

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 464**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2010 PCT/US2010/020712**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.07.2010 WO10081126**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2010 E 10700778 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2385837**

54 Título: **Composiciones que comprenden componentes probióticos y prebióticos y sales minerales, con lactoferrina**

30 Prioridad:

12.01.2009 IT MI20090019

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2018

73 Titular/es:

**PFIZER ITALIA S.R.L. (100.0%)
Via Valbondione, 113
00188 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**LONGONI, VALERIA y
PENCI, MARISA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 652 464 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden componentes probióticos y prebióticos y sales minerales, con lactoferrina

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una composición probiótica que comprende una mezcla de componentes probióticos que comprenden 50 mil millones UFC/g de *Bifidobacterium longum*; 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus helveticus*; y 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus plantarum*; y un vehículo que comprende: una
 10 mezcla de prebióticos que comprenden inulina en una cantidad del 20 % del vehículo y fructosa en una cantidad de más del 50 % del total de la composición de vehículo; lactoferrina en una cantidad de un 0,5 % de la composición de vehículo; gluconato magnésico en una cantidad del 14 al 16 % del total de la composición de vehículo; citrato
 15 potásico que está presente en una cantidad de un 5 % del total de la composición de vehículo; y gluconato de zinc en una cantidad del 5 % del total de la composición de vehículo; y glutatión, en el que el glutatión está presente en la composición de vehículo en una cantidad del 1 % del total de la composición de vehículo. Se describen en el
 20 presente documento composiciones que comprenden un probiótico, más específicamente *Bifidobacterium longum* y un material de vehículo que comprende materiales prebióticos, sales minerales, y lactoferrina que no solo tendrán una mejor y/o mayor supervivencia de las especies probióticas, sino que también llevan a cabo la colonización eficaz de los componentes administrados con consecuencias de disbiosis comunes del tracto digestivo producidas por el estrés, hábitos alimentarios incorrectos, tratamientos con antibióticos, enfermedad y similares. Dichas composiciones también tienen una acción anti-inflamatoria e inmunomoduladora concomitantes. Adicionalmente,
 también se describen procedimientos para aumentar y/o mejorar la supervivencia y viabilidad de un organismo probiótico en las composiciones descritas en el presente documento.

Las composiciones descritas se pueden utilizar para la preparación de suplementos nutricionales y productos de calidad farmacéutica.

Antecedentes de la invención

- 25 Los consumidores son cada vez más conscientes de la cuestión de que puede ser necesario el mantenimiento de su ambiente, salud y nutrición. En respuesta, la investigación científica se ha enfocado en los papeles que pueden tener la dieta, el estrés, y las prácticas médicas modernas (por ejemplo, antibióticos y radioterapia) que amenacen la salud humana. En particular, el cambio de la dinámica de poblaciones hacia el envejecimiento de las sociedades están
 30 aumentando la incidencia de enfermedades que pueden producirse por una microflora deficiente o comprometida tales como infecciones del tracto gastrointestinal (GIT), estreñimiento, síndrome de colon irritable (IBS), enfermedad intestinal inflamatoria (IBD)—enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa, alergias alimentarias, diarrea inducida por antibióticos, enfermedad cardiovascular, y ciertos cánceres (por ejemplo, cáncer colorrectal).

- En años recientes, la fabricación y comercialización en el mercado de alimentos funcionales (alimentos que afectan a las funciones del cuerpo de manera dirigida de manera que aportan efectos positivos en la fisiología y nutrición),
 35 particularmente alimentos que contienen probióticos, se han difundido desde el nicho de mercado japonés bien establecido por el mercado global. Aunque ya se están explotando comercialmente varias bacterias probióticas de origen humano, la ciencia aún es emergente no solo con respecto a las potenciales aplicaciones de dichos productos sino también para mejorar la eficacia.

- Los probióticos se han definido como suplementos alimentarios con microbios vivos que afectan beneficiosamente al
 40 huésped mejorando el equilibrio microbiano intestinal, o más ampliamente, como microorganismos vivos, que al ingerirse en ciertas cantidades ejercen efectos saludables más allá de la nutrición básica inherente. Se han utilizado tradicionalmente cocteles de distintos microorganismos, particularmente especies de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, en productos lácticos fermentados para promover la salud. Sin embargo, para que sean eficaces, dichos probióticos
 45 no solo tienen que sobrevivir a las condiciones del procesamiento de fabricación, envasado y almacenamiento, sino también tienen que sobrevivir al tránsito a través del tracto gastrointestinal de manera que el material probiótico se mantenga viable para que tenga un efecto positivo sobre la salud.

