

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 908**

51 Int. Cl.:

A23L 33/135 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2011** **E 11000744 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016** **EP 2481299**

54 Título: **Cepas de bifidobacterium bifidum para su aplicación en enfermedades gastrointestinales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2017

73 Titular/es:

SYNFOMULAS GMBH (100.0%)
Am Haag 14
82166 Gräfelfing, DE

72 Inventor/es:

GUGLIELMETTI, SIMONE y
MORA, DIEGO

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 610 908 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

Cepas de *bifidobacterium bifidum* para su aplicación en enfermedades gastrointestinales

Hasta la fecha, las enfermedades correlacionadas con un trastorno funcional del tracto gastrointestinal y/o que están correlacionadas con una actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable son enfermedades comunes con predominio generalizado. Las enfermedades de ambos grupos se caracterizan por dolor abdominal, malestar, distensión, hinchazón, diarrea, estreñimiento, trastorno digestivo, urgencia de defecación y/o número reducido y/o aumentado de evacuaciones intestinales, sensación de evacuación incompleta y/o combinaciones de los mismos, conduciendo con ello a un bienestar general significativamente reducido de las personas afectadas. En particular, con respecto al síndrome de intestino irritable (SII) sigue faltando un tratamiento eficaz (Brenner y Chey, 2009). Varias medicaciones para el SII han sido retiradas o restringidas debido a efectos adversos para la salud. Además, las terapias actuales están dirigidas fundamentalmente a síntomas aislados y no alivian el SII ni mejoran en general la calidad de vida (CDV).

Se cree de forma generalizada que las enfermedades que están correlacionadas con un trastorno funcional del tracto gastrointestinal, tal como el SII o la enfermedad inflamatoria intestinal, van acompañadas de (i) un desequilibrio de la microbiota intestinal (Kassinen *et al.*, 2007) y/o (ii) una barrera intestinal disfuncional del tracto gastrointestinal (Marshall *et al.*, 2004). Se cree que esto da como resultado una reducción de las bacterias probióticas, tales como *Bifidobacteria*, en el tracto gastrointestinal. Además, se cree que una barrera intestinal disfuncional causa la entrada no deseable de bacterias patógenas facultativas en la mucosa, lo que puede llevar subsiguientemente a una actividad inflamatoria gastrointestinal. Estudios recientes proponen que esta inflamación desencadena síntomas típicos de SII, tales como dolor, motilidad y disfunción del intestino.

El desequilibrio de la microbiota intestinal se caracteriza principalmente por un número reducido de microorganismos no patógenos de origen humano, tales como las *Bifidobacteria*, mientras que aumenta el número de microorganismo patógenos facultativos, tales como las *Enterobacteria* (Jian-Min *et al.*, 2004). Se cree que este desequilibrio lleva a una mayor producción de compuestos gaseosos y de ácidos grasos de cadena corta, dismotilidad, flatulencia y dolor de las personas afectadas. Así, para devolver a la microbiota intestinal al equilibrio o mejorar la barrera intestinal, se presta especial atención a las bacterias probióticas. Los “probióticos”, que comprenden bacterias probióticas de origen humano no patógeno han sido definidos como alimentos y fármacos microbianos vivos que, tras ser ingeridos en ciertas cantidades ejercen efectos salutíferos que van más allá de su nutrición básica inherente. Tradicionalmente se han usado mezclas de diversos microorganismos, particularmente especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, en productos lácteos fermentados o fármacos para promover la salud.

Se han realizado muchos estudios sobre este asunto; sin embargo, dado que el desequilibrio de la microbiota intestinal es tan solo una cara de la moneda, no es de extrañar que la mayoría de terapias que se centran simplemente en la administración de probióticos al tracto gastrointestinal no haya tenido éxito en el alivio de todos los síntomas de los pacientes aquejados de un trastorno funcional del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, el SII se diagnostica por los criterios de Roma III, que son, básicamente: dolor o malestar abdominal al menos 3 días por mes durante los tres últimos meses con síntomas que comenzaron al menos hace 6 meses combinados con al menos dos criterios de (a) defecación menos dolorosa, (b) inicio asociado con un cambio en la frecuencia de las deposiciones o (c) en la consistencia de las heces y es acompañado a menudo por hinchazón o distensión, y dificultades de evacuación intestinal, ya sean por estreñimiento y/o diarrea. Junto con estos síntomas, los pacientes pueden adolecer de un menoscabo de la función social y personal y de una menor calidad de vida. No obstante, aunque síntomas tales como dolor/malestar, distensión/hinchazón o urgencia de defecación sean en gran medida eliminados, es muy deseable una mejora en la calidad de vida (CDV) relacionada con la salud general del paciente. Hasta la fecha, ninguno de los tratamientos proporcionados, incluyendo los de probióticos y otros, ha sido capaz de mejorar los síntomas de dolor/malestar, distensión/hinchazón y trastorno digestivo simultáneamente con la CDV.

En este sentido, tiene que considerarse el segundo aspecto importante en el desarrollo de un trastorno funcional del tracto gastrointestinal, que concierne a una barrera intestinal disfuncional del tracto gastrointestinal caracterizada por una mayor permeabilidad de la misma. Una teoría muy popular en este sentido es que las perturbaciones en el intestino permiten que microorganismos patógenos —que podrían dominar en caso de un desequilibrio de la microbiota intestinal— atraviesen la barrera y penetren en la mucosa, causando con ello reacciones inflamatorias. Con base en esta hipótesis, se han realizado varios estudios que se centran en el tratamiento y el alivio de la reacción inflamatoria y sus efectos en el tracto gastrointestinal. El documento EP 1 141235, por ejemplo, describe una cepa UCC35624 del *Bifidobacterium longum infantis* (*B. infantis*) para su aplicación en suplementos nutricionales y en fármacos que mostraron una intensa capacidad de estimular una respuesta antiinflamatoria en el anfitrión disminuyendo los niveles de IL-8 (Whorwell *et al.*, 2006) y normalizando la proporción IL-10/IL-12 (O’Mahony *et al.*, 2005). Sin embargo, diferentes fuentes cuestionan si el efecto del *B. infantis* puede ser atribuido a propiedades antiinflamatorias directas. Además, aunque el *Lactobacillus salivarius* también ha demostrado intensos efectos antiinflamatorios *in vitro* y en un modelo de ratones —comparable a *B. Infantis*— no ha demostrado efectos significativos en el alivio del SII y sus síntomas.

Cabe señalar que la eficacia de los probióticos es muy específica a la cepa y solo ciertas cepas podían ser capaces de mejorar el SII y sus síntomas. Hasta la fecha, varios estudios han examinado los efectos de los probióticos en

síntomas de enfermedades que están correlacionadas con un trastorno funcional del tracto gastrointestinal, tales como el SII (O'Mahony *et al.*, 2005; Kajander *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2008; Guyonnet *et al.*, 2007). Sin embargo, solo algunos podían mostrar un beneficio significativo. Además, ninguna cepa probiótica demostró un efecto de alivio significativo de los síntomas del síndrome de intestino irritable y una calidad de vida mejorada simultáneamente.

- 5 Estos hallazgos podrían atribuirse al hecho de que la eficacia de los probióticos es muy específica a la cepa. Se acepta de forma generalizada que las propiedades de una cepa probiótica no pueden ser transferidas a otra (Brenner y Chey, 2009). Por lo tanto, es importante reconocer que no pueden predecirse la eficacia y el efecto de una sola cepa probiótica, lo que subraya la importancia de los ensayos y la demostración de la eficacia de una sola cepa. Con este fin se describen métodos en la sección experimental.
- 10 Nunca antes un estudio probiótico ha demostrado una reducción de los síntomas anteriormente mencionados (dolor/distensión/hinchazón/urgencia/trastorno digestivo) y una mejora simultánea de la calidad de vida de un paciente en una enfermedad como el SII. Así, hay una necesidad significativa de una terapia que mejore los síntomas de dolor/malestar, distensión/hinchazón, urgencia y trastorno digestivo de un paciente que adolece de un trastorno funcional del tracto gastrointestinal, teniendo en cuenta que se refuerza la funcionalidad de la pared intestinal.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una formulación probiótica que comprende una cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM n° 24514, para ser usada en el tratamiento del síndrome de intestino irritable o de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por evacuación de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pouchitis, colitis postinfecciosa, enfermedad diarreica, diarrea asociada al *Clostridium difficile*, y combinaciones de las mismas. Dicha cepa fue aislada de una muestra fecal de un adulto sano; las propiedades generales de la cepa fueron dadas a conocer por Guglielmetti *et al.* ("Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, n° 15, 2008, páginas 4695-4702 y "Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines", *Curr. Microbiology*, vol. 59, 2009, páginas 167-172).

- 20
- 25 En la presente invención, el *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, mejoró significativamente los síntomas de dolor/malestar abdominal, distensión/hinchazón, urgencia y trastorno digestivo de una enfermedad gastrointestinal, en particular del SII. El alivio del SII general junto con una mejora de los síntomas aislados de dolor/malestar, distensión/hinchazón, urgencia y trastorno digestivo con una mejora simultánea de la CDV con la cepa para su uso según la invención fue un resultado inesperado, ya que en la técnica anterior es sabido y aceptado que la eficacia de un probiótico es muy específica a la cepa, e incluso miembros estrechamente relacionados de una especie de una cepa de *Bifidobacterium* no tienen propiedades comparables ni están tan siquiera inactivos en las enfermedades gastrointestinales (Brenner y Chey, 2009). Sin entrar en consideraciones teóricas, los inventores creen que la notabilísima e inesperada eficacia del *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, definido en las reivindicaciones, es debida a su capacidad de impedir que las bacterias patógenas atraviesen la barrera intestinal del tracto gastrointestinal y su penetración de la mucosa. Suponiendo que la disfunción de la barrera intestinal sea debida a "agujeros" o partes debilitadas en la pared intestinal a través de las cuales los microorganismos patógenos podrían entrar en la mucosa, los inventores creen que la adhesión de las células de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 a la pared intestinal reduce la permeabilidad de la barrera, mejorando con ello la pared intestinal en un modo de acción de "tapado de agujeros". Además, es muy importante que también se mantenga la reducción de los síntomas o de la propia enfermedad durante la fase de eliminación, es decir, la fase posterior al fin de la terapia, en la que, por ejemplo, no se administra al sujeto o paciente ninguna formulación probiótica adicional para su uso según la invención. En caso de que la cepa contenida en la formulación probiótica para su uso según la invención, el efecto positivo de la cepa se mantiene en caso de síntomas globales de SII, dolor/malestar abdominal, distensión/hinchazón y trastorno digestivo durante la fase de eliminación, según se explicará con detalle posteriormente y también se lo presenta en la sección de Ejemplos y las Figuras.
- 30
- 35
- 40
- 45

Así, la presente invención proporciona una formulación probiótica que comprende una cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM n° 24514, para ser usada en el tratamiento del síndrome de intestino irritable, o de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por evacuación de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pouchitis, colitis postinfecciosa, enfermedad diarreica, diarrea asociada al *Clostridium difficile*, y combinaciones de las mismas. Dicha cepa es especialmente para su uso como mecanismo médico probiótico en alimentos y/o medicamento para aliviar, impedir y/o tratar dolor abdominal, hinchazón, obstipación, trastorno digestivo, número reducido de evacuaciones intestinales, número aumentado de evacuaciones intestinales, sensación de evacuación incompleta, síntomas globales de SII y/o combinaciones de los mismos. La utilidad de la cepa en el alivio, la evitación y/o el tratamiento de un sujeto que adolezca de dolor abdominal, malestar, distensión, trastorno digestivo, hinchazón, urgencia y/o número reducido y/o aumentado de evacuaciones intestinales, sensación de evacuación incompleta, síntomas globales de SII y/o combinaciones de los mismos puede ser evaluada usando una escala de Likert de 7 puntos, que es usada comúnmente en estudios clínicos y es divulgada también en la presente memoria. La calidad de vida (CDV) de un paciente puede ser evaluada usando el cuestionario SF-12 estándar, que es también conocido para una persona experta en la técnica y en estudios clínicos y es un estándar aceptado para medir la CDV. Además, en caso de síntomas globales de SII, dolor/malestar abdominal, distensión/hinchazón, el efecto positivo de la cepa dada a conocer en la presente memoria se mantiene durante la fase de eliminación, según se explicará con detalle a continuación y también se presenta en la sección de Ejemplos y las Figuras.

