 99, N°. 100 y N°. 101.

Las cepas N°. 99, N°. 100 y N°. 101 son particularmente preferidas, ya que están dotadas de una marcada actividad antioxidante.

Las cepas N°. 5 y N°. 20 también están dotadas de propiedades antiinflamatorias, entre otras cosas.

Las cepas N°. 42, N°. 80 y N°. 81 también son capaces de combatir infecciones, por ejemplo, infecciones intestinales por levadura, que incluyen infecciones por *Candida*.

La cepa N°. 49 también es capaz de producir folatos en el intestino.

Las cepas N°. 5, N°. 92 y N°. 93 también son capaces de antagonizar *E. coli* intestinal.

Todas las cepas descritas y/o reivindicadas en la presente solicitud de patente se han depositado según el Tratado de Budapest y están accesibles al público, bajo petición, por la Autoridad de Depósito competente.

Ventajosamente, la composición de la presente invención puede comprender elementos o sustancias con actividad antioxidante, tales como, por ejemplo, selenio, cinc, magnesio, manganeso, glutatión, superóxido dismutasa (SOD), vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, carotenoides, riboflavina, taurina, L-carnosina, astaxantina, licopeno, aceite de semillas de tomate, quercetina, tirosol, resveratrol, hidroxitirosol, oleuropeína, luteína, espirulina, capsaicina, própolis, ginseng, ginkgo biloba, coenzima Q₁₀, ácido alfa-lipoico, ácidos grasos ω -3 insaturados, por ejemplo, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), extractos de bayas tales como mirtilo, arándano, grosella y extractos de pepita de uva, extracto de té verde, extractos de cactus, alcachofa, papaya, melón, manzana, lúpulo, camelia, trébol rojo, baya del saúco, romero, cacao, hoja de olivo, corteza de pino y de ostra y otros extractos de planta que contienen polifenoles en una cantidad superior al 1 % en peso. Ventajosamente, dichos extractos pueden haberse sometido previamente a al menos una etapa de fermentación. En una realización preferida de la presente invención se usa papaya fermentada. La papaya fermentada se produce y se extrae de frutas de papaya y de varias hierbas tropicales tras la fermentación por levadura (preferentemente *Saccharomyces*) y bacterias. La papaya fermentada potencia la actividad de las cepas de la presente invención, no solo con respecto a la actividad antioxidante, sino también con respecto a la reducción en radicales libres, inhibición de la peroxidación de lípidos, refuerzo del sistema inmunitario, propiedades alcalinizantes y quelación de metales de transición tanto en sistemas experimentales *in vitro* como *in vivo* con la consecuente acción antiséptica contra microorganismos responsables de las infecciones intestinales.

Dichos elementos o sustancias con actividad antioxidante como se ha descrito anteriormente se añaden en una cantidad en peso comprendida del 0,0001 % al 30 % con respecto al peso de la composición final, dependiendo de la concentración de las sustancias con actividad antioxidante y/o la cantidad diaria recomendada (CDR), si se define.

El selenio puede estar presente en forma de selenato de sodio, selenito de sodio y selenito ácido de sodio, además de en forma de microorganismos, por ejemplo, levadura enriquecida en selenio, en una cantidad en peso comprendida del 0,0005 % al 0,005 % con respecto al peso de la composición final, en cualquier caso suficiente para contribuir a la cantidad de selenio, preferentemente comprendida de 10 μ g a 150 μ g.

En una realización preferida, la composición de la presente invención comprende además una o más cepas bacterianas capaces de internalizar el selenio.

Las cepas que tienen aplicación en particular son las cepas depositadas por la empresa BIOMAN S.r.l., Via Alfieri 18, 10100 Turín, concretamente: *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositada en la DSMZ el 05/04/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16341; *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16144; *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositada en la DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16143, en asociación con las cepas con actividad antioxidante de la presente invención.

Dichas cepas, en realidad, son capaces de acumular dentro de las células grandes cantidades de selenio, especialmente en forma orgánica, si crecen en presencia de una fuente de selenio adecuada en el medio de cultivo.

El glutatión es un antioxidante fuerte, seguramente uno de los más importantes entre aquellos que el cuerpo es capaz de producir. Tiene acción considerable tanto contra radicales libres como moléculas tales como peróxido de hidrógeno, nitritos, nitratos, benzoatos y otros. Desempeña una acción importante en los glóbulos rojos, protegiendo dichas células del peligroso estrés oxidativo que produciría la hemólisis. En particular, la forma antioxidante se denomina glutatión reducido (o GSH).

En una realización preferida, la composición comprende glutatión en forma reducida y selenio en una cantidad en peso comprendida del 0,5 % al 10 %, con respecto al peso de la composición final.

Ventajosamente, como el glutatión puede inactivarse parcialmente si se toma por vía oral, la composición puede comprender el aminoácido de azufre cisteína y/o N-acetilcisteína y/o mezclas de las mismas.

En una realización preferida se hace uso de aceite de semillas de tomate, ya que es particularmente rico en licopeno, un carotenoide con marcada actividad antioxidante, en asociación con las cepas antioxidantes de la presente invención.

En la composición de la presente invención, la mezcla de cepas bacterianas está presente en una cantidad comprendida del 0,5 al 20 % en peso, con respecto al peso total de la composición, preferentemente del 2,5 al 8 %.

En una realización preferida, la composición puede comprender además al menos una fibra prebiótica y/o hidratos de carbono que tienen una acción bifidogénica tales como, por ejemplo, inulina, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto- y trans-galacto-oligosacáridos (GOS y TOS), gluco-oligosacáridos (GOSa), xilo-oligosacáridos (XOS), oligosacáridos de quitosano (COS), oligosacáridos de soja (SOS), isomalto-oligosacáridos (IMOS), almidón resistente, pectina,

psilio, arabinogalactanos, glucomananos, galactomananos, xilanos, lactosacarosa, lactulosa, lactitol y diversos otros tipos de gomas, fibra de goma arábica, algarroba, avena o de bambú, fibras de cítricos y, en general, fibras que contienen una porción soluble y una insoluble, en una relación variable entre sí.

- 5 En una realización preferida de la invención, la composición comprende al menos una fibra prebiótica seleccionada de entre las anteriormente mencionadas y/o mezclas adecuadas de las mismas en cualquier porcentaje relativo, sea el que sea.