- La historia evolutiva del hombre ha sido influenciada por las bacterias, no solo respecto a las epidemias. Una influencia menos evidente y más sumergida es la de la flora comensal, especialmente la que reside en el intestino humano que lleva a cabo un papel "protector" y "educacional" principal (el primer papel se lleva a cabo en el cuerpo
 50 completo, y la segunda en su sistema inmunitario), y que defiende constantemente al individuo contra la enfermedad. Como es bien conocido además, en condiciones normales, la piel y la mayoría de las membranas mucosas del cuerpo están "ocupadas" por una flora variada de microorganismos, que a menudo es específica del tejido. Por ejemplo, los microorganismos predominantes en el intestino (se han identificado hasta ahora no menos de 500 cepas), especialmente en el intestino grueso, son *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, *Fusobacterium spp.*,
 55 *Klebsiella spp.*, Estafilococos, levaduras y *Escherichia coli*. Esta flora microbiana comensal se puede dividir en dos categorías: flora "residente", que casi siempre está presente y, que si altera, se puede recuperar rápidamente; y flora "transitoria", que puede colonizar el huésped en periodos cortos, debido a la falta de capacidad de la flora transitoria para competir con los microorganismos residentes o los mecanismos de defensa del huésped. La flora transitoria a

veces incluye también microorganismos potencialmente patógenos. La composición exacta de la flora está influenciada por factores de origen microbiano y factores específicos del huésped. Sin embargo, como estos últimos factores (edad, nivel nutricional, hormonas y enfermedad) son difíciles de modificar, el análisis se enfocará en los primeros.

5 Un factor microbiano importante que tiene influencia en la composición de la flora comensal es la capacidad de las bacterias para adherirse a las células epiteliales. Algunas bacterias presentan un marcado tropismo (afinidad) por células epiteliales particulares. La flora normal puede interferir entonces en los microorganismos potencialmente patógenos compitiendo con ellos por los receptores de la superficie celular. La flora comensal también puede interferir con los microorganismos patógenos produciendo bacteriocinas, sustancias que inhiben el crecimiento de
10 otras bacterias (habitualmente de la misma especie), o produciendo un ambiente ácido mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta o compitiendo por los mismos nutrientes. Otros mecanismos útiles son el estímulo para producir anticuerpos naturales con reactividad cruzada, o la estimulación de mecanismos de aclaramiento. Sin embargo, los últimos son mucho menos importantes.

15 Debido a estos mecanismos, la flora normal forma una barrera eficaz contra la colonización de las superficies del huésped por microorganismos patógenos. Esto se conoce como “resistencia a la colonización”.

Como se puede deducir fácilmente, cualquier fenómeno que reduzca el efecto de estos factores microbianos sobre el ecosistema gastroentérico puede dar lugar a problemas serios para la salud del individuo. Por ejemplo, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro elimina todas las bacterias comensales de la flora gastroentérica que son sensibles al agente antimicrobiano que se utilice. En este caso, la resistencia a la colonización se reduce, y los
20 microorganismos potencialmente letales son libres para colonizar la mucosa. Cuando se interrumpe el tratamiento, la flora residente se puede recuperar, obviamente, con el tiempo. Lamentablemente, sin embargo, las bacterias aerobias Gram-negativas crecen más rápidamente y colonizan las membranas mucosas antes que las bacterias anaerobias Gram-negativas, que proliferan más lentamente, aunque constituyan el 99 % de la flora comensal. En pacientes en los que las defensas inmunitarias estén incluso solo parcialmente alteradas, este desequilibrio puede
25 producir una bacteriemia Gram-negativa.

Otras posibles consecuencias asociadas con la supresión de la flora normal por los antibióticos de amplio espectro incluyen el crecimiento excesivo de levaduras con la aparición de micosis, o el crecimiento excesivo de bacterias anaerobias Gram-negativas como el *Clostridium difficile*, que lamentablemente es relativamente resistente a los antibióticos. Su presencia puede dar lugar a una serie de trastornos muy comunes, que varían desde diarrea a
30 colitis.