- 50
- 55
- 60

Según la invención, la formulación probiótica definida en las reivindicaciones es usada para tratar el síndrome de intestino irritable, o una enfermedad seleccionada del grupo constituida por evacuación de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, pouchitis, colitis postinfecciosa, enfermedad diarreica, diarrea asociada al *Clostridium difficile* y combinaciones de las mismas, siendo la enfermedad, preferentemente, la evacuación de intestino irritable.

En realizaciones alternativas, las células de la cepa son viables o no viables. Con células no viables, la preparación del producto es más simple; las células pueden ser incorporadas fácilmente en productos farmacéuticos, y los requisitos de almacenamiento son mucho menos limitados que en el caso de las células viables. Las células pueden ser muertas térmicamente o mediante exposición a un pH alterado o su sometimiento a presión.

10 La invención proporciona así una formulación probiótica que comprende una cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM n° 24514, para ser usada en un tratamiento definido en las reivindicaciones.

En una realización preferente, la formulación probiótica comprende, además, al menos un prebiótico. Preferentemente, el prebiótico es inulina o un fructooligosacárido.

15 En cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente, la formulación probiótica puede comprender, además, al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable, un vehículo ingerible, un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad farmacológica, un compuesto biológico y/o una proteína y/o péptido, en particular una proteína y/o péptido que sea rico en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un elemento mineral y/o traza; opcionalmente, dicho al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable es un miembro seleccionado del grupo constituido por una o más vitaminas, tales como vitaminas del grupo B, uno o más minerales, tales como calcio o magnesio, uno o más hidratos de carbono, tales como lactosa, maltodextrina, inulina, dextrosa, manitol, maltosa, dextrina, sorbitol, fructosa y una mezcla de los mismos. Preferentemente, el vehículo ingerible es una cápsula, un comprimido, polvo o un producto alimenticio; opcionalmente, el producto alimenticio es un producto lácteo, leche acidificada, yogur, yogur helado, elaboraciones a base de yogur, tales como yogur bebible fermentado, yogur bebible, queso, nata fermentada, postres a base de leche, leche fermentada o leche humanizada, leche en polvo, leche concentrada, pasta, salsa, bebida de queso y otros.

En una realización, la formulación probiótica comprende, además, una proteína y/o péptido, en particular una proteína y/o péptido que es rica en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un elemento mineral y/o traza.

30 En cualquiera de las realizaciones anteriores, la cepa puede estar presente en la formulación probiótica a más de 10^1 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, preferentemente la cepa está presente a más de 10^7 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, más preferentemente la cepa está presente a más de 10^8 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, aún más preferentemente la cepa está presente a más de 10^9 ufc o más de 10^{10} ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio. Una "unidad de polvo" denota una cantidad de polvo que comprende más de 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc), preferentemente más de 10^7 ufc, más preferentemente más de 10^8 ufc, aún más preferentemente más de 10^9 ufc o más de 10^{10} ufc. Así, una unidad de polvo representa la cantidad que comprende la dosis diaria estándar de un paciente; sin embargo, la dosis diaria puede aumentarse o reducirse debido a varias razones y de varias formas que se describen a continuación. Una cantidad típica en peso de una unidad de polvo debería ser fácilmente ingerible y digerible, oscilando de mg a varios gramos, por ejemplo 5 g, 10 g, 15 g o más. Una unidad de polvo también puede ser mezclada con cualquier producto alimenticio mencionado en la presente memoria y también con otro producto alimenticio que sea considerado adecuado por una persona experta en la técnica. Así, la cantidad de ufc por cantidad en peso de polvo puede ser mucho mayor que la dosis diaria estándar en una cantidad de polvo que se considere fácilmente ingerible y digerible. Aquí, el polvo tendrá que ser diluido con otros componentes permitidos en la formulación probiótica según se ha descrito anteriormente. Una "unidad de producto alimenticio" o "producto alimenticio" en general denota una cantidad típica en peso o volumen que es considerada la cantidad estándar o típica del producto alimenticio particular usada como vehículo ingerible, una cantidad típica propuesta como porción de consumo para ser comida o bebida, una unidad de envasado o comparable. Una "unidad de vehículo ingerible" denota, por ende, un comprimido, una cápsula, un supositorio o comparable o una unidad de polvo o una unidad de producto alimenticio, que denota una cantidad típica en peso o volumen que es considerada la cantidad estándar o típica del producto alimenticio particular usada como vehículo ingerible, una cantidad típica propuesta como porción de consumo para ser comida o bebida, una unidad de envasado o comparable.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, la cantidad diaria de la cepa administrada a un paciente en la formulación probiótica no es, preferentemente, inferior a 10^1 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc, preferentemente no menos de 10^7 ufc, más preferentemente no menos de 10^8 ufc, aún más preferentemente no menos de 10^9 ufc o no menos de 10^{10} ufc.

La formulación probiótica según cualquiera de las realizaciones anteriores es para ser usada en el tratamiento del síndrome de intestino irritable o de una enfermedad, seleccionada, por ejemplo, del grupo constituido por evacuación de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pouchitis, colitis postinfecciosa, enfermedad diarrea, diarrea asociada al *Clostridium difficile* y combinaciones de las mismas.

- 5 Preferentemente, la enfermedad es el síndrome de intestino irritable. Dicha cepa es específicamente para ser usada como probiótico, en alimentos, un dispositivo médico y/o un medicamento para aliviar, prevenir y/o tratar dolor abdominal, hinchazón, obstipación, trastorno digestivo, número reducido de evacuaciones intestinales, número aumentado de evacuaciones intestinales, sensación de evacuación incompleta, síntomas globales de SII y/o combinaciones de los mismos.
- 10 Un método de producción de la formulación probiótica para ser usada según la invención comprende al menos las siguientes etapas:
- a) fermentar y/o madurar la cepa *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM n° 24514, en un medio líquido de cultivo rico en proteínas,
 - b) cosechar las células por centrifugación, estabilización, liofilización, trituración y tamizado de las células,
 - 15 c) opcionalmente, mezclar/combinar las células con uno o más miembros del grupo constituido por un prebiótico, un compuesto farmacéuticamente aceptable, un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad farmacológica, un compuesto biológico, una proteína y/o péptido, etcétera, e
 - d) introducir las células de la etapa b) o la mezcla de la etapa c) en un vehículo ingerible.

20 El *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, pertenece al género de las *Bifidobacteria* que son grampositivas, carecen de motilidad, a menudo bacterias anaerobias ramificadas generalmente presentes en el tracto gastrointestinal y la vagina. Comúnmente se aíslan de las heces de bebés y adultos sanos. Si se hace referencia a las cepas, también se quiere decir las células de la cepa. Ya se ha descrito que las *Bifidobacteria* contribuyen a la digestión, están asociadas con una menor incidencia de alergias y también pueden desempeñar un papel en la prevención de algunas formas de crecimiento tumoral. Las *Bifidobacteria* pertenecen a la familia *Bifidobacteriaceae* de las *Actinobacteria*. El depósito de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 se efectuó en el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) el 26 de enero de 2011 y se depositó como depósito DSM n° 24514.

30 Una "enfermedad" es cualquier condición de un sujeto, también denominado paciente o ser humano, que está alterada en comparación con la condición de un sujeto que es considerado sano. En general, una enfermedad definida en las reivindicaciones está correlacionada con un trastorno funcional del tracto gastrointestinal, con actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable, con desequilibrio de la microbiota intestinal, reducción de *bifidobacteria* en el tracto gastrointestinal, barrera intestinal disfuncional del tracto gastrointestinal y/o combinaciones de los mismos. Las enfermedades que son abordadas por la cepa en la formulación probiótica pueden ser seleccionadas del grupo constituido por evacuación de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable, pouchitis, colitis postinfecciosa, enfermedad diarrea, diarrea asociada al *Clostridium difficile* y combinaciones de los mismos. un "síntoma" o "síntoma individual" es la forma en que se manifiesta una enfermedad de un sujeto, tal como dolor abdominal, malestar, distensión, hinchazón, trastorno digestivo, urgencia y/o número reducido y/o aumentado de evacuaciones intestinales, sensación de evacuación incompleta, síntomas globales de SII y/o combinaciones de los mismos y una calidad de vida global reducida. Los "síntomas globales del SII" comprenden una evaluación general de todos los síntomas individuales mencionados anteriormente con respecto al SII. Un "paciente" (= persona o ser humano o animal) es un sujeto no sano que ingiere la formulación probiótica para ser usada según la invención que comprende una cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM n° 24514 por razones de tratamiento, ya que el paciente, persona, ser humano o animal, adolece de cualquier enfermedad definida en las reivindicaciones. Así, un paciente (= persona) está necesitado de una nueva terapia, tal como una terapia con la cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM n° 24514.

45 La formulación probiótica para su uso en la presente invención es para su uso como probiótico, en alimentos y/o en un medicamento y comprende una cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM n° 24514. La formulación probiótica para su uso en la presente invención también puede ser considerada una formulación farmacéutica. "Alimento" denota, en principio, cualquier forma de una sustancia o material que sea ingerible y digerible por un ser humano y, preferentemente, también por un animal. En general, esto comprende sustancias o materiales que pueden ser comidos o bebidos para proporcionar soporte nutricional para el cuerpo y/o placer. En el caso de un ser humano, estas sustancias pueden ser de origen vegetal, microbiano o animal. Opcionalmente, en la formulación probiótica puede haber comprendidos al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable, un vehículo ingerible, un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad farmacológica, un compuesto biológico y/o una proteína y/o péptido, en particular una proteína y/o péptido que sea rica en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un elemento mineral y/o traza; opcionalmente, dicho al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable es un miembro seleccionado del grupo constituido por una o más vitaminas, tales como las vitaminas del grupo B, uno o más minerales, tales como calcio o magnesio, uno

o más hidratos de carbono, tales como lactosa, maltodextrina, inulina, dextrosa, manitol, maltosa, dextrina, sorbitol, fructosa y una mezcla de los mismos. En general, los medicamentos y otros productos terapéuticos son sometidos a normas y procedimientos de autorización más estrictos. Estos procedimientos de autorización no son necesarios en caso de un alimento. Según se ha explicado ya anteriormente, un “probiótico”, en el sentido de la invención, comprende bacterias probióticas de origen humano no patógeno y ha sido definido como un alimento microbiano vivo y como suplementos médicos que, tras su ingestión en ciertas cantidades, ejercen efectos salutíferos que van más allá de su nutrición básica inherente. Tradicionalmente se han usado mezclas de diversos microorganismos, particularmente especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, en productos lácteos fermentados o fármacos para promover la salud. El probiótico para ser usado en la presente invención comprende la cepa *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, definida en las reivindicaciones. Sin embargo, también puede haber presentes adicionalmente otras cepas que han sido consideradas probióticos útiles en la formulación probiótica para ser usada en la presente invención como un componente bacteriano. Estas son, por ejemplo, cepas probióticas de las especies *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Streptococcus* o mezclas de las mismas. Así, un “componente bacteriano” denota una cepa o una célula de una cepa probiótica viable o no viable, según se ha mencionado anteriormente, y puede ser usado, además, para compuestos tales como moléculas biológicas, polisacáridos, lípidos, etcétera, de origen bacteriano o producidos por fermentación o expresión bacterianas. Incluso el material muerto de cualquier especie bacteriana puede ser entendido como compuesto bacteriano.