- 10 La cantidad de las fibras prebióticas y/o de los hidratos de carbono que tienen acción bifidogénica, si están presentes en la composición, comprende del 0 al 60 % en peso, preferentemente del 5 al 45 %, e incluso más preferentemente del 10 al 30 %, con respecto al peso total de la composición. En este caso, la composición o suplemento tiene actividad simbiótica y propiedades funcionales. Además, la parte interna del producto alimenticio o suplemento también puede comprender otros principios activos y/o componentes, tales como vitaminas, minerales, péptidos bioactivos, sustancias que tienen actividad antioxidante, hipocolesterolemiantes, hipoglucemiantes, antiinflamatoria, agentes anti-edulcorantes en una cantidad en peso generalmente comprendida del 0,001 % al 20 %
15 en peso, preferentemente del 0,01 % al 5 %, dependiendo en cualquier caso del tipo de componente activo y la dosis diaria recomendada de la misma, si está definida, con respecto al peso total de la composición.

- 20 La composición alimenticia de la presente invención, por ejemplo, una composición simbiótica, o incluso un suplemento o una composición farmacéutica, se prepara usando técnicas y aparatos conocidos para un experto en la materia.

- 25 En una realización preferida, la composición contiene bacterias en una concentración comprendida de 1×10^6 a 1×10^{11} UFC/g de mezcla, preferentemente de 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/g de mezcla.

- En una realización preferida, la composición contiene bacterias en una concentración comprendida de 1×10^6 a 1×10^{11} UFC/dosis, preferentemente de 10×10^8 a 1×10^{10} UFC/dosis.

- 30 La dosis puede estar comprendida de 0,2 a 10 g, por ejemplo, es 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g.

- Las bacterias probióticas usadas en la presente invención pueden estar en forma sólida, en particular en polvo, polvo deshidratado o forma liofilizada.

- 35 En una realización preferida, la mezcla de cepas bacterianas comprende al menos una cepa seleccionada de entre *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) DSM 23032, *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) DSM 23033 y *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) DSM 23034 en forma microencapsulada, es decir, dicha al menos una cepa (o las tres cepas bacterianas dichas) está recubierta con una composición que contiene al menos un lípido, preferentemente de origen vegetal. Las bacterias microencapsuladas se añaden entonces, usando métodos de trabajo conocidos para un experto en la materia, a una composición líquida basada en aceite para dar una suspensión aceitosa.
40

Las bacterias anteriormente mencionadas que se añaden a la composición líquida basada en aceite pueden estar en forma de bacterias microencapsuladas y/o bacterias no microencapsuladas "desnudas", o mezclas de las mismas.

- 45 Las bacterias seleccionados de entre *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) DSM 23032, *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) DSM 23033 y *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) DSM 23034, preferentemente en forma microencapsulada, pueden microencapsularse por medio de tecnologías comunes conocidas para un experto en la materia. Por ejemplo, puede emplearse una técnica en lecho fluidizado (por ejemplo, pulverización superior o pulverización inferior), en la que pueden usarse materiales de recubrimiento de una naturaleza lipídica.
50

En una realización preferida se usan grasas vegetales saturadas que tienen un punto de fusión inferior a 75 °C, preferentemente comprendido de 45 a 65 °C.

- 55 En una realización preferida pueden usarse grasas vegetales saturadas que tienen un cierto grado de hidrofilia; éstas pueden seleccionarse de entre mono- y di-glicéridos de ácidos grasos saturados, poligliceroles esterificados con ácidos grasos saturados y ácidos grasos saturados libres.

- 60 Por ejemplo, pueden usarse diestearato de poliglicerilo (nombre comercial Plurol Stearique WL 1009), palmitoestearato de glicerilo (nombre comercial Precirol Ato 5), ácidos grasos saturados (nombre comercial Revel C) o grasas vegetales hidrogenadas de origen no láurico.

En una realización preferida, la relación en peso entre microorganismo liofilizado y el material de recubrimiento lipídico que lo recubre es 50:50 o 40:60.

- 65 En una primera realización, dos lípidos seleccionados de entre una grasa de palma hidrogenada ($T_m=60$ °C) y dipalmitoestearato de glicerol ($T_m=57-60$ °C) se pulverizan sobre el liofilizado sucesivamente, es decir, se aplica una

cobertura doble al liofilizado: la primera con la grasa de palma hidrogenada y la segunda con el dipalmitoestearato de glicerol en una relación de 3:1 el uno con respecto al otro. Un recubrimiento doble de las células garantiza el mejor sellado de las bacterias del entorno, produciendo una película continua sin poros que comunica con el exterior. Sin embargo, esta envoltura debe abrirse a nivel intestinal para liberar las bacterias y permitirles que colonicen. Los lípidos seleccionados son de hecho resistentes a pH ácidos, de manera que el recubrimiento siga intacto en el estómago, pero sensible a pH incluso ligeramente básicos, para permitir la formación de orificios en el recubrimiento durante su paso a través del intestino.

En una realización preferida, la composición de la presente invención es una composición basada en aceite que comprende bacterias lácticas recubiertas como se ha mencionado anteriormente. Dicha composición se prepara según técnicas conocidas para un experto en la materia.

En términos prácticos, una cantidad dada de aceite se introduce en un recipiente provisto de medios de agitación y calentamiento. Posteriormente, las bacterias probióticas recubiertas en forma sólida se añaden gradualmente con agitación para evitar la formación de masas y aglomerados. Una vez ha terminado la adición de bacterias, la suspensión aceitosa se mantiene con agitación durante un tiempo comprendido de 1 a 30 minutos, si fuera necesario con ligero calentamiento a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, preferentemente de 30 a 35 °C.

La composición que se obtiene es similar a una suspensión aceitosa. La composición contiene las bacterias en una cantidad inferior o igual al 30 % en peso, comprendida del 0,05 al 20 % en peso, con respecto al peso total de la composición; preferentemente en una cantidad comprendida del 0,5 al 10 %; incluso más preferentemente en una cantidad comprendida del 1,5 al 5 % en peso, con respecto al peso total de la composición.