El sistema inmunitario y sus funciones son el resultado de miles de años de desarrollo, determinado día tras día por constante con el mundo de los microorganismos, especialmente a nivel gastrointestinal.

Se ha probado científicamente que las condiciones asépticas obtenidas por el exceso de higiene o el uso excesivo de antibióticos no representa una estrategia satisfactoria en términos de salud individual, especialmente a la vista de
35 las condiciones excelentes de la vida de hoy en día (en comparación con el pasado reciente). El daño que incluso en condiciones parcialmente asépticas se puede producir se conoce bien, a saber intolerancias alimentarias, alergias y enfermedades autoinmunitarias. Estos problemas resultan de la falta de contacto entre la flora comensal y el sistema inmunitario. Mediante este contacto diario, la flora comensal enseña al sistema inmunitario a distinguir entre lo “propio” y lo “no propio”. Un gran número de evidencias epidemiológicas (y ensayo experimentales que se llevan a
40 cabo, por ejemplo, con animales libres de gérmenes) prueban esta teoría.

Un aumento significativo en la tasa de intolerancias alimentarias y alergias (hasta un 40 %), y trastornos autoinmunitarios (hasta un 30 %) tal como esclerosis múltiples, lupus eritematoso y artritis reumatoide, se ha observado en los países desarrollados económicamente desde los cincuenta y sesenta, en paralelo con la reducción de la mortalidad por enfermedades infecciosas (debido a la disponibilidad de más antibióticos). Esos aumentos son
45 el resultado de un cambio sustancial en la calidad y cantidad de flora gastroentérica comensal debido al uso incorrecto de antibióticos y a un aumento del estilo de vida estresante y también, en el caso de los bebés, una reducción de la lactancia materna. Además, a menudo se ha informado que los niños alimentados con leche materna padecen menos intolerancias alimentarias y alergias que los niños que reciben a llamada leche “artificial”. Incluso más recientemente, se ha informado de la misma correlación para esclerosis múltiple (una enfermedad autoinmunitaria). Por el contrario, el análisis de morbilidad de individuos que viven en ambientes tribales (en
50 regiones de África, India y el interior de Australia) en los que el estilo de vida es primitivo muestran una casi total ausencia de enfermedades tales como alergias y autoinmunitarias (aunque obviamente hay una alta tasa de enfermedades infecciosas).

El tratamiento con antibióticos, el estrés y la falta de lactancia materna, que alteran la calidad y cantidad de la flora comensal gastroentérica, reducen la oportunidad de que la flora comensal se ponga en contacto con el sistema
55 inmunitario. Como resultado de este contacto, a las células del sistema inmunitario, especialmente los linfocitos T auxiliares tipo 1 y 2, se les “enseña” a tolerar (es decir, que no respondan a) los antígenos alimentarios y los antígenos no alimentarios inocuos (tales como los pólenes), o las proteínas del cuerpo al que pertenecen (evitando de esta manera las enfermedades autoinmunitarias).

La importancia excepcional de la flora comensal para a salud presente y futura de cada individuo por lo tanto es evidente. Sin embargo, los seres humanos no nacen con una flora comensal. Por el contrario, al nacer, el tracto gastrointestinal es estéril. Su colonización se inicia en el momento del nacimiento por la flora vaginal y anal de la madre, en el caso de nacimiento vaginal o por exposición al ambiente fuera de la matriz en el caso de nacimiento por cesárea y en ambos casos está influenciada posteriormente por el tipo de leche que se toma y por los factores maternos/ambientales. Después del estadio neonatal, la flora comensal gastroentérica de un individuo sano consiste en al menos 10^{18} bacterias, el 99 % de las cuales pertenecen a unas 30-40 especies.

Por lo tanto esta flora consiste en gérmenes anaerobios (bifidobacterias, clostridios, bacteroides, eubacterias y cocos Gram-positivos) y gérmenes aerobios (lactobacilos, estreptococos, estafilococos y coliformes). Sin embargo, estas cantidades no se distribuyen igualmente a lo largo del eje gastroentérico: el contenido bacteriano es relativamente bajo en el estómago (por debajo de 1 millón por gramo), pero la cantidad aumenta sustancialmente en el íleo (100 millones) y enormemente en el colon (100 mil millones).