La formulación probiótica para ser usada en la invención puede comprender al menos un prebiótico o una combinación de dos, tres, cuatro o incluso más prebióticos diferentes. Un “prebiótico” en el sentido de la invención está previsto que sirva de nutriente a la cepa que ha de ser usada en la invención y para mantenerlos en un estado viable y sano después de descongelarse partiendo de la liofilización. Por gramo de células microbianas, es decir, por gramo de cepa, es necesario en general, 2 - 5 g, preferentemente ~2,5 g, más preferentemente al menos 2,5 g, aún más preferentemente al menos 3 g, siendo lo más preferible al menos 4 g de prebiótico. En general, se usan como prebiótico ingredientes alimentarios no digeribles por los seres humanos, tales como ciertos hidratos de carbono. Ejemplos de prebiótico comprenden hidratos de carbono, preferentemente oligosacáridos, inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, zaragatona, oligofructosa, isomaltooligosacáridos xilooligosacáridos, sojaligosacáridos, maltodextrina, glucooligosacáridos, mananoligosacáridos, arabinogalactano, arabinxilano, lactosacarosa, glucomanano, lactulosa, polidextrosa, oligodextrano, gentiooligosacáridos, oligosacáridos pécticos, goma xantana, goma arábica, hemicelulosa, almidón resistente y sus derivados, y mezclas y/o combinaciones de los mismos.

La formulación probiótica para ser usada en la invención puede comprender al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable, al menos un vehículo ingerible, al menos un adyuvante, al menos un componente bacteriano, al menos una entidad farmacológica, al menos un compuesto biológico y/o al menos una proteína y/o péptido, en particular una proteína y/o péptido que sea rica en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un elemento mineral y/o traza.

Un “compuesto farmacéuticamente aceptable” denota un producto químico o compuesto biológico líquido, sólido o gaseoso que es aceptable en una composición o formulación farmacéutica caracterizada por una buena tolerabilidad por la fisiología y el cuerpo humanos y también animales que es farmacológicamente inactiva o que no tiene ningún efecto dañino en la fisiología del receptor. Al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso más compuestos farmacéuticamente aceptables diferentes pueden estar presentes en la formulación probiótica para su uso en la invención en cantidades diferentes. La cantidad puede ser ajustada por el fabricante según las necesidades específicas de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* que se use y según cierta aplicación, vía de administración o posología. Ejemplos de compuestos farmacéuticamente aceptables incluyen prebióticos, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerales, elementos traza, aminoácidos, ácidos nucleicos, maltodextrina, inulina, lactosa, glucosa, sacarosa, maltosa, dextrina, dextrosa, fructosa, sorbitol, fructooligosacárido, manitol, almidón de maíz, celulosa cristalina, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, silicato de calcio, celulosa microcristalina, celulosa, polivinilpirrolidona, goma tragacanto, gelatina, preferentemente gelatina bovina, jarabe, aminosalicilato, sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 4-aminosalicílico, benzalazina, sal de diclorhidrato, olsalazina, balsalazida, subsalicilato de bismuto, metil celulosa, carboximetil celulosa, ésteres de ácido metilhidroxibenzoico, ésteres de ácido propilhidroxibenzoico, talco, estearatos de magnesio, polímeros inertes, agua y aceites minerales, iodo, magnesio, complejo de aspartato-ascorbato de magnesio, quelato aminoácido de magnesio, cinc, quelato aminoácido de cinc, selenio, complejo aminoácido de selenio, cobre, quelato aminoácido de cobre, manganeso, quelato aminoácido de manganeso, cromo, polinicotinato de cromo, molibdeno, quelato aminoácido de molibdeno, potasio, complejo de aspartato-ascorbato de potasio, colina, bitartrato de colina, inositol, vanadio, sulfato de vanadilo, boro, aspartato-citrato de boro, bioflavonoides cítricos, goma de celulosa modificada, sílice, estearina vegetariana, dióxido de titanio, estearato de magnesio, siendo preferentemente dichos al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o incluso más compuestos farmacéuticamente aceptables un miembro seleccionado del grupo constituido por una o más vitaminas, tales como las vitaminas B, uno o más minerales, tales como magnesio y calcio, uno o más hidratos de carbono, gelatina, preferentemente gelatina bovina, manitol, dextrina, fructosa, sorbitol, un prebiótico, maltosa, maltodextrina, inulina, dextrosa, hierro, lactosa y una mezcla de los mismos. Además, la formulación probiótica puede comprender materiales de carga, aglutinantes, lubricantes, humectantes, desintegrantes, emulsionantes, dispersantes, conservantes, edulcorantes y aromatizantes farmacéuticamente aceptables que son conocidos para una persona experta en la técnica.

La formulación probiótica para el uso en esta invención puede ser formulada de modo que, tras su administración a un paciente, la cepa o las células sean liberadas rápida, continua o lentamente. Ejemplos de vitaminas que pueden estar comprendidas en la formulación probiótica para el uso en la invención son vitaminas hidrosolubles y no hidrosolubles, tales como vitamina A (por ejemplo, retinol, retinal y carotenoides, incluyendo beta caroteno), vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (por ejemplo, niacina, niacinamida, nicotinamida), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₆ (por ejemplo, piridoxina, piridoxamina, piridoxal), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₉ (por ejemplo, ácido fólico, ácido folínico), vitamina B₁₂ (por ejemplo, cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina D (por ejemplo, ergocalciferol, colecalciferol), vitamina E (por ejemplo, tocoferoles, tocotrienoles), vitamina K (por ejemplo, filoquinona, menaquinonas); preferentemente hay 5
10
15
20
vitaminas del grupo B comprendidas en la formulación probiótica para su uso en la invención, tales como vitamina B₁ (tiamina), vitamina B₂ (riboflavina), vitamina B₃ (por ejemplo, niacina, niacinamida, nicotinamida), vitamina B₅ (ácido pantoténico), vitamina B₆ (por ejemplo, piridoxina, piridoxamina, piridoxal), vitamina B₇ (biotina), vitamina B₉ (por ejemplo, ácido fólico, ácido folínico), vitamina B₁₂ (por ejemplo, cianocobalamina, hidroxicobalamina, metilcobalamina) y mezclas de las mismas. Ejemplos de minerales comprendidos en la formulación probiótica para su uso en la invención son magnesio, calcio, cinc, selenio, hierro, cobre, manganeso, cromo, molibdeno, potasio, vanadio, boro, titanio; preferentemente, están presentes magnesio y/o calcio. Un “elemento traza” es un elemento químico que solo se necesita en cantidades muy bajas para el crecimiento, el desarrollo y/o la fisiología del organismo, preferentemente de un organismo humano. “Hidratos de carbono” son compuestos orgánicos que consisten únicamente en carbono, hidrógeno y oxígeno y que tienen la fórmula empírica C_m(H₂O)_n, en la que la proporción atómica entre hidrógeno y oxígeno es 2:1. “Lípidos” son compuestos biológicos no hidrosolubles al menos parcialmente debido a una parte larga hidrófoba del hidrato de carbono. Los lípidos son una parte muy importante de las membranas celulares en los sistemas biológicos.

Un “vehículo ingerible”, en el sentido de la invención, es un vehículo que es usado para la administración a un paciente de la formulación probiótica para su uso en la invención que contribuye a ingerir la formulación probiótica y la cepa. La expresión “producto lácteo”, según se usa en la presente memoria, se pretende que signifique que incluye un medio que comprende leche de origen animal y/o vegetal. La leche de origen animal incluye leche de vaca, de oveja, de cabra y de búfala. Como leche de origen vegetal se puede mencionar cualquier sustancia fermentable de origen vegetal que pueda ser usada según la invención, en particular que se originen en habas de soja, arroz o cereales. Un posible vehículo ingerible es un miembro seleccionado del grupo constituido por una 25
30
35
cápsula, un comprimido, polvo, gránulos, pastillas, una cápsula de oblea en forma de píldora, un elixir, una emulsión, una solución, un jarabe, una suspensión, una cápsula de gelatina blanda y dura, un supositorio, un polvo envasado de forma aséptica o un producto alimenticio; opcionalmente, el producto alimenticio es un producto lácteo, leche acidificada, yogur, yogur helado, elaboraciones a base de yogur, tales como yogur bebible fermentado, yogur bebible, queso, nata fermentada, postres a base de leche, leche fermentada o leche humanizada, leche en polvo, leche concentrada, pasta, salsa, bebida de queso y otros. Un “adyuvante”, en el sentido de la invención, es un agente farmacológico o inmunológico que modifica el efecto de otros agentes, tales como fármacos o vacunas, o de la formulación probiótica para su uso en la presente invención mientras tiene pocos efectos directos —en caso de tenerlos— cuando se da por sí solo.

“Entidad farmacológica” está relacionado con un compuesto químico o biológico que es farmacéuticamente activo a la vez que es farmacéuticamente tolerable al paciente, tal como bisacodilo, loperamida, aminosalicilato, sulfasalazina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 4-aminosalicílico, benzalazina, sal de diclorhidrato, olsalazina, balsalazida, subsalicilato de bismuto o mezclas de los mismos. Tal compuesto puede ser cualquier compuesto que promueva los efectos beneficiosos de la formulación probiótica para su uso según la invención directa o indirectamente. Directamente significa que la propia cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 es protegida, estando soportados su crecimiento o su adhesión a la barrera intestinal. Indirectamente significa que sustancias o 40
45
50
55
60
compuestos adicionales —es decir, entidades farmacológicas que se sabe que son útiles en la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad correlacionada con un trastorno funcional del tracto gastrointestinal, con una actividad inflamatoria gastrointestinal no deseable, con un desequilibrio de la microbiota intestinal, con una reducción de *Bifidobacteria* en el tracto gastrointestinal y/o una barrera intestinal disfuncional del tracto gastrointestinal, o para su uso para aliviar, prevenir y/o tratar a un sujeto que adolece de dolor abdominal, malestar, distensión, hinchazón, trastorno digestivo, urgencia y/o número reducido y/o aumentado de evacuaciones intestinales, sensación de evacuación incompleta y/o combinaciones de los mismos— pueden estar comprendidas solas o en combinación con otras entidades farmacológicas en la formulación probiótica. En particular, una entidad farmacológica puede estar comprendida en la formulación probiótica que sea un medicamento conocido para tratar el síndrome de intestino irritable, o una enfermedad seleccionada del grupo constituido por evacuación de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pouchitis, colitis postinfecciosa, enfermedad diarrea, diarrea asociada al *Clostridium difficile* y combinaciones de las mismas. Ejemplos de tal entidad farmacológica conocidos para una persona experta en la técnica pueden encontrarse en la Rote Liste (Lista Roja) de Alemania (2010) o en cualquier otro registro farmacéutico. Un “compuesto biológico” puede ser cualquier compuesto biológico, tal como un compuesto vegetal, animal o microbiano de hidrato de carbono, aminoácido, lípido, ácido nucleico, proteína, péptido, compartimento celular, fosfolípidos, poliéter. “Proteína”, “péptido” o “polipéptido” han de ser entendidos según su significado general de ser una composición lineal de aminoácidos proteinogénicos o no proteinogénicos, en la que las proteínas pueden comprender también una o más subunidades y sustancias catalíticamente relevantes, tales como vitaminas, minerales o sustancias.

“Unidad formadora de colonias” (ufc) es una medida de células bacterianas viables de la cepa del *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención. La formulación probiótica para el uso en la invención puede comprender la cepa a más de 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, preferentemente la cepa está presente a más de 10^7 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, más preferentemente la cepa está presente a más de 10^8 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio, aún más preferentemente la cepa está presente a más de 10^9 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio. La cantidad diaria de la cepa administrada a un paciente en la formulación probiótica no es inferior a 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc, preferentemente no menos de 10^7 ufc, más preferentemente no menos de 10^8 ufc, aún más preferentemente no menos de 10^9 ufc o no menos de 10^{10} ufc. La cantidad diaria puede incrementarse dependiendo de la condición fisiológica del paciente; es decir, en caso de síntomas severos. Aquí, puede aumentarse la cantidad porque la cantidad diaria se duplique, se triplique o se multiplique. Por el contrario, la cantidad diaria puede reducirse, a la mitad o ser dividida por dos, por tres o cuatro por ejemplo en caso de intolerancia, o medicación adicional, o las cantidades diarias mencionadas anteriormente pueden no ser administradas a diario, sino cada segundo o tercer día, o semanalmente. La formulación probiótica puede tomarse a cualquier hora que sea considerada conveniente por el paciente, tal como por la mañana, a mediodía, por la tarde o de noche, siendo la hora, preferentemente, por la mañana, por ejemplo después de despertar, o por la noche, por ejemplo antes de acostarse. Si la formulación probiótica comprende un vehículo ingerible que es un producto alimenticio, la administración se lleva a cabo según la naturaleza del vehículo ingerible, es decir, del producto alimenticio. Si la formulación probiótica comprende un vehículo ingerible tal como una cápsula de comprimido o un vehículo ingerible comparable, la administración se realiza oralmente acompañada por una bebida o agua, preferentemente por agua.