La composición comprende al menos un aceite comestible adecuado para ser administrado a sujetos en edad pediátrica, seleccionado del grupo que comprende: aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de linaza, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de pescado y aceite de arroz, y otros aceites de semillas entre los que pueden usarse, en particular, aceite de semillas de tomate. Dichos aceites pueden usarse individualmente o juntos en mezclas adecuadas, en relaciones en peso apropiadas. Ventajosamente, dichos aceites son de calidad biológica y su preparación puede incluir una etapa de refinado y/o una etapa de compresión en frío.

La composición comprende al menos un aceite en una cantidad superior o igual al 70 % en peso, con respecto al peso total de la suspensión, preferentemente en una cantidad comprendida del 75 al 95 % en peso, ventajosamente al menos el 90 % en peso. Ventajosamente, la composición contiene solo aceite de oliva o incluso aceite de oliva en una mezcla con aceite de maíz y/o aceite de soja y/o aceite de linaza y/o aceite de semillas de tomate. Ventajosamente, el aceite de oliva es extra-virgen y de calidad Bio.

En una realización preferida, la composición comprende además al menos un compuesto alimenticio finamente dividido seleccionado del grupo que comprende sílice, dióxido de silicio, gel de sílice, sílice coloidal, sílice precipitada, Syloid® 244, talco, silicato de magnesio, óxido de magnesio, carbonato de magnesio, silicato de calcio, lecitina, mono- o di-glicéridos tales como monoestearato de glicerilo, monooleato de glicerilo, plurol-ácido oleico, almidón, almidones modificados, goma konjac, goma xantana, goma gellan y carragenina.

Dicho material está presente en una cantidad comprendida del 0,1 al 15 % en peso, con respecto al peso total de la composición, preferentemente del 1 al 5 % en peso, con respecto al peso total de la composición.

En este caso, el procedimiento de preparación proporciona que, a una cantidad dada de aceite, el material de alimento finamente dividido, por ejemplo, dióxido de silicio, se añade con agitación. Posteriormente, el aceite que contiene dicho material se calienta con agitación a aproximadamente 60 °C hasta la disolución completa.

Alternativamente, el dióxido de silicio también puede añadirse frío; sin embargo, la solubilización requiere un tiempo más largo. Posteriormente, la composición se deja enfriar de 60 °C hasta temperatura ambiente. Entonces, el liofilizado se pesa y se añade a la suspensión con agitación, hasta que se dispersa completa y homogéneamente. La composición que se obtiene es similar a una suspensión aceitosa.

Ejemplos de composiciones preferidas, según la presente invención, se muestran en la Tabla 3 (Ejemplos 1-4).

Los Ejemplos 1-4 se dan únicamente a modo de ejemplo no restrictivo de la presente invención y consideran un volumen de suspensión aceitosa adecuado para un periodo de tratamiento igual a 30 días. Así, el recuento viable mostrado, expresado en billones de células vivas, se refiere a 30 dosis. Una dosis única es capaz de proporcionar, en el momento de la fabricación, 1,5 billones/cepa en los Ejemplos 1 y 2 y 2,5 billones/cepa en los Ejemplos 3 y 4.

El solicitante ha encontrado que es posible usar diferentes volúmenes de suspensión aceitosa, por ejemplo, 5 ml, adecuados para periodos de tratamiento más cortos.

En una realización preferida, la suspensión aceitosa puede comprender además, en una cantidad comprendida del 0,5 al 25 % en peso, con respecto al peso total de la suspensión, al menos una fibra prebiótica y/o al menos un

hidrato de carbono bifidogénico seleccionado de entre inulina, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto- y trans-galacto-oligosacáridos (GOS y TOS), gluco-oligosacáridos (GOSq), xilo-oligosacáridos (XOS), oligosacáridos de quitosano (COS), oligosacáridos de soja (SOS), isomalto-oligosacáridos (IMOS), maltodextrina, almidón resistente, pectina, psilio, arabinogalactanos, glucomananos, galactomananos, xilanos, lactosacarosa, lactulosa, lactitol, fibra de goma arábica, fibra de algarroba, fibra de avena, fibra de bambú y fibras de cítricos.

Las fibras prebióticas y los hidratos de carbono tienen una función dual. La primera es la de realizar un efecto prebiótico. La segunda es la de realizar un efecto tecnológico como espesante y estabilizador. Ventajosamente, dicha al menos una fibra y dicho al menos un hidrato de carbono están seleccionados de entre gluco-oligosacáridos (GOSq), fructo-oligosacáridos (FOS), inulina y/o maltodextrina. La suspensión contiene cepas de microorganismos microencapsulados con al menos un lípido que tiene un punto de fusión inferior a 75 °C, preferentemente comprendido de 45 a 65 °C.

La suspensión está indicada para su uso como medicación para el tratamiento de trastornos intestinales, tales como, por ejemplo, cólico en sujetos pediátricos.

En otra realización preferida, la composición de la presente invención se formula en sobres. La Tabla 4 muestra los Ejemplos 5-8.

En el Ejemplo 6, la cepa *Lactobacillus buchneri* LB26BM (DSM 16341) contiene 50 µg/g de selenio acumulado dentro de la célula prevalentemente en forma de selenio metionina y selenio cisteína; por tanto, 1 gramo es capaz de proporcionar 90 % de la CDR de dicho elemento.

En el Ejemplo 7, la composición comprende 3 gramos de papaya fermentada que tiene acción sinérgica con la cepa *B. lactis* BS05 (DSM 23032).