Por lo tanto existe la necesidad en la técnica de composiciones que contengan materiales probióticos que no solo sobrevivan a las condiciones del procedimiento de fabricación sino que puedan sobrevivir en el tracto gastrointestinal suministrando de esta manera materiales probióticos viables al huésped que necesita de los mismos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una composición probiótica que comprende una mezcla de componentes probióticos que comprenden 50 mil millones UFC/g de *Bifidobacterium longum*; 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus helveticus*; y 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus plantarum*; y un vehículo que comprende: una mezcla de prebióticos que comprenden inulina en una cantidad del 20 % del vehículo y fructosa en una cantidad de más del 50 % del total de la composición de vehículo; lactoferrina en una cantidad de un 0,5 % de la composición de vehículo; gluconato magnésico en una cantidad del 14 al 16 % del total de la composición de vehículo; citrato potásico que está presente en una cantidad de un 5 % del total de la composición de vehículo; y gluconato de zinc en una cantidad del 5 % del total de la composición de vehículo; y glutatión, en el que el glutatión está presente en la composición de vehículo en una cantidad del 1 % del total de la composición de vehículo. Se prefiere que el *Bifidobacterium longum* sea *Bifidobacterium longum* R175 ("Rosell 175"), que el *Lactobacillus helveticus* sea *Lactobacillus helveticus* R52 ("Rosell 52") y que el *Lactobacillus plantarum* sea *Lactobacillus plantarum* R1012 ("Rosell 1012"). El *Lactobacillus helveticus* Rosell 52 también se conoce en la industria como una especie de *Lactobacillus acidophilus* y por lo tanto como se utiliza en el presente documento, el *Lactobacillus helveticus* R52 también se puede conocer como *Lactobacillus acidophilus* 52. En general, el uno o más componentes prebióticos pueden ser inulina y fructosa, y la una o más sales minerales se seleccionan de entre el grupo que consiste en zinc, magnesio, potasio y cobre. Preferentemente, la composición comprende: a) una mezcla de componentes probióticos que comprenden 50 mil millones UFC/g de *Bifidobacterium longum*; 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus helveticus*; y 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus plantarum*; y b) un vehículo que comprende: 1) una mezcla de prebióticos que comprende aproximadamente el 80 % del total de la composición de vehículo; 2) lactoferrina en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente un 10 % del total de la composición de vehículo; 3) sales minerales seleccionadas de entre el grupo que consiste en magnesio, potasio y sales de zinc, en el que el magnesio está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %; en el que el potasio está presente en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; y en el que el zinc está presente en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; y 4) glutatión, en el que el glutatión está presente en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 20 % de la composición del vehículo. También se describe en el presente documento una composición probiótica a) una mezcla de componentes probiótico que consiste en *Bifidobacterium longum* R175 y *Lactobacillus rhamnosus* R11; b) un componente prebiótico que comprende inulina y fructosa; c) lactoferrina; d) una mezcla de sales minerales que consisten en sales de magnesio y zinc; y e) *Saccharomyces boulardii*. También se describen en el presente documento procedimientos de uso de las composiciones que contienen probióticos para la preparación de formulaciones para la administración oral para el mantenimiento y/o la recuperación de la salud intestinal y para prevenir las disbiosis de cualquier etiología en mamíferos. En el presente documento también se describe un procedimiento de mejora de la supervivencia de bacterias *Bifidobacterium longum* que comprende: mezclar el *Bifidobacterium longum* con *Lactobacillus helveticus* R52 y *Lactobacillus plantarum* R1012, en el que la supervivencia del *Bifidobacterium* está mejorada.

La presente invención también se refiere a una composición de la invención para su uso por administración oral para el mantenimiento y/o recuperación de la salud intestinal o para prevenir la disbiosis de cualquier etiología en mamíferos.

La presente invención también se refiere al uso de una composición de la invención para la preparación de una formulación para la administración oral para el mantenimiento y/o recuperación de la salud intestinal o para prevenir la disbiosis de cualquiera etiología en mamíferos.

Descripción detallada de la invención

En adultos, el tratamiento con antibióticos, estrés, equilibrio dietético y enfermedad (especialmente trastornos

gastroentéricos) alteran la calidad y cantidad de la flora comensal beneficiosa. En consecuencia surge el problema de conseguir un procedimiento de recolonización eficaz, rápido. Este procedimiento se facilita significativamente por los probióticos.