En general, la formulación probiótica para ser usada en la invención es administrada según la forma específica del probiótico, el alimento o el medicamento. Así, normalmente, la formulación probiótica para ser usada en la invención es administrada oralmente, preferentemente de forma parenteral, o a través del recto.

El método para producir la formulación probiótica para ser usada en la invención comprende al menos las siguientes etapas:

- a) fermentar y/o madurar una cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM nº 24514, en un medio líquido de cultivo rico en proteínas,
- b) cosechar las células de las cepas anteriormente mencionadas por centrifugación, estabilización, liofilización, trituración y tamizado de las células,
- c) opcionalmente, mezclar/combinar las células con uno o más miembros del grupo constituido por un prebiótico, un compuesto farmacéuticamente aceptable, un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad farmacológica, un compuesto biológico, una proteína y/o péptido, e
- d) introducir las células de la etapa b) o la mezcla de la etapa c) en un vehículo ingerible.

En primer lugar, debería señalarse que la fermentación y la maduración de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención se pueden llevar a cabo mediante medios y métodos estándar que son conocidos para una persona experta en la técnica, según se describe en “Probiotics and Health Claims”, Wolfgang Kneifel, Seppo Salminen, John Wiley & Sons; 1ª edición (7 de enero de 2011).

En general, un medio para la maduración y/o el fermento de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención comprende al menos agua, dextrosa, extracto de levadura y minerales. El medio estándar usado para madurar y/o fermentar la cepa es caldo MRS (Difco, Detroit, Michigan, EE. UU.) complementado con clorhidrato de L-cisteína al 0,05% (cMRS). La persona experta es perfectamente consciente del hecho de que también pueden usarse otros medios para la maduración, el fermento y el precultivo de organismos bacterianos, tales como cepas de *Bifidobacterium bifidum*. Opcionalmente, antes de la etapa a), la cepa es madurada en un precultivo en un matraz oscilante. Con este fin, se inocula una única célula de la cepa en un volumen de al menos 200 mL, preferentemente de al menos 300 mL, más preferentemente de al menos 400 mL, aún más preferentemente de al menos 500 mL y siendo lo más preferible de al menos 600 mL de un medio estándar mencionado anteriormente. Este precultivo es madurado generalmente anaeróbicamente de noche a 37°C a 220 rpm.

El precultivo puede ser usado entonces completa o parcialmente para la inoculación de una fermentación mayor en un fermentador en un volumen de al menos 500 L, preferentemente de al menos 600 L, más preferentemente de al menos 700 L, aún más preferentemente de al menos 800 L, siendo lo más preferible de al menos 1000 L. Tras la fermentación de la cepa en un fermentador, el cultivo celular que contiene dicha cepa es transferido, al menos parcialmente, al fermentador principal, que tiene al menos un volumen de al menos 5000 L, preferentemente de al menos 7500 L, más preferentemente de al menos 10.000 L, aún más preferentemente de al menos 15.000 L, y siendo lo más preferible de al menos 20.000 L. También en el fermentador y en el fermentador principal, se usa el medio estándar anteriormente mencionado para la fermentación y el cultivo de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención. La fermentación y el cultivo se detienen, y las células son cosechadas después del

agotamiento de los hidratos de carbono comprendidos en el medio que sirve de nutriente para la cepa. En general, la densidad celular después del agotamiento es al menos 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 células/mL, preferentemente al menos 10^7 células/mL, más preferentemente al menos 10^8 células/mL, aún más preferentemente al menos 10^9 células/mL o al menos 10^{10} células/mL. Las personas expertas conocen métodos de determinación de la densidad celular o la biomasa, tal como la determinación de biomasa como peso seco usando procedimientos estándar de secado y determinación gravimétrica de tubos de vidrio pesados de antemano, o mediante medición de la densidad óptica usando un espectrofotómetro (tal como el Hitachi U-1100, Japón) con una absorción de 578 nm.

El prefermentador y el fermentador principal pueden derivarse de un biorreactor estándar adecuado para el cultivo, la fermentación, la maduración y/o el procesamiento de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* según se define en las reivindicaciones. Suministradores de biorreactores estándar son, por ejemplo, Applikon Biotechnology B.V. (Schiedam, Holanda), Infors (Bottmingen, Suiza), Bioengineering (Wald, Suiza) y Sartorius Stedim Biotech GmbH (Gottinga, Alemania). Tanto la prefermentación como la fermentación principal se llevan a cabo por lotes, lo que significa que generalmente ningún medio ni otros componentes se reponen durante la fermentación.

Después de la fermentación principal, las células son cosechadas mediante centrifugación, tal como usando una centrifugadora o separador discoidal que tiene una capacidad operativa de aproximadamente 2000 - 15.000 L/h, proporcionado por el GEA Westfalia Separator Group GmbH (Oelde, Alemania) u otros. Las células son estabilizadas, liofilizadas, trituradas y tamizadas subsiguientemente usando aplicaciones y medios estándar, que son muy conocidos para una persona experta en la técnica. La liofilización da un concentrado que tiene un volumen de 500 L a 1.000 L, preferentemente de 600 L a 800 L, y que tiene un peso de aproximadamente 100 kg a 200 kg, preferentemente de ~ 150 kg.

Después, las células son opcionalmente mezcladas con un prebiótico y/o al menos uno o más miembros del grupo constituido por un compuesto farmacéuticamente aceptable, un vehículo ingerible, un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad farmacológica, un compuesto biológico y/o una proteína y/o péptido y/o mezclas de los mismos, en particular una proteína y/o péptido que sea rica en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un elemento mineral y/o traza; opcionalmente, dicho al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable es un miembro seleccionado del grupo constituido por una o más vitaminas, tales como vitaminas del grupo B, uno o más minerales, tales como calcio o magnesio, uno o más hidratos de carbono, tales como lactosa, maltodextrina, inulina, dextrosa, manitol, maltosa, dextrina, sorbitol, fructosa, y una mezcla de los mismos en diferentes cantidades.

Para obtener las formulaciones probióticas para ser usadas en la invención, en general, 15 - 40 g, preferentemente 18 - 35 g, más preferentemente 20 - 30 g, aún más preferentemente 22 - 28 g, siendo lo más preferible 25 g de las células o la cepa de *Bifidobacterium bifidum* se mezclen con 50 - 100 g, preferentemente con 60 - 90 g, más preferentemente con 65 - 85 g, aún más preferentemente con 70 - 80 g, siendo lo más preferible con 75 g de uno o más miembros del grupo constituido por un prebiótico, un hidrato de carbono, un compuesto farmacéuticamente aceptable o mezclas de los mismos como nutriente para las células o la cepa, y son mezcladas opcionalmente con 30 - 70 g, preferentemente con 35 - 65 g, más preferentemente con 40 - 60 g, aún más preferentemente con 45 - 55 g, siendo lo más preferible con 50 g de uno o más miembros del grupo constituido por un compuesto farmacéuticamente aceptable, un vehículo ingerible, un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad farmacológica, un compuesto biológico y/o una proteína y/o péptido, en particular una proteína y/o péptido que sea rica en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un mineral, un elemento traza y/o mezclas de los mismos para la mejora de la capacidad de vertido de la formulación probiótica. Preferentemente, 15 - 40 g, preferentemente 18 - 35 g, más preferentemente 20 - 30 g, aún más preferentemente 22 - 28 g, siendo lo más preferible 25 g de células o de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención se mezclan con 50 - 100 g, preferentemente con 60 - 90 g, más preferentemente con 65 - 85 g, aún más preferentemente con 70 - 80 g, siendo lo más preferible con 75 g de un hidrato de carbono, una mezcla de hidratos de carbono, un prebiótico o una mezcla de los mismos, y, opcionalmente, con 30 - 70 g, preferentemente con 35 - 65 g, más preferentemente con 40 - 60 g, aún más preferentemente con 45 - 55 g, siendo lo más preferible con 50 g de uno o más miembros del grupo constituido por un compuesto farmacéuticamente aceptable, un hidrato de carbono, una vitamina, un mineral, un elemento traza y/o mezclas de los mismos. Más preferentemente, 15 - 40 g, preferentemente 18 - 35 g, más preferentemente 20 - 30 g, aún más preferentemente 22 - 28 g, siendo lo más preferible 25 g de células o de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención se mezclan con 50 - 100 g, preferentemente con 60 - 90 g, más preferentemente con 65 - 85 g, aún más preferentemente con 70 - 80 g, siendo lo más preferible con 75 g de un hidrato de carbono, inulina, un fructooligosacárido o una mezcla de los mismos y, opcionalmente, con 30 - 70 g, preferentemente con 35 - 65 g, más preferentemente con 40 - 60 g, aún más preferentemente con 45 - 55 g, siendo lo más preferible con 50 g de uno o más miembros del grupo constituido por una vitamina, tal como una vitamina del grupo B, uno o más minerales, tales como calcio o magnesio, uno o más hidratos de carbono, tales como lactosa, maltodextrina, inulina, dextrosa, manitol, fructooligosacárido, manitol, maltosa, dextrina, sorbitol, fructosa y una mezcla de los mismos. Aún más preferentemente, 25 g de células o de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención se mezclan con 75 g de un miembro seleccionado del grupo constituido por un hidrato de carbono, un prebiótico, maltodextrina, inulina, dextrosa, manitol, maltosa, dextrina, sorbitol, fructosa y una mezcla de los mismos, y se mezclan con 50 g de un miembro seleccionado del grupo constituido por celulosa, un compuesto farmacéuticamente aceptable, un vehículo ingerible, un adyuvante, un componente bacteriano, una entidad

farmacológica, un compuesto biológico y/o una proteína y/o péptido, en particular una proteína y/o péptido que sea rica en glutamina/glutamato, un lípido, un hidrato de carbono, una vitamina, un mineral, un elemento traza y una mezcla de los mismos, siendo lo más preferible que 25 g de células o de la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención se mezclen con 75 g de maltodextrina, y se mezclen con 50 g de celulosa. La mezcla/combinación de los componentes con las células o la cepa para su uso en la invención tras fermentar y/o madurar la cepa, la cosecha, la estabilización, la liofilización, la trituración y el tamizado pueden llevarse a cabo mediante técnicas, aplicaciones y medios estándar que son conocidos para una persona experta en la técnica, usándose preferentemente un mezclador de columna. Por supuesto, también pueden usarse cantidades mayores o menores en la mezcla/combinación, dependiendo del volumen del dispositivo usado para mezclar/combinar, siempre que la proporción de los componentes corresponda a las proporciones mencionadas anteriormente. Una proporción típica, por ejemplo, es 25% de cepa, 75% de prebiótico o hidrato de carbono o maltodextrina y 50% de compuesto farmacéuticamente aceptable, tal como celulosa.