A continuación hay una descripción de las condiciones de operación para cultivar las cepas *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) DSM 23032, *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) DSM 23033 y *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) DSM 23034. Las condiciones son válidas para todas las cepas, a menos que se indique lo contrario.

i) Medio usado: caldo TPY + HCl de Cys 0,5 g/l para DSM 23032, y Difco MRS ref. 288130 para DSM 23033 y DSM 23034.

ii) pH del medio antes de la esterilización: 7,10 para DSM 23032 y 7,00 para DSM 23033 y DSM 23034.

iii) Esterilización: 15 minutos a 121 °C.

iv) pH del medio después de la esterilización: 6,60 para DSM 23032 y 6,50 para DSM 23033 y DSM 23034.

v) Relación con oxígeno: especies anaerobias estrictas para DSM 23032 y especies anaerobias o microaerófilas opcionales para DSM 23033 y DSM 23034.

vi) Temperatura de incubación: 37 °C.

vii) Tiempo de incubación: 17 horas para DSM 23032 y 15 horas para DSM 23033 y DSM 23034.

viii) Temperatura de almacenamiento a corto plazo: 5 °C.

ix) Tiempo de transferencia: 2 días.

x) Temperatura de almacenamiento a largo plazo: -25 °C.

xi) Condiciones para probar la viabilidad: crecimiento en caldo TPY a 37 °C durante la noche o hasta que se alcance turbidez adecuada para DSM 23032 y crecimiento en caldo MRS a 37 °C durante la noche para DSM 23033 y DSM 23034.

xii) Descripción: bacilos de formas variables, Gram-positivos, formación no rápida de acidez, sin formación de esporas, anaerobios, degrada glucosa exclusivamente y de una manera característica mediante la vía de fructosa-6-fosfato fosfoacetolasa en el caso de DSM 23032; bacilos con extremos redondeados, dispuestos individualmente o en cadenas, buen crecimiento a 37 °C y metabolismo homofermentativo estricto para DSM 23033, heterofermentativo estricto para DSM 23034.

Parte experimental

El solicitante llevó a cabo un cribado a gran escala de numerosas bacterias probióticas con el objetivo de identificar uno o más microorganismos dotados de actividad antioxidante.

La primera actividad de cribado se llevó a cabo mediante una serie de pruebas *in vitro*. En particular, se evaluó la actividad antioxidante total (TAA) tanto de células completas como de extractos celulares.

En el caso de células completas, la posible actividad antioxidante se investigó por medio de dos pruebas:

- Auto-oxidación de ácido ascórbico % de AA
- Oxidación de ácido linolénico % de LA

Ambas pruebas cuantifican la capacidad de la cepa bacteriana, usada como células completas, para proteger el ácido ascórbico o el ácido linolénico de la oxidación.

En detalle, la cinética de la reacción de auto-oxidación del ácido ascórbico puede determinarse espectrofotométricamente registrando a 265 nm la presencia de ácido deshidroascórbico, ofreciendo así una medida del poder antioxidante, evaluada como la capacidad para inhibir dicha reacción de auto-oxidación.

- 5 Se usó mejor un ensayo de ácido tiobarbitúrico para monitorizar la capacidad de las cepas bacterianas para inhibir la peroxidación de ácido linolénico. La oxidación de ácido linolénico produce, en realidad, una cadena autocatalítica que conduce a la formación de diferentes especies de radicales. Uno de los productos de descomposición de las especies de radicales es el malonaldehído, que puede usarse como indicador del estrés oxidativo en el ensayo de ácido tiobarbitúrico, ya que es capaz de reaccionar con dicho ácido para formar un complejo cromogénico rojo que
10 puede determinarse espectrofotométricamente a 534 nm.

El trabajo de investigación realizado en extractos celulares incluyó mejor las siguientes pruebas:

- 15 - Capacidad antioxidante equivalente de Trolox® (TEAC) %
- Glutación (GSH) nmoles/mg
- Superóxido dismutasa (SOD) U/mg

La primera prueba se basa en la reacción de moléculas antioxidantes con el radical catiónico ABTS•+ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)).

- 20 Este radical puede reducirse, con una pérdida consecuente de la absorbancia, a partir de un antioxidante cuya capacidad secuestrante puede medirse espectrofotométricamente a 734 nm. La prueba se realiza a 37 °C y los resultados se obtienen comparando con Trolox® (antioxidante sintético, un análogo hidrófilo de la vitamina E), para definir la concentración milimolar de una disolución de Trolox® que tiene una capacidad antioxidante equivalente a la de una disolución 1 mM de la sustancia en análisis (TEAC).
25

La segunda y la tercera pruebas miden la concentración de glutatión reducido (GSH) y de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que es capaz de producir la cepa bacteriana individual. Ambas moléculas son conocidas por tener actividad antioxidante.

- 30 La actividad de superóxido dismutasa (SOD) se determina por medio del método espectrofotométrico, explotando el principio de la inhibición enzimática de la oxidación de epinefrina (4-[1-hidroxi-2-(metilamino)-etil]-1,2-bencenodiol). La oxidación por O₂ se produce a un pH alcalino con producción de aniones superóxido (O₂⁻) que, acumulándose en la disolución, promueven la conversión de epinefrina a adrenocromo (3-hidroxi-1-metil-5,6-indolindiona), un compuesto coloreado que permite monitorizar el transcurso de la reacción, basada en una medición de absorbancia.
35

La presencia de superóxido dismutasa (SOD) elimina iones O₂ y reduce la velocidad de formación y la cantidad de adrenocromo. El porcentaje de inhibición de la oxidación es una función hiperbólica de la concentración de SOD.

- 40 Puede realizarse un análisis cuantitativo de glutatión usando un método espectrofotométrico que se basa en la reacción enzimática de Ellman: el grupo sulfhidrilo del glutatión (GSH) reacciona con ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), formando un compuesto de color amarillo: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Simultáneamente, el glutatión oxidado es de nuevo reducido por la glutatión reductasa, conduciendo a la formación adicional de TNB. La tasa de formación de TNB es directamente proporcional a la concentración de GSH total, expresada como nanomoles por mg de proteína presente en el extracto celular.
45

Los resultados se muestran en la Tabla 1.

- 50 De la Tabla 1 puede deducirse que las cepas poseen una actividad antioxidante significativa, observada tanto para células completas como extractos celulares.

Posteriormente, para confirmar la actividad antioxidante de las cepas de la presente invención también en un modelo *in vivo*, el solicitante realizó un estudio en animales.

- 55 En particular, el estudio se realizó en una población de muestra de 48 ratas Wistar adultas sanas (Harlan, Milán, Italia), que se alimentaron con una dieta estándar durante 7 días.

Posteriormente, las 48 ratas se dividieron en los siguientes grupos:

- 60 - Grupo C: grupo de control que comprende 20 ratas alimentadas solo con la dieta estándar, sin probióticos, durante 18 días.
- Grupo T1: grupo de estudio que comprende 7 ratas alimentadas con una dieta, durante 18 días, complementada con una mezcla de bacterias que contiene las cepas *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) DSM 23032, *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) DSM 23033 y *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) DSM 23034 en una relación en peso de 1:1:1 (en lo sucesivo indicada M por brevedad) a una concentración de 1x10⁹ UFC/día. En
65 detalle, las cepas probióticas anteriormente dichas se mezclaron con el pienso de las ratas a una concentración de

forma que estuviera presente un total de 1×10^9 UFC en la cantidad promedio consumida diariamente por un único animal.