Se ha descubierto ahora que una combinación de una mezcla específica de componentes probióticos, más específicamente *Bifidobacterium longum* cuando se mezclan en un vehículo que comprende (A) uno o más componentes prebióticos, (B) lactoferrina, y (C) una o más sales minerales, y opcionalmente sacaromicetos, tiene una mejora de la supervivencia de las especies de *Bifidobacterium longum* así como llevar a cabo una acción de mejora considerable de la salud, mantiene y/o recupera la salud intestinal, maneja las consecuencias del estrés, y lleva a cabo una actividad anti-inflamatoria y de inmunomodulación. Más específicamente, las composiciones de la invención presentan un aumento y/o mejora de la supervivencia de los componentes probióticos al transitar a lo largo del tracto intestinal.

Las composiciones de acuerdo con la invención se caracterizan por lo tanto por un valor simbiótico considerable (probiótico con prebiosis soportada), con un fuerte componente anti-inflamatorio e inmunomodulador, y también son capaces de encargarse del equilibrio sal-fluidos. En consecuencia, mejoran/recuperan marcadamente la salud intestinal, y también tienen repercusiones favorables en prevenir la enfermedad, infecciones y todas las consecuencias del estrés en general (especialmente el estrés físico y ambiental).

Incluso aunque se ha demostrado que, al menos para algunas cepas probióticas, los probióticos muertos pueden dar lugar a un beneficio clínico, el resultado clínico en seres humanos para los probióticos muertos no es tan robusto como para las células viables. Por lo tanto, con el fin de producir un producto probiótico que sea capaz de dar lugar al efecto clínico deseado, es necesario asegurarse de que la composición que contiene el probiótico tenga el porcentaje acumulado más alto de supervivencia de probióticos según transitan por el tracto gastrointestinal superior.

Los inventores han descubierto que combinando el *Bifidobacterium longum*, solo o en combinación con uno o más componentes probióticos, tales como *Lactobacillus helveticus*, y/o *Lactobacillus plantarum* con un vehículo que comprende prebióticos preferentemente inulina, fructosa y/o FOS; sales minerales que comprenden magnesio, zinc y/o potasio; lactoferrina; el *Bifidobacterium longum* tiene un aumento de supervivencia a lo largo del tracto digestivo y por lo tanto las composiciones presentan una eficacia mayor.

Los probióticos se definen como un suplemento nutricional que contiene (preferentemente) microbios vivos que influyen favorablemente en la salud del huésped mejorando el equilibrio microbiológico. Los organismos probióticos deben ser también:

- componentes normales de la flora intestinal humana o en cualquier caso fácilmente adaptables a ese hábitat;
- capaces de cruzar la barrera gástrica, resistiendo la acción de los ácidos biliares y enzimas pancreáticas;
- capaces de adherencia específica al epitelio intestinal;
- fáciles de utilizar en la práctica clínica.

Las siguientes bacterias probióticas cumplen la definición anterior:

- bacterias productoras de ácido láctico en general;
- lactobacilos (*acidophilus*, *helveticus*, *bulgaricus*, *plantarum*, *casei*, *ramnosus*, *lactis* y *reuteri*);
- *Streptococcus thermophilus*;
- *Enterococcus faecium*;
- *Bifidobacterium bifidum* y *longum*

La mezcla de componentes probióticos descritos en el presente documento comprende al menos dos especies de bacterias seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

- *Bifidobacterium longum*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus rhamnosus*, y
- *Lactobacillus plantarum*.

Preferentemente, las composiciones probióticas comprenden *Bifidobacterium longum*.

Estos agentes microbianos vivos y vitales son capaces de una colonización rápida, que da lugar pronto a la actuación de sus funciones:

- 1) Protección por medio de antagonismo directo contra poblaciones potencialmente patógenas (inhibición de adherencia del epitelio; producción de bacteriocinas; competición por nutrientes y sustratos; creación de condiciones de pH desfavorables y microambientes redox);
- 2) Estimulación y enseñanza del sistema inmunitario (activación macrofágica, refuerzo de linfocitos citotóxicos naturales, aumento de producción de interferones, y equilibrado de poblaciones T auxiliares 1 y 2).

3) acidificación del ambiente colónico liberando lactato, propionato y butirato.