Por ejemplo, 50 mg-300 mg, preferentemente 75 mg-250 mg, más preferentemente 100 mg-200 mg, aún más preferentemente 120 mg-175 mg, siendo lo más preferible que 150 mg de las células o la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención o de las formulaciones probióticas mencionadas anteriormente para su uso en la invención sean introducidas en una unidad de vehículo ingerible, por ejemplo en una cápsula, un comprimido, una pastilla, una cápsula de oblea en forma de píldora, un elixir, una emulsión, una solución, un jarabe, una suspensión, una cápsula de gelatina blanda y dura, un supositorio, un polvo envasado de forma aséptica o un producto alimenticio, tal como un producto lácteo, leche acidificada, yogur, yogur helado, elaboraciones a base de yogur, tales como yogur bebible fermentado, yogur bebible, queso, nata fermentada, postres a base de leche, leche fermentada o leche humanizada, leche en polvo, leche concentrada, pasta, salsa, bebida de queso y otros, preferentemente 50 mg, preferentemente 75 mg, más preferentemente 100 mg, aún más preferentemente 120 mg and siendo lo más preferible que 150 mg de las células o la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención o de las mezclas mencionadas anteriormente sean introducidos en una cápsula, un comprimido, una pastilla, una cápsula de oblea en forma de píldora, una cápsula de gelatina blanda y dura, un supositorio, más preferentemente en una cápsula, una cápsula de gelatina blanda y dura. Por ello, tras la introducción en la unidad de vehículo ingerible, es decir, la cápsula, el comprimido, el polvo, los gránulos, las pastillas, una cápsula de oblea en forma de píldora, un elixir, una emulsión, una solución, un jarabe, una suspensión, una cápsula de gelatina blanda y dura, un supositorio, un polvo envasado de forma aséptica o un producto alimenticio, tal como un producto lácteo, leche acidificada, yogur, yogur helado, elaboraciones a base de yogur, tales como yogur bebible fermentado, yogur bebible, queso, nata fermentada, postres a base de leche, leche fermentada o leche humanizada, leche en polvo, leche concentrada, pasta, salsa, bebida de queso comprende más de 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc, preferentemente más de 10^7 ufc, más preferentemente más de 10^8 ufc, aún más preferentemente más de 10^9 ufc o más de 10^{10} ufc. En cualquier caso, la cantidad en peso puede ser ajustada según la concentración de ufc, de modo que la cantidad de las células o la cepa de *Bifidobacterium bifidum* para su uso en la invención, en el producto final, tal como una cápsula, un comprimido, polvo, gránulos, una pastilla, una cápsula de oblea en forma de píldora, un elixir, una emulsión, una solución, un jarabe, una suspensión, una cápsula de gelatina blanda y dura, un supositorio, un polvo envasado de forma aséptica o un producto alimenticio corresponda a más de 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc, preferentemente más de 10^7 ufc, más preferentemente más de 10^8 ufc, aún más preferentemente más de 10^9 ufc o más de 10^{10} ufc. En caso de que la cantidad de ufc sea inferior a 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc, 10^7 ufc, 10^8 ufc, incluso 10^9 ufc o menos de 10^{10} ufc, el paciente puede adaptar las cantidades anteriormente mencionadas de ufc administrando más de una unidad de vehículo ingerible.

En una realización ejemplar, 25 mg de células de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, es decir, al menos 10^9 ufc de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, 75 mg de maltodextrina y 50 mg de celulosa son introducidos en una cápsula de gelatina, preferentemente en una cápsula de gelatina bovina. Preferentemente, la cápsula anteriormente descrita con 25 mg de células de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, que comprende al menos 10^9 ufc de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, 75 mg de maltodextrina y 50 mg de celulosa, es administrada una vez al día. En general, los vehículos ingeribles deberían ser de calidad entre estándar y alta, deberían satisfacer los requisitos de higiene de los suplementos alimenticios y pueden ser obtenidos de diversos fabricantes. Las cápsulas, por ejemplo cápsulas de gelatina bovina, pueden obtenerse, por ejemplo, en Capsugel (Bornem, Bélgica).

En otra realización preferente, 25 mg de células de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, que preferentemente comprenden al menos 10^9 ufc de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, y 2 g maltodextrina son mezclados y son considerados una unidad de polvo. Preferentemente, se administra una vez al día la unidad de polvo recién descrita con 25 mg de células de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514, es decir, al menos 10^9 ufc de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositado como depósito DSM n° 24514.

Con independencia del vehículo ingerible particular elegido por el paciente, la cantidad diaria de las células o la cepa de *Bifidobacterium bifidum* administrada a un paciente en la formulación probiótica no es inferior a 10^1 ufc, opcionalmente no menos de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc, preferentemente no menos de 10^7 ufc, más

preferentemente no menos de 10^8 ufc, aún más preferentemente no menos de 10^9 ufc o no menos de 10^{10} ufc. Anteriormente se presentan dosis alternativas.

Ejemplos

5 **1. Estudio doble ciego, aleatorizado y controlado por placebo para evaluar la eficacia del *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 en pacientes que padecen síndrome de intestino irritable**

1.1 Visión general

10 Ciento veintidós pacientes fueron aleatorizados con éxito para recibir ya fuera placebo (N=62) o *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 (N=60) (también considerados el “grupo de *Bifidobacteria*”). Los sujetos consumieron bien 1×10^9 ufc/cápsula o bien placebo una vez al día durante cuatro semanas. La severidad del SII y de los síntomas individuales de SII fue registrada diariamente en una escala de Likert de 7 puntos.

1.2 Población del estudio

15 Los pacientes fueron reclutados de los principales investigadores y mediante anuncios. El protocolo de estudio nutricional fue presentado ante el Comité de Ética de la Colegio Bávaro de Médicos. Para su inclusión se consideraron sujetos clínicamente poco llamativos con edades entre 18 y 68 años con SII leve a moderado (criterios de Roma III). Los individuos con enfermedad gastrointestinal orgánica inflamatoria, enfermedades sistémicas, cáncer, enfermedades autoinmunitarias, diabetes, intolerancia o inmunodeficiencia conocidas a la lactosa, cirugía abdominal adicional conocida, salvo apendectomía, con sigmoidoscopia o colonoscopia no libres de enfermedad en los cinco últimos años cuando contaban con más de 50 años de edad, a los que se les diagnosticara hipertiroidismo, que usaran antipsicóticos o corticosteroides sistémicos durante al menos 3 meses antes del comienzo del estudio, que padecieran un trastorno psiquiátrico importante, enfermedad celiaca o embarazo fueron excluidos.

1.3 Diseño del estudio

25 Este estudio fue llevado a cabo como un estudio nutricional prospectivo, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego controlado por placebo de dos brazos. En todo el estudio, los pacientes registraban diariamente sus síntomas globales de SII, así como sus síntomas individuales de SII usando un diario de paciente. Además, los pacientes eran interrogados en el despacho del médico en cuanto a sus síntomas globales e individuales de SII (visitas 2-4) y su calidad de vida (visitas 3 y 4). Las visitas al médico tuvieron lugar en la selección, después de dos semanas (fase de arranque), después de 6 semanas (fin del tratamiento) y después de 8 semanas (fin de la fase de eliminación) (Figura 1). Una vez que los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito, pudieron acceder al examen de selección en el día 1 (visita 1), que incluía un historial médico completo y un reconocimiento físico. Se tomó una muestra de sangre para su análisis en un laboratorio central, incluyendo una prueba de embarazo. En la visita de selección los pacientes recibieron la instrucción de que mantuvieran sus hábitos alimentarios y de estilo de vida en todo el estudio. Se les entregó un diario de paciente.

30 En la segunda visita (día 15), los diarios fueron revisados. Los pacientes que tuvieron al menos 2 días con dolor leve a moderado durante la segunda semana del arranque y que cumplían todos los criterios de inclusión y que no violaban ninguno de los criterios de exclusión fueron aleatorizados 1:1 para recibir ya fuera *B. bifidum* MIMBb75 o placebo. El tratamiento fue asignado según una lista de aleatorización por bloques generada por ordenador con un tamaño de bloque de 4. El tamaño de bloque no fue divulgado a los investigadores. Durante el periodo de intervención, los pacientes recibieron durante 4 semanas bien una cápsula diaria que comprendía la formulación probiótica o un placebo de aspecto idéntico. La asignación fue ciega tanto a los pacientes como al personal del centro.

35 Al final de la fase de tratamiento (visita 3, día 43), los investigadores recogieron el producto no usado del estudio y las bolsitas vacías para confirmar el cumplimiento. Los diarios fueron recogidos y revisados.

40 Después de una fase de eliminación libre de suplementos nutricionales (visita 4, día 57), se llevó a cabo un reconocimiento físico completo y se tomó una muestra de sangre. Se permitieron bisacodilo y loperamida como medicación de rescate. No se permitieron otros probióticos ni otras medicaciones que pudieran influir en la eficacia del producto del estudio.

1.4 Preparación del probiótico

45 El suplemento nutricional fue preparado según las condiciones de un buen procedimiento de fabricación (GMP). El *B. bifidum* MIMBb75 fue madurado en un medio de cultivo líquido rico en proteínas, cosechado mediante centrifugación, estabilizado, liofilizado, triturado y tamizado. Las bacterias en forma de polvo seco fueron mezcladas con un compuesto farmacéuticamente aceptable e introducidas en cápsulas de 1×10^9 ufc. Las cápsulas de placebo capsulas parecían idénticas y contenían maltodextrina.

1.5 Definiciones de los criterios de valoración

La variable primaria de eficacia definida prospectivamente fue la evaluación global por parte del sujeto de los síntomas del SII usando una escala de Likert de 7 puntos. Se pidió a los pacientes que respondieran diariamente la pregunta: "Si usted considera sus síntomas de SII (por ejemplo, dolor/malestar abdominal, distensión/hinchazón, trastorno digestivo, urgencia, hábitos intestinales) en general, ¿cómo se ha visto afectado estos síntomas durante las últimas 24 horas?" Las posibles respuestas oscilaban entre 0 (nada en absoluto), 1 (muy leve), 2 (leve), 3 (moderado), 4 (intenso), 5 (muy intenso) y 6 (intolerable).

Las variables secundarias de eficacia incluían los síntomas individuales del SII solos, tales como "dolor/malestar abdominal", "distensión/hinchazón", "trastorno digestivo" y "urgencia", registrados en la misma escala de Likert de 7 puntos. Las puntuaciones de los síntomas individuales fueron además combinadas en una puntuación compuesta de síntomas como la media aritmética de tres puntuaciones de síntomas individuales. Además, en el diario se documentaron diariamente el número reducido y/o aumentado de evacuaciones intestinales, la sensación de evacuación intestinal incompleta y la ingesta de otras medicaciones.

Al final del tratamiento y nuevamente al final del estudio, los médicos preguntaron a los pacientes sobre la evaluación global de la eficacia y la tolerabilidad. La eficacia fue evaluada por la siguiente pregunta: "Por favor, considere cómo se sintió durante el tratamiento de 4 semanas en cuanto a su bienestar general, a los síntomas de malestar/dolor abdominal y hábitos intestinales alterados. En comparación con la manera en la que se ha sentido habitualmente antes de tomar la medicación del estudio, ¿cómo calificaría el alivio de sus síntomas durante las últimas 4 semanas?" Las posibles respuestas eran: "completamente aliviado (1), considerablemente aliviado (2), algo aliviado (3), sin cambios (4) o peor (5)". Tanto "completamente aliviado" como "considerablemente aliviado" fueron definidas como "alivio adecuado". La calidad de vida en relación con la salud fue evaluada mediante el uso del cuestionario SF-12 antes del tratamiento y al final del tratamiento.

Los acontecimientos adversos fueron registrados en todo el estudio y en las visitas 3 y 4, el médico preguntó sobre la evaluación global de la tolerabilidad. Los valores del laboratorio y los signos vitales fueron examinados en la visita de selección y al final del estudio.

1.6 Métodos estadísticos

3.6.1 Estimación del tamaño de la muestra

Se consideró que una reducción de la evaluación global del sujeto (SGA) de al menos un 20% en la escala de Likert de 7 puntos es un efecto de tratamiento relevante. En función de datos publicados (Whorwell, 2006), se preveía una diferencia de 0,6 puntos en la SGA de síntomas del SII entre *B. bifidum* MIMBb75 y placebo en la escala de Likert de 7 puntos (por ejemplo, 3,0 en el grupo de placebo y 2,4 en el grupo de *Bifidobacteria*). La desviación típica fue estimada con 1,0 usando los mismos datos. Con estas premisas, un ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney con un nivel bilateral de significación de $\alpha = 0,05$ y una potencia de $1 - \beta = 0,8$ requería un tamaño de muestra de 47 pacientes por grupo. Con una tasa estimada de abandono del 15-20% tras la aleatorización, se planearon 110 pacientes aleatorizados y se reclutaron 132 pacientes para tener en cuenta posibles abandonos antes del inicio del estudio.