- Grupo T2: grupo de estudio que comprende 14 ratas alimentadas con una dieta complementada con mezcla M, como se ha descrito anteriormente, a una concentración de 1×10^8 UFC/día durante 18 días.

5 - Grupo T3: grupo de estudio que comprende 7 ratas alimentadas con una dieta complementada con mezcla M, como se ha descrito anteriormente, a una concentración de 1×10^7 UFC/día durante 18 días.

Al final de los 18 días, las ratas en el grupo C y grupo T2 se dividieron en dos subgrupos de respectivamente 10 y 7 ratas cada uno: un subgrupo (Cf y T2f) se inyectó con una solución salina y el otro con una disolución de doxorubicina (abreviada DOX), un fármaco antineoplásico con actividad pro-oxidativa que es capaz de inducir un fuerte estrés oxidativo, a una dosis de 20 µg/g de peso corporal (CDOX y T2DOX). Todas las ratas de los grupos T1 y T3 se inyectaron con la misma dosis de doxorubicina (T1DOX y T3DOX).

Las ratas se sacrificaron luego en el plazo de 24 horas después de la inyección de solución salina o DOX. A continuación se tomaron muestras de plasma con el fin de cuantificar la actividad antioxidante total (TAA) *in vitro* y los niveles de glutatión en forma reducida (GSH) (Figuras 1 y 2). El comparar CDOX y T1DOX, T2DOX y T3DOX permite evaluar una posible protección por parte de la mezcla de probióticos contra el estrés oxidativo inducido por doxorubicina, revelando también una posible relación dosis-respuesta según el número de células viables administradas.

La comparación entre Cf y T2f sirve para revelar un posible aumento en la actividad antioxidante inducida por las cepas probióticas bajo condiciones fisiológicas, en ausencia, por tanto, del estrés oxidativo inducido por la doxorubicina.

En la Fig. 1 y 2 (actividad antioxidante total, TAA y glutatión en plasma, respectivamente), el efecto del tratamiento con probióticos en el caso de estrés oxidativo (diferencias entre el grupo de control CDOX y los grupos T1DOX, T2DOX y T3DOX) se evaluó por medio de análisis estadístico ANOVA, que compara todas las ratas que habían recibido DOX. Los efectos de la administración de doxorubicina se evaluaron por medio de la prueba de ANOVA (usando la prueba a posteriori de Tukey) y comparando todos los grupos tratados con DOX con el control inicial (Cf).

Las diferencias entre el control (Cf) y el grupo tratado con probióticos bajo condiciones iniciales (T2f) se evaluaron con la prueba de la t de Student.

De la Figura 1 puede observarse que, bajo las condiciones iniciales (C y T2), el tratamiento con probióticos no modifica la TAA (comparación no significativa, n.s.). En las ratas no tratadas con probióticos, la administración de DOX produce una disminución significativa en TAA en comparación con los valores iniciales (prueba de la t $p < 0,001$). En las ratas tratadas con probióticos también, la administración de DOX produce una disminución en TAA en comparación con los valores iniciales (Cf), pero en los tratamientos a una mayor concentración de probióticos (T1 y T2) la disminución es más pequeña (prueba de la t $p < 0,02$). En ratas tratadas con una menor concentración de probióticos (T3), después de la administración de DOX, la disminución en TAA es mayor (prueba de la t $p < 0,001$). La diferencia entre los grupos tratados con DOX es significativo (ANOVA $p < 0,05$). En la Figura 2, la concentración de GSH se usa como medida de la capacidad antioxidante. Bajo estrés oxidativo se reducen los niveles de GSH.

C frente a T2: prueba de la t $p > 0,05$ (no estadísticamente significativa, n.s.) Prueba ANOVA que compara C con todos los grupos tratados con DOX: $p < 0,001$.

Prueba a posteriori (Tukey):

C frente a C+DOX $p < 0,001$

C frente a T1+DOX n.s.

C frente a T2+DOX $p < 0,05$

C frente a T3+DOX $p < 0,01$

La Figura 2 muestra que bajo las condiciones iniciales no hay diferencia entre controles y ratas tratadas con la mezcla M. En las ratas de control, el estrés oxidativo produce una fuerte disminución en la concentración de GSH ($p < 0,001$). En las ratas tratadas con la mezcla M a la mayor concentración (T1), la inyección de DOX no produce una reducción significativa en los niveles de GSH (n.s.). En las ratas tratadas con una dosis intermedia de la mezcla M, se observa una disminución en comparación con el control inicial, pero la significación estadística es menor ($p < 0,05$). En las ratas tratadas con probióticos a la dosis más pequeña, la disminución en niveles de GSH es incluso más evidente ($p < 0,01$). La diferencia entre los diversos grupos tratados con DOX es significativa (ANOVA $p < 0,05$). Todos los datos informados anteriormente muestran que la administración de una mezcla de las tres cepas probióticas (mezcla M) es capaz de reducir el estrés oxidativo inducido por la inyección de doxorubicina, un fármaco antineoplásico con actividad pro-oxidante (véase la Figura 1, comparación entre C + DOX y T1 + DOX).

El estrés oxidativo se evaluó tanto en términos de la disminución en la actividad antioxidante total a nivel de plasma como de glutatión en forma reducida (GSH). El glutatión es una molécula importante capaz de combatir el estrés oxidativo y de neutralizar los radicales libres presentes en plasma.

Las comparaciones más interesantes son entre el grupo C + DOX (grupo de control, tratado sin probióticos y con inyección de doxorubicina después de 18 días) y los grupos T1 + DOX/T2 + DOX (grupos tratados con probióticos, respectivamente una cantidad de 10^9 y 10^8 UFC/día, que se inyectaron con doxorubicina después de 18 días). La menor concentración de probióticos, es decir, 10^7 UFC/día (grupo T3), mostró ser de utilidad más limitada en reducir el estrés oxidativo inducido por la doxorubicina.