La comunidad científica ha enfocado recientemente su interés en el estudio y caracterización de las cepas que parecen ser los mejores candidatos para el desarrollo de simbióticos (productos que contienen tanto probióticos como prebióticos), a saber lactobacilos (*acidophilus*, *helveticus*, *plantarum* y *rhamnosus*) y bifidobacterias. Estas cepas diferentes presentan una variedad de propiedades: capacidad para cruzar la barrera gástrica y biliar eficazmente; mejora el estreñimiento y los síntomas asociados con intolerancia a la lactosa; atenuación de la diarrea (incluyendo tipos con una etiología vírica); producción de bacteriocinas; capacidad para inhibir patógenos tales como *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Candida*, y *Coli*; inmunomodulación, y muchas otras.

El género *Lactobacillus* pertenece al grupo de bacterias acidolácticas, que son procariotas Gram-positivas. Se diferencian fácilmente de las bifidobacterias basándose en su contenido en guanina y citosina, que está por debajo del 54 % (en las bifidobacterias, dicho contenido excede el 54 %). El género comprende casi 80 especies, que son catalasa-negativas, inmóviles, sin esporas, citocromo-oxidasa-negativas, que no hidrolizan la gelatina y no producen indol, con un metabolismo sacarolítico y microaerófilo. También tienen necesidades nutricionales particulares, a saber carbohidratos solubles, aminoácidos libres, peptonas, ácidos grasos y sus ésteres, sales, ácidos nucleicos y vitaminas. También se clasifican basándose en el tipo de fermentación como especies homofermentadoras obligadas, heterofermentadoras obligadas y heterofermentadoras facultativas.

Las bacterias acidolácticas de la especie *rhamnosus* en particular se identificaron originalmente y se seleccionaron de cepas de origen intestinal humano. Tienen características específicas diferentes que solo comparten parcialmente con otras bacterias productoras de lactato:

- 1) desde el punto de vista inmunológico mejoran la respuesta de linfocitos T y B y la respuesta "citolítica natural" (NK) de las células CD56+;
- 2) desde el punto de vista clínico su uso es un procedimiento eficaz para combatir distintas formas de diarrea (incluyendo, por rotavirus, diarrea del viajante, diarrea producida por tratamientos antibióticos, y diarrea recurrente causada por superinfecciones por *Clostridium difficile*);
- 3) también se ha informado que reducen la colonización de las vías aéreas superiores por agentes patógenos.

Con respecto a la colonización, se sabe que son resistentes a la acidez gástrica, bilis y los altos valores de pH típicos del intestino grueso en donde, después de la colonización, promueven la proliferación de bifidobacterias influenciando favorablemente las condiciones ambientales.

El género *Bifidobacterium* comprende 28 especies, y presenta las características generales siguientes: Gram-positivo, anaerobio, inmóvil, sin esporas, catalasa negativo, no ácido úrico, pleomorfo y productor de ácido acético (así como productor de lactato). También utilizan sales de amonio como fuente de nitrógeno, y son capaces de sintetizar muchas vitaminas. Finalmente, su desarrollo está influenciado por la presencia de factores bifidogénicos (oligosacáridos y peptonas).

Como ya se ha establecido, durante su tránsito y colonización, los lactobacilos y bifidobacterias llevan a cabo una serie de acciones identificables como fisiológicas, tal como la reducción de la intolerancia a la lactosa, mejora de la motilidad intestinal, reducción del colesterol en el suero, acumulación de enzimas proteolíticas, proteínas y vitaminas; regulación de la absorción de nutrientes; reactivación de la permeabilidad del epitelio intestinal; y mejora de las afecciones de pacientes geriátricos.

También se caracterizan por efectos "no fisiológicos" tales como un efecto anti-diarreico (diarrea infantil, diarrea del viajante y diarrea asociada con el uso de antibióticos); un efecto antiséptico (debido a la producción de bacteriocinas, ácido láctico y ácido acético y a la liberación de acetilo, aldehído acético, peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono); un efecto anti-tumoral (principalmente localizado en el colon y el recto); y un efecto inmunomodulador (pacientes tratados con estas cepas tienen mejores respuestas de linfocitos NK, anticuerpos, fagocitos y citocinas).