1.6.2 Análisis estadístico

El objetivo primario de este estudio era demostrar una reducción significativa de la SGA de los síntomas generales del SII al final del tratamiento en el grupo de *Bifidobacteria* con respecto al placebo. La SGA fue calculada para cada sujeto como la media aritmética en la referencia, durante el periodo de tratamiento y durante la fase de eliminación. Para dar cuenta de las posibles diferencias en los valores de referencia, se definió como criterio diana primario el cambio con respecto a la referencia calculado como puntuación media durante 4 semanas de tratamiento menos la puntuación media durante la fase de arranque (semanas 1-2). Se usó el ensayo no paramétrico de Van Elteren estatificado por centros de estudio para la comparación de los brazos de tratamiento. Se consideró que $P < 0,05$ era estadísticamente significativo.

El análisis primario se basó en la población a la que estaba previsto tratar, en la que estaban incluidos todos los pacientes aleatorizados con éxito. Los valores ausentes posteriores a los de referencia fueron imputados por el valor de referencia para el criterio primario y estos pacientes fueron evaluados como no respondedores. Se llevó a cabo un análisis adicional por protocolo con fines de soporte.

Los análisis descriptivos de los criterios diana secundarios se basaron en los datos disponibles. Las diferencias de tratamiento fueron sometidas a ensayo mediante el uso del ensayo no paramétrico de Wilcoxon para variables continuas o mediante el ensayo exacto de Fisher para variables binarias. Todos los valores p son bilaterales.

Las variables secundarias de eficacia incluían una respuesta basada en una regla del 50% de alivio de los síntomas durante el tratamiento (al menos mejora en dos de cuatro semanas dentro del periodo de tratamiento y mejora definida como una reducción de al menos un punto con respecto a la referencia). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando la versión 9.1.3 de SAS para Windows, SAS Institute Inc., Cary, Carolina del Norte, EE. UU.

1.7 Resultados

1.7.1 Sujetos

Un total de 132 pacientes estuvieron incluidos en el estudio, y 122 pacientes fueron aleatorizados con éxito para recibir ya fuera placebo (N=62) o *B. bifidum* MIMBb75 (N=60). Todos los pacientes aleatorizados fueron analizados en cuanto a la previsión de tratamiento (ITT) (N=122). Un paciente sin visitas posteriores a la aleatorización fue excluido de análisis de acontecimientos adversos. Según el protocolo, fue analizado un total de 103 pacientes (49 placebo, 54 verum) (Figura 2).

1.7.2 Características de referencia

En términos de características de referencia, no hubo diferencias significativas entre los grupos. 21,5% fueron clasificados como SII con predominio de diarrea, 19,8% como SII con predominio de estreñimiento y 58,7% como alternantes, sin diferencias significativas entre las *Bifidobacteria* y el grupo de placebo.

La demografía estuvo bien equilibrada entre los grupos de tratamiento, siendo mujeres aproximadamente el 67% de los pacientes, y un peso medio de 71 kg correspondiente a un IMC de 24. Los pacientes tenían una media de 41 años en el grupo de placebo y de 37 años en el grupo de *Bifidobacteria* (Tabla 1).

	Placebo	Verum
	N(%) o media ± DT	N(%) o media ± DT
N=122 (62+60)		
Edad	40,98 ± 12,80	36,65 ± 12,42
Mujeres	41 (66,1)	41 (68,3)
Altura (cm)	169,50 ± 8,75	170,78 ± 9,47
Peso (kg)	70,79 ± 15,54	70,45 ± 16,02
IMC	24,60 ± 5,19	24,02 ± 4,45
Tipo de SII (N=122 (61 +60))		
Con predominio de diarrea	12 (19,4)	14 (23,3)
Con predominio de estreñimiento	15 (24,2)	9 (15,0)
De tipo alternante	34 (54,8)	37 (61,7)

Tabla 1: Características demográficas de la población a la que estaba previsto tratar (ITT). DT - desviación típica, IMC - Índice de masa corporal.

1.7.3 Evaluación global del sujeto (SGA) de los síntomas del SII

El criterio primario de valoración fue la reducción de la SGA de síntomas del SII en el diario de evaluación global del sujeto. El *B. bifidum* MIMBb75 mejoró significativamente los síntomas globales del SII en -0,88 puntos [95% intervalo de confianza (IC): -1,07; -0,69] (de 2,95 en la fase de arranque a 2,07 en la fase de tratamiento) comparado con solo -0,16 puntos [95% IC: -0,32; 0,00] (de 2,79 en la fase de arranque a 2,63 en la fase de tratamiento) en el grupo de placebo (p<0,0001) usando la escala de Likert de 7 puntos. La evaluación de la SGA se semana en semana mostró un beneficio significativo para los pacientes dentro del grupo de *Bifidobacteria* para cada semana individual a partir de la segunda semana de tratamiento hasta el fin del estudio (Figura 3).

1.7.4 Criterios secundarios de valoración

Los criterios secundarios de valoración incluyeron cambios en los síntomas individuales del SII, tales como "dolor/malestar", "distensión/hinchazón", "trastorno digestivo", "urgencia", "número reducido y/o aumentado de evacuaciones intestinales" y "sensación de evacuación incompleta", en una escala de Likert de 7 puntos. El *B. bifidum* MIMBb75 mostró una reducción significativa de dolor/malestar en -0,82 puntos [95% IC: -1,01; -0,63] en contraposición con -0,18 [95 %IC: -0,35; -0,01] en el grupo de placebo (p<0,0001), y distensión/hinchazón en -0,92 puntos [95% IC: -1,15; -0,69] en contraposición con -0,21 [95% IC: -0,37; -0,05] en el grupo de placebo (p<0,0001) durante el tratamiento. La reducción persistió durante la fase de eliminación. La urgencia se redujo significativamente en -0,67 puntos [95% IC: -0,86; -0,48] en contraposición con -0,21 [95% IC: -0,35; -0,07] en el grupo de placebo (p=0,0001) durante el tratamiento, pero no durante la fase de eliminación. No pudo detectarse ningún efecto en cuanto a la frecuencia de las deposiciones ni a la sensación de evaluación incompleta del intestino (Figura 4).

La evaluación de los síntomas individuales del SII de dolor/malestar y distensión/hinchazón de forma semana mostró un beneficio significativo para los pacientes con el grupo de *Bifidobacteria* en comparación con el placebo para cada semana individual a partir de la segunda semana de tratamiento hasta el fin del estudio. Se mostró una diferencia significativa en la urgencia entre el grupo de *Bifidobacteria* y el de placebo entre las semanas cuatro y seis (Figuras 5 y 6).

El trastorno digestivo fue medido mediante el elemento “satisfacción de las deposiciones” en el cuestionario en la consulta del médico. La satisfacción de las deposiciones disminuyó de 3,89 a 2,44 en el grupo de *Bifidobacteria* en contraposición con 3,69 a 6,47 en el grupo de placebo ($p=0,0002$) después del tratamiento. La reducción persistió durante la fase de eliminación (2,33 en el grupo de *Bifidobacteria* en contraposición con 3,47 en el grupo de placebo, $p<0,0001$).

1.7.5 Puntuación compuesta

Se calculó una puntuación compuesta para los síntomas individuales del SII (dolor/malestar, distensión/hinchazón, urgencia). Durante la fase de arranque, la puntuación fue comparable en ambos grupos. Los pacientes dentro del grupo de *Bifidobacteria* se beneficiaron significativamente del consumo de *B. bifidum* MIMBb75 en contraposición con placebo (-0,80 en el grupo de *Bifidobacteria*; -0,20 en el grupo de placebo; $p<0,0001$). Esta mejora también se conservó durante la fase de eliminación (-0,85 en el grupo de *Bifidobacteria*; -0,31 en el grupo de placebo; $p<0,0001$).

1.7.6 Respondedores al tratamiento

Los respondedores totales fueron definidos como pacientes que experimentaron una mejora de la puntuación semanal media de al menos 1 punto en la escala de Likert para el parámetro primario (SGA de síntomas del SII) en al menos dos semanas del periodo de tratamiento de 4 semanas (regla del 50%). Los respondedores al dolor abdominal fueron definidos usando la misma regla del 50% para una mejora media de al menos un punto para la evaluación de “dolor/malestar”. Las tasas de los respondedores totales fueron del 56,7% en el grupo de *Bifidobacteria* y de solo el 21,0% en el grupo de placebo ($p=0,0001$). La diferencia entre los brazos de tratamiento fue solo un poco menos pronunciada cuando se consideró únicamente el síntoma de “dolor/malestar”, calculándose que las tasas de los respondedores son del 48,3% en el grupo de *Bifidobacteria* y de solo el 24,2% en el grupo de placebo ($p=0,008$) (Figura 7).

1.7.7 Eficacia global en la consulta del médico

La evaluación global de la eficacia fue significativamente mejor en el grupo de *Bifidobacteria* con respecto al de placebo. Al fin del tratamiento, el 43,3% de los pacientes en el grupo de *Bifidobacteria* logró un alivio adecuado, en comparación con solo el 8,1 % en el grupo de placebo ($p<0,0001$). Al fin del estudio, se documentó un alivio adecuado para el 46,7% en el grupo de *Bifidobacteria* y el 11,3% de los pacientes en el grupo de placebo ($p<0,0001$; Figura 8).

1.7.8 Calidad de vida relacionada con la salud

La evaluación de las puntuaciones de sumas de SF-12 mostró una ganancia significativa en la calidad de vida dentro del grupo de *Bifidobacteria*. La suma de la salud física mejoró en 3,99 en el grupo de *Bifidobacteria* y en solo 1,08 en el grupo de placebo en comparación con la referencia ($p=0,0185$). La suma de la salud mental mejoró en 5,78 en el grupo de *Bifidobacteria* y en solo 1,58 en el grupo de placebo en comparación con la referencia ($p=0,0083$).

1.7.9 Acontecimientos adversos

Solo se documentaron 36 acontecimientos adversos con una relación sospechada con el producto de estudio, 13 en el grupo de placebo y 23 en el de tratamiento, pero no pudieron detectarse diferencias significativas en el perfil de efectos secundarios de *B. bifidum* MIMBb75 en contraposición con el placebo.

1.7.10 Compendio

El *B. bifidum* MIMBb75 redujo significativamente la evaluación global del sujeto (SGA) de los síntomas del SII en -0,88 puntos [95% IC: -1,07; -0,69] en comparación con solo -0,16 [95% IC: -0,32; 0,00] puntos en el grupo de placebo ($p<0,0001$). El *B. bifidum* MIMBb75 también mejoró significativamente los síntomas individuales del SII de dolor/malestar, distensión/hinchazón, trastorno digestivo y urgencia. La evaluación de las puntuaciones de sumas de SF-12 mostraron una ganancia significativa en la calidad de vida dentro del grupo de *Bifidobacteria*. Además, documentaron un alivio adecuado el 46,7% de los pacientes en el grupo de *Bifidobacteria* y solo el 11,3% de los pacientes en el grupo de placebo ($p<0,0001$). Las tasas de respondedores totales fueron del 56,7% en el grupo de *Bifidobacteria* y solo del 21,0% en el grupo de placebo ($p=0,0001$). El *B. bifidum* MIMBb75 fue bien tolerado y los acontecimientos adversos no fueron diferentes de los del placebo.

1.8 Conclusión

El *B. bifidum* MIMBb75 alivia de forma efectiva el SII global, y mejora también los síntomas individuales del SII. Considerando la alta eficacia del *B. bifidum* MIMBb75 en el SII, junto con el buen perfil de efectos secundarios, el *B. bifidum* MIMBb75 es un candidato promisorio para una terapia del SII.