En cualquier caso, los presentes inventores creen que la concentración de 10^8 UFC/día en ratas puede ser representativa de las cantidades habitualmente usadas en seres humanos (10^{10} - 10^{11} UFC/día).

REIVINDICACIONES

1.- Al menos una cepa bacteriana que tiene propiedades antioxidantes que pertenece a una especie seleccionada de entre:

- *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) depositada por Probiotical SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23032,
- *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) depositada por Probiotical SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23033, y
- *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) depositada por Probiotical SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23034 para su uso en el tratamiento de estrés oxidativo.

2.- Al menos una cepa bacteriana para el uso según la reivindicación 1, en la que dicho estrés oxidativo ha sido inducido como resultado de la ingesta de fármacos.

3.- Una composición que comprende una mezcla que contiene al menos una cepa bacteriana que tiene propiedades antioxidantes seleccionada de entre:

- *Bifidobacterium lactis* BS 05 (ID 1666) depositada por Probiotical SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23032,
- *Lactobacillus acidophilus* LA 06 (ID 1683) depositada por Probiotical SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23033, y
- *Lactobacillus brevis* LBR01 (ID 1685) depositada por Probiotical SpA, Novara (Italia) en la DSMZ en Alemania el 13.10.2009 y que tiene el número de depósito DSM 23034, para su uso en el tratamiento de estrés oxidativo.

4.- La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que el estrés oxidativo ha sido inducido como resultado de la ingesta de fármacos.

5.- La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que la composición es una composición alimenticia o suplemento.

6.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en la que dicha composición contiene bacterias en una concentración comprendida de 1×10^6 a 1×10^{11} UFC/g de mezcla.

7.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en la que dicha composición contiene bacterias en una concentración comprendida de 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/g de mezcla.

8.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en la que dicha composición contiene bacterias en una concentración comprendida de 1×10^6 a 1×10^{11} UFC/dosis.

9.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en la que dicha composición contiene bacterias en una concentración comprendida de 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/dosis.

10.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha mezcla comprende bacterias recubiertas con al menos una grasa vegetal saturada que tiene un punto de fusión inferior a 75 °C.

11.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicha mezcla comprende bacterias recubiertas con al menos una grasa vegetal saturada que tiene un punto de fusión comprendido de 45 a 65 °C.

12.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en la que la al menos una grasa vegetal saturada está seleccionada de entre mono- y di-glicéridos de ácidos grasos saturados, poliglicerol esterificados con ácidos grasos saturados y ácidos grasos saturados libres.

13.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que dichas bacterias recubiertas se añaden a un aceite de origen vegetal seleccionado del grupo que comprende: aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de linaza, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de pescado y aceite de arroz y otros aceites de semilla entre los que pueden usarse, en particular, aceite de semillas de tomate.

14.- La composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3-13, en la que dicha composición comprende además elementos o sustancias que tienen actividad antioxidante tales como, por ejemplo, selenio, cinc, magnesio, manganeso, glutatión, superóxido dismutasa (SOD), vitamina C, vitamina E, beta-caroteno, licopeno, aceite de semillas de tomate, quercetina, tirosol, resveratrol, hidroxitirosol, oleuropeína, luteína, espirulina, ácido alfa-lipoico, ácidos grasos ω -3 insaturados, por ejemplo, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA), extractos de bayas tales como mirtilo, arándano, grosella y extractos de pepita de uva, extracto de té verde,

extractos de cactus, alcachofa, papaya, melón, manzana, lúpulo, camelia, trébol rojo, baya del saúco, romero, cacao, hoja de olivo, corteza de pino y de ostra y otros extractos de planta que contienen polifenoles en una cantidad superior al 1 % en peso y papaya.

- 5 15.- La composición para su uso según la reivindicación 14, en la que los elementos o sustancias que tienen actividad antioxidante son extractos que se han sometido previamente a fermentación.