Además, están en discusión una serie de actividades biológicas que llevan a cabo estas distintas cepas, y se deberían confirmar pronto por estudios adicionales, tal como una actividad analérgica (en la esfera alimentaria), actividad anti-inflamatoria (en la esfera intestinal), actividad antioxidante (con repercusiones favorables en la esfera de la aterosclerosis), y actividad protectora hepática (especialmente en la esfera asociada al consumo de alcohol). Preferentemente, la mezcla de componentes probióticos comprende *Bifidobacterium longum* y al menos una especie adicional que se selecciona de entre el grupo de bacterias que consiste en *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus plantarum*.

En la mezcla de componentes probióticos mencionada anteriormente, se prefiere que el *Bifidobacterium longum* sea el *Bifidobacterium longum* R175 ("Rosell 175"), que el *Lactobacillus helveticus* sea el *Lactobacillus helveticus* R52 ("Rosell 52"); que el *Lactobacillus rhamnosus* sea el *Lactobacillus rhamnosus* R11 ("Rosell 11"), y que el *Lactobacillus plantarum* sea el *Lactobacillus plantarum* R1012 ("Rosell 1012"). El *Lactobacillus helveticus* R52 también puede conocerse como *Lactobacillus acidophilus* R52.

El *Bifidobacterium longum* R175 está disponible en el Institut Rosell Inc. (Lallemand), Montreal, Qc, Canadá con el código de producto 75119.

- 5 El *Bifidobacterium longum* R175 es un anaerobio estricto, que consiste en bastones Gram + de distintas formas, aisladas o en parejas (1-1,5 µm x 6 µm). Forma colonias blancas en medios selectivos. El *Bifidobacterium longum* R175 es heterofermentador y produce tanto, ácido L-láctico como ácido acético durante la fermentación. Es catalasa negativo. En condiciones de laboratorio, el *Bifidobacterium longum* R175 crece bien en medios disponibles en el mercado para bacterias acidolácticas (RCM) a 37 °C en condiciones anaeróbicas. En particular, es capaz de crecer en los siguientes azúcares (API 50 CH resulta después de 48 horas a 37 °C):

Control	-	Galactosa	+	α-metil-D-manósido	-	melibiosa	+	D-turanosa	+
Glicerol	-	D-glucosa	+	α-metil-D-glucósido	-	sacarosa	+	D-lixosa	-
Eritritol	-	D-fructosa	+	N-acetilglucosamina	-	trealosa	-	D-tagatosa	-
D-arabinosa	-	D-manosa	+	amigdalina	-	inulina	-	D-fucosa	-
L-arabinosa	+	L-sorbosa	-	arbutina	-	melezitosa	+	L-fucosa	-
Ribosa	-	ramnosa	-	esculina	-	D-rafinosa	+	D-arabitol	-
D-xilosa	+	dulcitol	-	salicina	-	almidón	-	L-arabitol	-
L-xilosa	-	inositol	-	celobiosa	-	glucógeno	-	gluconato	-
Adonitol	-	manitol	-	maltosa	+	xilitol	-	2-cetogluconato	-
β-metilxilósido	-	sorbitol	-	lactosa	+	β-gentobiosa	-	5-cetogluconato	-

- 10 Además el *Bifidobacterium longum* R175 muestra el siguiente perfil de resistencia a antibióticos:

Agente antimicrobiano	Dosis	Resultado	Agente antimicrobiano	Dosis	Resultado
Ampicilina	10 mcg	susceptible	Nitrofurantoina	300 mcg	susceptible
Bacitracina	10 unidades	susceptible	Novobiocina	30 mcg	susceptible
Cefalotina	30 mcg	susceptible	Penicilina G	10 unidades	susceptible
Cloranfenicol	30 mcg	susceptible	Polimixina B	300 unidades	resistente
Eritromicina	15 mcg	susceptible	Rifampicina	5 mcg	susceptible
Gentamicina	10 mcg	resistente	Estreptomicina	10 mcg	resistente
Kanamicina	30 mcg	resistente	Sulfisoxazol	300 mcg	resistente
Lincomicina	2 mcg	intermedio	Tetraciclina	30 mcg	susceptible
Neomicina	30 mcg	resistente	Vancomicina	30 mcg	susceptible

El *Lactobacillus helveticus* R52 se registró en el CNCM (Instituto Pasteur) con el número I-1722.