- 5 Este estudio aleatorizado doble ciego controlado por placebo indica que el *B. bifidum* MIMBb75 tiene efectos beneficiosos en el tratamiento del SII. En este estudio, el *B. bifidum* MIMBb75 mejoró significativamente el SII global y sus síntomas relacionados, tales como dolor/malestar e hinchazón, en comparación con el placebo. Además, el *B. bifidum* MIMBb75 también mejoró significativamente la calidad de vida. Estos beneficios persistieron dentro de la fase de eliminación, libre de consumo. Las tasas de respondedores totales fueron predominantemente elevadas, siendo del 56,7% en el grupo de *Bifidobacteria* en comparación con solo el 21,0% en el grupo de placebo ($p=0,0001$). Al final del estudio se documentó un alivio adecuado para el 46,7% en el grupo de *Bifidobacteria* y de solo el 11,3% de los pacientes en el grupo de placebo ($p<0,0001$). Hasta la fecha, varios estudios han examinado los efectos de las *Bifidobacteria* en el SII y sus síntomas. Sin embargo, solo algunos podían mostrar un beneficio significativo. Además, hasta donde saben los inventores, ninguna cepa probiótica podía demostrar aliviar significativamente el síndrome de intestino irritable y mejorar simultáneamente la calidad de vida. Aunque algunos estudios podrían no haber llegado a demostrar eficacia debido a un tamaño pequeño de la muestra y a errores de aleatorización, varias cepas probióticas diferentes mostraron reiteradamente que no producían ninguna mejora significativa en el SII. Recientemente, Brenner *et al.* (2009) publicaron una reseña sistemática de ensayos controlados aleatorizados (RCT) dirigidos a la evaluación de la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de los probióticos en el tratamiento del SII. En los análisis se incluyeron un total de 16 RCT. De esos, exclusivamente una cepa de *Bifidobacteria* demostró eficacia para la mejora de los síntomas de SII en dos estudios debidamente diseñados. Estos hallazgos pueden ser atribuidos al hecho de que la eficacia de los probióticos es muy específica a la cepa y a que solo algunas cepas podrían ser capaces de mostrar su eficacia en el SII.

- 25 En conclusión, el *B. bifidum* MIMBb75 mejora el SII global, así como sus síntomas de SII junto con un buen perfil de efectos secundarios.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Esquema del estudio.

Figura 2: Diagrama de flujo del estudio.

Figura 3: Comparación de los efectos de placebo y de *B. bifidum* MIMBb75 en los síntomas globales de SII (por SGA, registrados en una escala de 0-6) semana a semana. Mejora significativa de los síntomas globales de SII en el grupo de *Bifidobacteria* con respecto al placebo.

Figura 4: Comparación de la reducción de síntomas de SII (*B. bifidum* MIMBb75 con respecto al placebo) sobre cambios de puntuación media desde la referencia a la fase de tratamiento.

Figura 5: Comparación de los efectos de placebo y de *B. bifidum* MIMBb75 en el dolor o el malestar (registrados en una escala de Likert de 0-6) semana a semana. Mejora significativa en el grupo de *Bifidobacteria* con respecto al grupo de placebo.

Figura 6: Comparación de los efectos de placebo y de *B. bifidum* MIMBb75 en la distensión/hinchazón (registradas en una escala de 0-6) semana a semana. Mejora significativa en el grupo de *Bifidobacteria* con respecto al grupo de placebo.

Figura 7: Respondedores totales durante el tratamiento (ITT).

Figura 8: Alivio adecuado tras el tratamiento (ITT).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación probiótica que comprende una cepa de *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75, depositada como depósito DSM nº 24514, para ser usada en el tratamiento del síndrome de intestino irritable o de una enfermedad seleccionada del grupo constituido por evacuación de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, pouchitis, colitis postinfecciosa, enfermedad diarreica, diarrea asociada al *Clostridium difficile*, y combinaciones de las mismas.
- 10 2. La formulación probiótica utilizable de la reivindicación 1 en la que dicho tratamiento comprende aliviar, prevenir y/o tratar dolor abdominal, hinchazón, obstipación, trastorno digestivo, número reducido de evacuaciones intestinales, número aumentado de evacuaciones intestinales, sensación de evacuación incompleta, o combinaciones de los mismos.
- 15 3. La formulación probiótica utilizable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que, además, comprende al menos inulina y/o un fructooligosacárido.
- 20 4. La formulación probiótica utilizable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que, además, comprende al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable; un vehículo ingerible; un adyuvante; un componente bacteriano; una entidad farmacológica; un compuesto biológico; y/o una proteína y/o un péptido, preferentemente una proteína y/o péptido que es rica en glutamina/glutamato; un lípido; un hidrato de carbono; una vitamina; un elemento mineral y/o traza.
- 25 5. La formulación probiótica utilizable de la reivindicación 4 en la que dicho al menos un compuesto farmacéuticamente aceptable es un miembro seleccionado del grupo constituido por una o más vitaminas, preferentemente vitaminas del grupo B; uno o más minerales, preferentemente calcio o magnesio; uno o más hidratos de carbono, preferentemente un hidrato de carbono seleccionado del grupo constituido por lactosa, maltodextrina, inulina, dextrosa, manitol, maltosa, dextrina, sorbitol, fructosa, y una mezcla de los mismos.
- 30 6. La formulación probiótica utilizable de las reivindicaciones 4 o 5 en la que el vehículo ingerible es una cápsula, un comprimido, polvo o un producto alimenticio.
- 35 7. La formulación probiótica utilizable de la reivindicación 6 en la que el producto alimenticio es un producto lácteo, leche acidificada, yogur, yogur helado, leche en polvo, leche concentrada, pasta, salsa o bebida de queso.
8. La formulación probiótica utilizable de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 en la que la cepa está presente a más de 10^1 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio.
9. La formulación probiótica utilizable de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7 en la que la cepa está presente a más de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio.
10. La formulación probiótica utilizable de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 en la que la cantidad diaria de la cepa que ha de administrarse a un paciente no es inferior a 10^1 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio.
- 40 11. La formulación probiótica utilizable de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 en la que la cantidad diaria de la cepa que ha de administrarse a un paciente no es inferior a 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 o 10^6 ufc por cápsula o comprimido o por unidad de polvo o producto alimenticio.