FIGURA 1

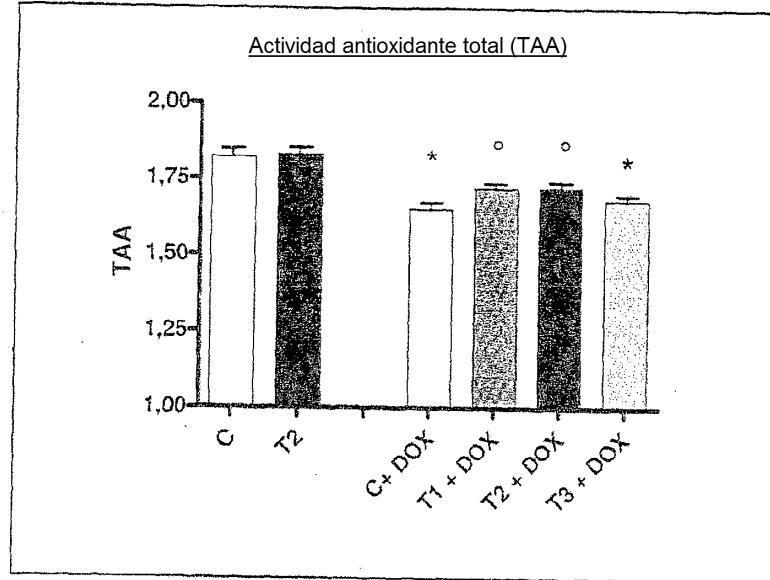


FIGURA 2

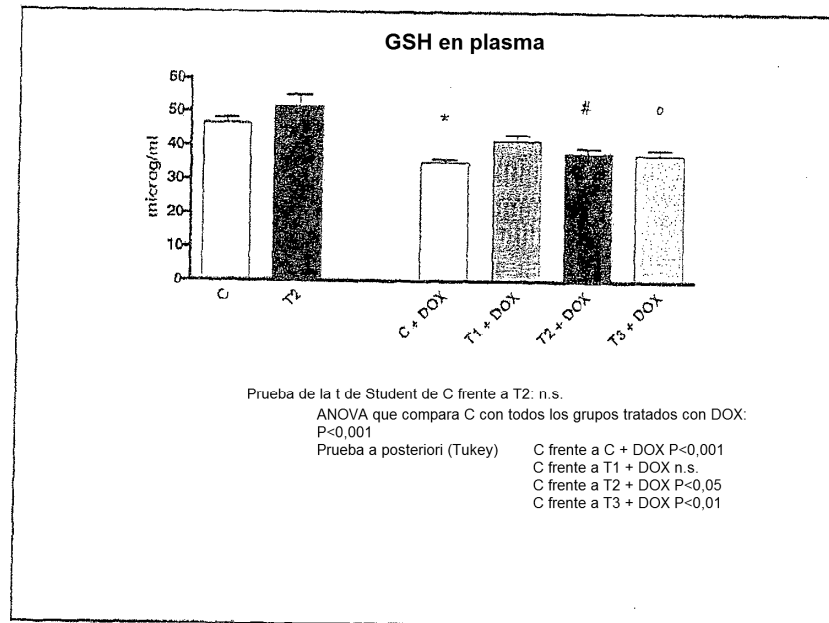


TABLA 1

CEPAS SELECCIONADAS					
CEPA	CÉLULAS COMPLETAS		EXTRACTOS DE CÉLULAS		
	% DE LA	% DE AA	Trolox %	SOD (U/mg)	GSH (nmol/mg)
<i>L. acidophilus</i> DSM 23033	20	26,8	28	<0,02	4,5
<i>L. brevis</i> DSM 23034	34	15,7	55	<0,02	<0,1
<i>B. lactis</i> DSM 23032	15,2	32,7	63,2	0,2	30,3

TABLA 2

No.	Nombre	Número de depósito	Fecha de depósito	Propietario
1	<i>Streptococcus thermophilus</i> B39	LMG P-18383	5.05.1998	PROBIOTICAL S.p.A.
2	<i>Streptococcus thermophilus</i> T003	LMG P-18384	5.05.1998	PROBIOTICAL S.p.A.
3	<i>Lactobacillus pentosus</i> 9/1 ei	LMG P-21019	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776/1 bi	LMG P-21020	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 476LL 20 bi	LMG P-21021	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> PR ei	LMG P-21022	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776/2 hi	LMG P-21023	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
8	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>paracasei</i> 181A/3 ai ai	LMG P-21380	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A.
9	<i>Lactobacillus</i> belonging to the <i>acidophilus</i> group 192A/1 ai ai	LMG P-21381	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A.
10	<i>Bifidobacterium longum</i> 175A/1 ai ai	LMG P-21382	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A.
11	<i>Bifidobacterium breve</i> 195A/1 ai ai	LMG P-21383	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A.
12	<i>Bifidobacterium lactis</i> 32A/3 ai ai	LMG P-21384	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A.

13	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/2 gi	LMG P-21385	31.01.2002	MOFIN S.R.L.
14	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 hi	LMG P-21387	15.03.2002	MOFIN S.R.L.
15	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci	LMG P-21388	31.01.2002	MOFIN S.R.L.
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/4 li	LMG P-21389	15.03.2002	MOFIN S.R.L.
17	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB1	DSM 16506	18.06.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
18	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB5	DSM 16507	18.06.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
19	<i>Bifidobacterium longum</i> BL 03	DSM 16603	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
20	<i>Bifidobacterium breve</i> BR 03	DSM 16604	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
21	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> LR 04	DSM 16605	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
22	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LDB 01	DSM 16606	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
23	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LDB 02	DSM 16607	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
24	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y02	DSM 16590	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
25	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y03	DSM 16591	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
26	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y04	DSM 16592	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
27	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y05	DSM 16593	20.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 03	DSM 16594	21.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 04	DSM 16595	21.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
30	<i>Bifidobacterium breve</i> BR 04	DSM 16596	21.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
31	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> BP 01	DSM 16597	21.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
32	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> BP 02	DSM 16598	21.07.2004	PROBIOTICAL S.P.A.
33	<i>Staphylococcus xylosus</i> SX 01	DSM 17102	01.02.2005	PROBIOTICAL S.P.A.
34	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 02	DSM 17103	01.02.2005	PROBIOTICAL S.P.A.
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 07	DSM 17104	01.02.2005	PROBIOTICAL S.P.A.
36	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y08	DSM 17843	21.12.2005	PROBIOTICAL S.P.A.
37	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y09	DSM 17844	21.12.2005	PROBIOTICAL S.P.A.
38	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y0100	DSM 17845	21.12.2005	PROBIOTICAL S.P.A.
39	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF06	DSM 18295	24.05.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
40	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF07	DSM 18296	24.05.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
41	<i>Lactobacillus fermentum</i>	DSM 18297	24.05.2006	PROBIOTICAL

	LF08			S.P.A.
42	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF09	DSM 18298	24.05.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
43	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS01	DSM 18299	24.05.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
44	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS02	DSM 18300	24.05.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
45	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS03	DSM 18301	24.05.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
46	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS04	DSM 18302	24.05.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
47	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EJ-3	DSM 18350	15.06.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
48	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EJ-15	DSM 18351	15.06.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
49	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EJ-18	DSM 18352	15.06.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> EJ-20	DSM 18353	15.06.2006	PROBIOTICAL S.P.A.
51	<i>Streptococcus thermophilus</i> FRai	DSM 18613	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
52	<i>Streptococcus thermophilus</i> LB2bi	DSM 18614	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
53	<i>Streptococcus thermophilus</i> LRci	DSM 18615	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
54	<i>Streptococcus thermophilus</i> FP4	DSM 18616	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
55	<i>Streptococcus thermophilus</i> ZZ5F8	DSM 18617	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
56	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO4	DSM 18618	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
57	<i>Streptococcus thermophilus</i> S1ci	DSM 18619	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
58	<i>Streptococcus thermophilus</i> 641bi	DSM 18620	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
59	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A/1ai	DSM 18621	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
60	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A/2ai	DSM 18622	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
61	<i>Streptococcus thermophilus</i> IDC11	DSM 18623	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
62	<i>Streptococcus thermophilus</i> ML3di	DSM 18624	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
63	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO3	DSM 18625	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
64	<i>Streptococcus thermophilus</i> G62	DSM 19057	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
65	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1192	DSM 19058	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB18	DSM 19059	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
67	<i>Streptococcus thermophilus</i> CCR21	DSM 19060	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
68	<i>Streptococcus thermophilus</i> G92	DSM 19061	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
69	<i>Streptococcus thermophilus</i> G69	DSM 19062	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
70	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 10	DSM 19063	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.