Figura 1

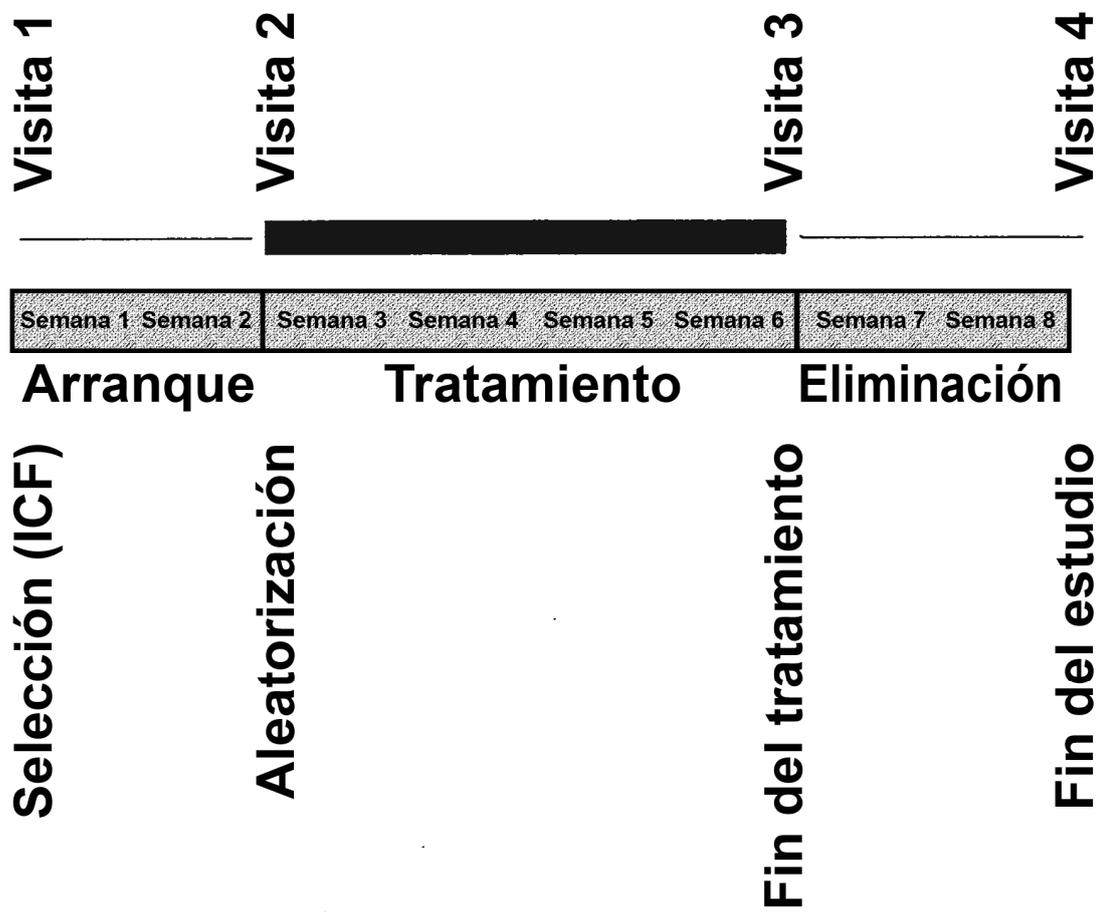


Figura 2

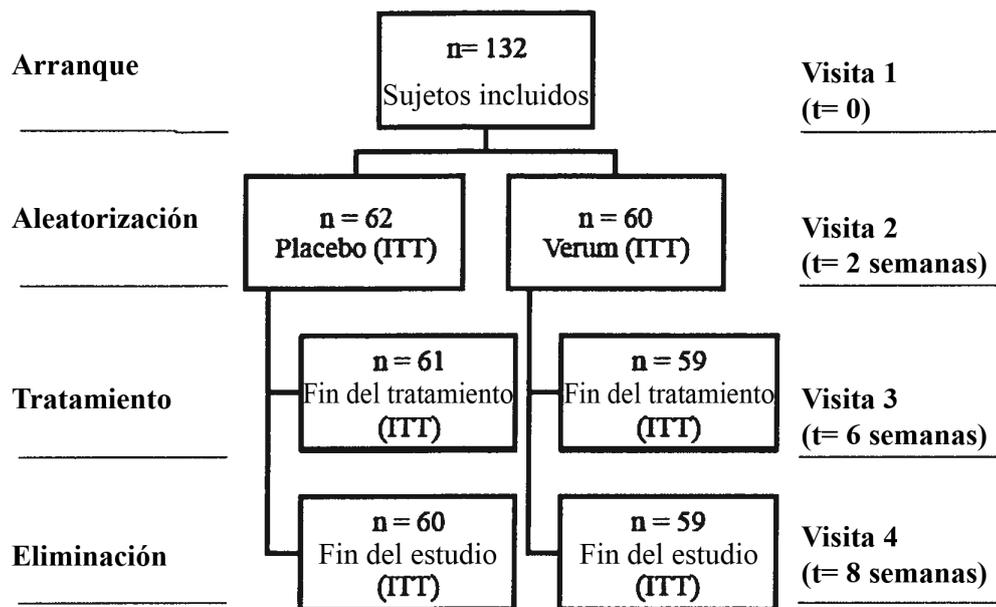


Figura 3

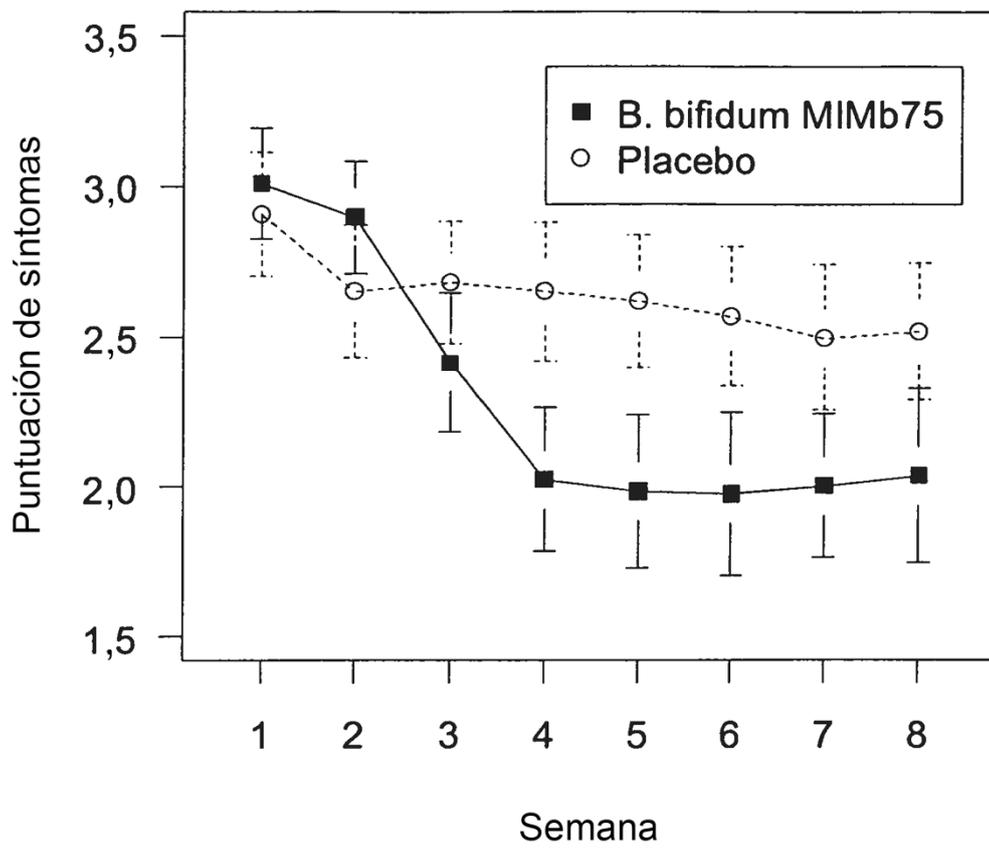


Figura 4

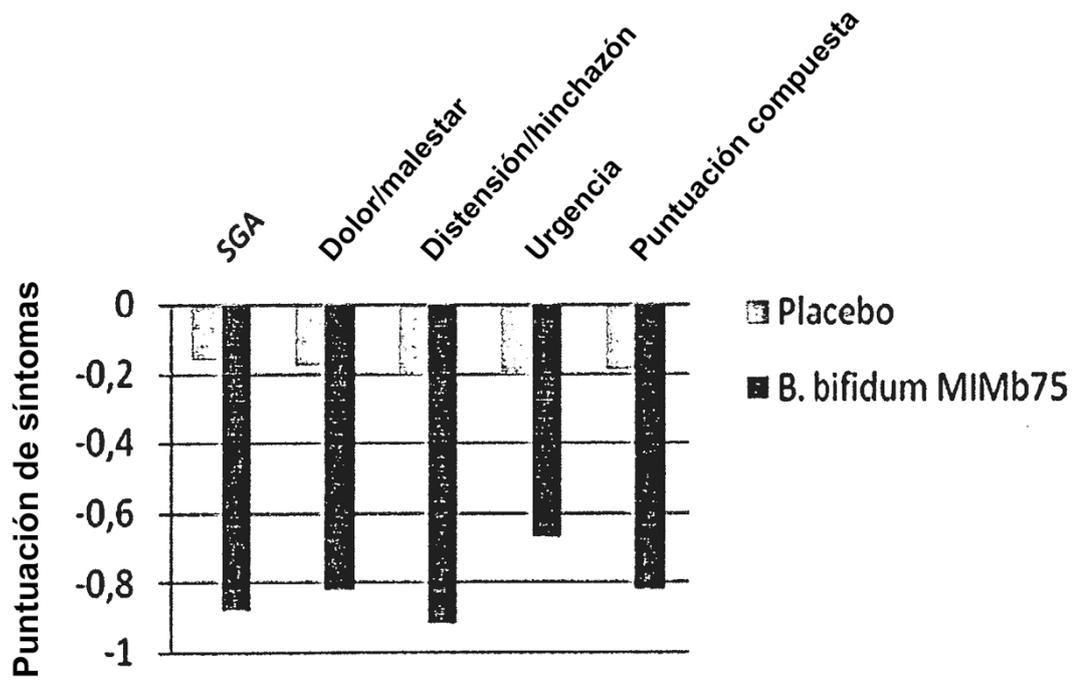


Figura 5

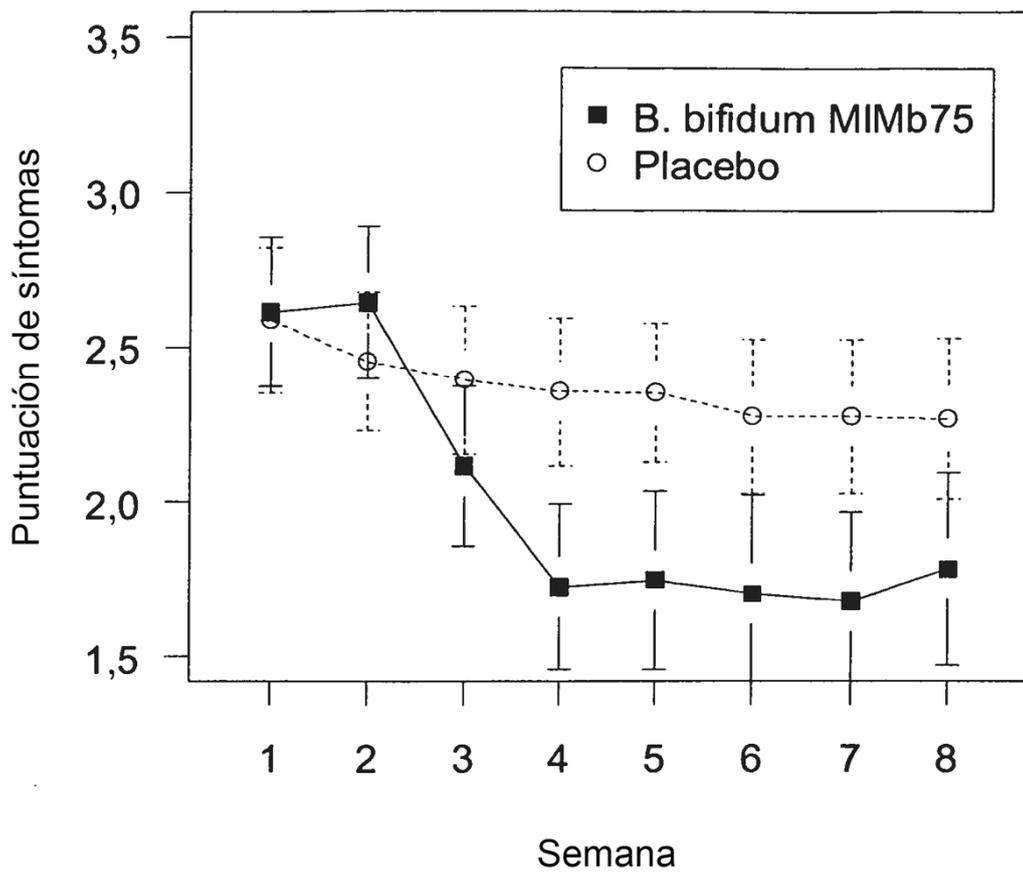


Figura 6

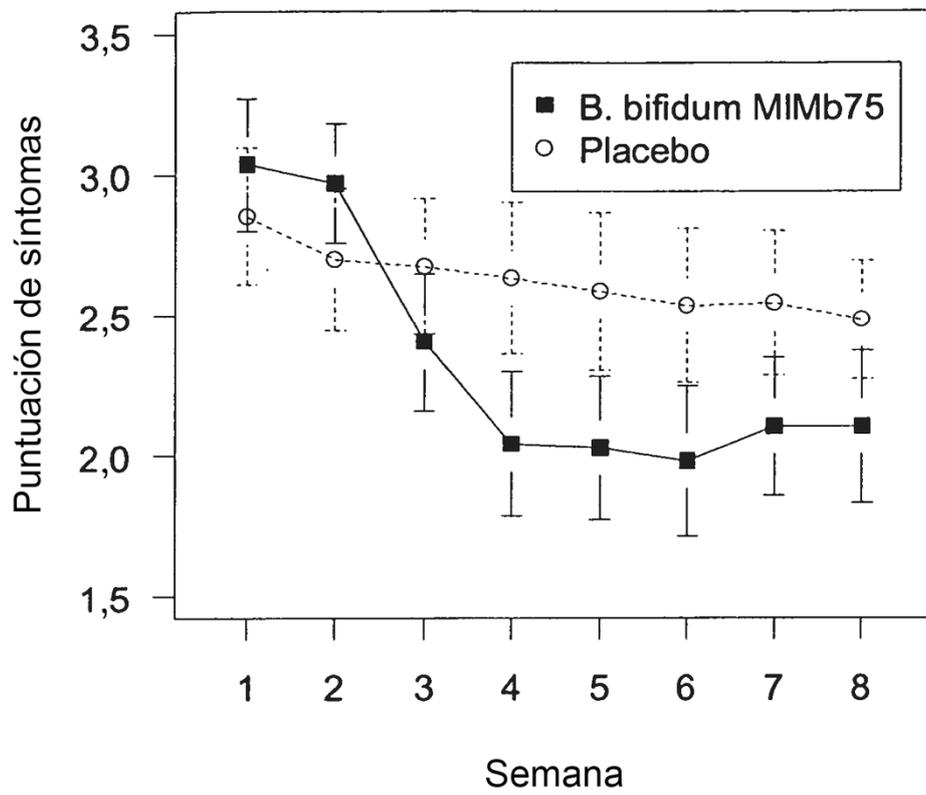


Figura 7

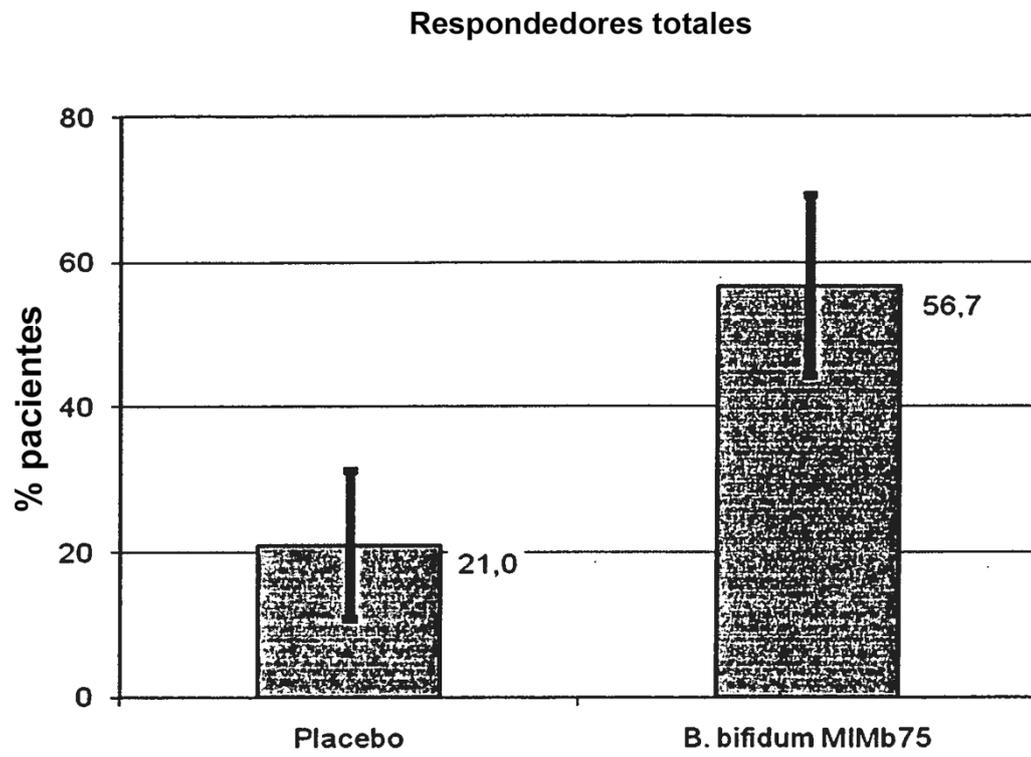


Figura 8