71	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 11	DSM 19064	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
72	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 12	DSM 19065	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
73	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 13	DSM 19066	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
74	<i>Weissella</i> ssp. WSP 01	DSM 19067	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
75	<i>Weissella</i> ssp. WSP 02	DSM 19068	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
76	<i>Weissella</i> ssp. WSP 03	DSM 19069	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
77	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 09	DSM 19070	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
78	<i>Lactococcus lactis</i> NS 01	DSM 19072	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
79	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 10	DSM 19071	21.02.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
80	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 10	DSM 19187	20.03.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
81	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 11	DSM 19188	20.03.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
82	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> LR 05	DSM 19739	27.09.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
83	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB01	DSM 19818	30.10.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
84	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 01	DSM 19948	28.11.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
85	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 02	DSM 19949	28.11.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
86	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 03	DSM 19950	28.11.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
87	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 04	DSM 19951	28.11.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
88	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 05	DSM 19952	28.11.2007	PROBIOTICAL S.P.A.
89	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> B660	DSM 21444	13.05.2008	PROBIOTICAL S.P.A.
90	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 02	DSM 21717	06.08.2008	PROBIOTICAL S.P.A.
91	<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC 08	DSM 21718	06.08.2008	PROBIOTICAL S.P.A.
92	<i>Lactobacillus pentosus</i> LPS 01	DSM 21980	14.11.2008	PROBIOTICAL S.P.A.
93	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR 06	DSM 21981	14.11.2008	PROBIOTICAL S.P.A.
94	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS01	DSM 22775	23.07.2009	PROBIOTICAL S.P.A.
95	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS06	DSM 22776	23.07.2009	PROBIOTICAL S.P.A.
96	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB01	DSM 22892	28.08.2009	PROBIOTICAL S.P.A.
97	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM 22893	28.08.2009	PROBIOTICAL S.P.A.
98	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB03	DSM 22894	28.08.2009	PROBIOTICAL S.P.A.
99	<i>Bifidobacterium lactis</i> BS05	DSM 23032	13.10.2009	PROBIOTICAL S.P.A.
100	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 23033	13.10.2009	PROBIOTICAL

	LA06			S.P.A.
101	<i>Lactobacillus brevis</i> LBR01	DSM 23034	13.10.2009	PROBIOTICAL S.P.A.
102	<i>Bifidobacterium animalis/lactis</i> BS06	DSM 23224	12.01.2010	PROBIOTICAL S.P.A.
103	<i>Bifidobacterium longum</i> BL05	DSM 23234	12.01.2010	PROBIOTICAL S.P.A.
104	<i>Bifidobacterium longum</i> BL04	DSM 23233	12.01.2010	PROBIOTICAL S.P.A.

TABLA 3 (Ejemplos 1-4)

Ejemplo 1

Composición	Cantidad (gramos)	Volumen / vial (ml)	Cifra viable (BLN)
Aceite de pescado	8,913		
<i>Bifidobacterium lactis</i> BS 05 (DSM 23032)	0,15		45
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 06 (DSM 23033)	0,15		45
<i>Lactobacillus brevis</i> LBR01 (DSM 23034)	0,15		45
Total	9,363	10,000	

Ejemplo 2

Composición	Cantidad (gramos)	Volumen / vial (ml)	Cifra viable (BLN)
Aceite de oliva extra-virgen	8,633		
Dióxido de silicio	0,27		
<i>Bifidobacterium lactis</i> BS 05 (DSM 23032)	0,15		45
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 06 (DSM 23033)	0,15		45
<i>Lactobacillus brevis</i> LBR01 (DSM 23034)	0,15		45
Total	9,353	10,000	

Ejemplo 3

Composición	Cantidad (gramos)	Volumen / vial (ml)	Cifra viable (BLN)
Aceite de soja	7,30		
Aceite de semillas de tomate	2,60		
Bifidobacterium lactis BS 05 (DSM 23032)	0,25		75
Lactobacillus pentosus LPS 01 (DSM 21980)	0,25		75
Total	10,40	11,000	

Ejemplo 4

Composición	Cantidad (gramos)	Volumen / vial (ml)	Cifra viable (BLN)
Aceite de maíz	5,45		
Monoestearato de glicerilo	1,20		
Ácido docosahexaenoico (DHA)	3,00		
Lactobacillus acidophilus LA 06 (DSM 23033)	0,25		75
Bifidobacterium adolescentis EI-18 (DSM 18352)	0,25		75
Total	10,15	11,000	

TABLA 4 (Ejemplos 5-8)

Ejemplo 5

Composición	Cantidad / sobre (mg)	Cifra viable (BLN)
Bifidobacterium lactis BS 05 (DSM 23032)	50	5
Lactobacillus acidophilus LA 06 (DSM 23033)	50	5
Lactobacillus brevis LBR01 (DSM 23034)	50	5
Fructo-oligosacáridos (FOS)	1,000	

Vitamina C	90	
Aroma de manzana	80	
Fructosa	2,000	
Ácido málico	20	
Total	3,340	

Ejemplo 6

Composición	Cantidad / sobre (mg)	Cifra viable (BLN)
Bifidobacterium lactis BS 05 (DSM 23032)	10	1
Lactobacillus acidophilus LA 06 (DSM 23033)	10	1
Lactobacillus brevis LBR01 (DSM 23034)	10	1
Lactobacillus buchneri LB26 BM (DSM 16341)	1,000	
Aroma de vainilla	300	
Sorbitol	1,500	
Sucralosa	5	
Ácido cítrico	20	
Dióxido de silicio	55	
Total	2,910	

Ejemplo 7

Composición	Cantidad / sobre (mg)	Cifra viable (BLN)
Bifidobacterium lactis BS 05 (DSM 23032)	10	1
Papaya fermentada	3,000	
Aroma de piña	300	
Fructosa	1,500	
Sucralosa	5	
Ácido cítrico	20	
Dióxido de silicio	115	
Total	4,950	

Ejemplo 8

Composición	Cantidad / sobre (mg)	Cifra viable (BLN)
Bifidobacterium lactis BS 05 (DSM 23032)	20	2
Glutación reducido	100	
Aroma de frambuesa	300	
Fructosa	3,000	
Ácido cítrico	20	
Dióxido de silicio	80	
Total	3,520	