- 15 El *Lactobacillus rhamnosus* R11 se registró en el CNCM (Instituto Pasteur) con el número I-1720 y adicionalmente con el número 990411 en la Agencia de Inspección Alimentaria Canadiense.

El *Lactobacillus plantarum* R1012 se registró en el CNCM (Instituto Pasteur) con el número MA 18/5U.

Una mezcla particularmente preferida de componentes probióticos comprende *Bifidobacterium longum*, preferentemente *Bifidobacterium longum* R175 en combinación con *Lactobacillus*, preferentemente *Lactobacillus helveticus* R52 en combinación con, y/o *Lactobacillus plantarum*, preferentemente *Lactobacillus plantarum* R1012.

- 20 La mezcla específica de probióticos identificada anteriormente presenta características de estabilidad, adherencia, capacidad de colonización y proliferación. De acuerdo con un aspecto preferido de la misma, las composiciones contendrán especies de bacterias que constituyen la mezcla de probióticos en las siguientes cantidades:

- 50 mil millones UFC/g de *Bifidobacterium longum*;

- 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus helveticus*;
- 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus plantarum*.

La mezcla preferida de componentes probióticos comprende *Bifidobacterium longum* y *Lactobacillus rhamnosus*.

- 5 Las mezclas de probióticos específicas identificadas anteriormente presentan características de estabilidad, adherencia, capacidad de colonización y proliferación. En un aspecto preferido de la presente descripción, las composiciones contendrán especies de bacteria que constituye la mezcla de probióticos en las siguientes cantidades:

- 50 mil millones UFC/g de *Bifidobacterium longum*
- 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus rhamnosus*.

- 10 Preferentemente, la mezcla de componentes probióticos comprende *Bifidobacterium longum*, preferentemente *Bifidobacterium longum* R175 y *Lactobacillus rhamnosus*, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus* R11.

- 15 Con el fin de aumentar y/o mejorar la supervivencia de las especies probióticas se prefiere que las especies probióticas se combinen con un vehículo que comprende ingredientes no probióticos que no solo sirven como una fuente de alimento a los probióticos sino también ayudan a aumentar la eficacia total de la composición como un todo.

- 20 Se ha demostrado que cuando los lactobacilos y bifidobacterias se administran para modular la flora intestinal, el efecto puede ser transitorio, debido a la proliferación de bacterias exógenas puede ser limitada. Los inventores han demostrado que el *Bifidobacterium*, específicamente el *Bifidobacterium longum* tiene una pobre supervivencia cuando se administra solo. La suplementación combinada con prebióticos es necesaria para resolver este problema. Los inventores han descubierto sorprendentemente que cuando el componente probiótico, más específicamente el *Bifidobacterium longum*, se administra con un vehículo que comprende un prebiótico, la supervivencia de *Bifidobacterium longum* mejora y/o aumenta.

- 25 Los prebióticos son sustancias que se utilizan para proporcionar una nutrición selectiva adecuada para grupos bacterianos específicos, llamada fracción probiótico, con el fin de apoyar su resistencia, capacidad de colonización y capacidad reproductora en el intestino. En términos químicos, las sustancias prebióticas se corresponden con carbohidratos indigeribles y fibras dietéticas. Después de ser ingeridas, estas sustancias pasan a través de casi todo el tracto gastrointestinal superior intactas, sin someterse a ningún proceso digestivo. Cuando alcanzan el colon, representan el sustrato nutritivo principal de las bacterias saludables/comensales cuya presencia tiene que sustentar, que pueden utilizar estas sustancias y las digieren de manera que sirven como un sustrato nutritivo.

- 30 No todas las sustancias agrupadas en el término "prebiótico" tienen las mismas características específicas.

Los prebióticos son una familia de ingredientes alimentarios que son muy diferentes entre ellos, y que estimulan y facilitan el crecimiento de algunas especies bacterianas de una manera diferente que compuesto a compuesto.

Los prebióticos más ampliamente estudiados son inulina y fructooligosacáridos.

- 35 La inulina, descrita por primera vez a principios del siglo XIX, se encuentra en muchas plantas. La inulina extraída de la achicoria actualmente es la preferida para su uso dietético. La adición de inulina a un producto (que lo hace "simbiótico") garantiza la presencia del sustrato nutricional esencial para el equilibrio fisiológico de la flora microbiana completa. Cuando la inulina, un polisacárido no hidrolizable, se rompe (lo que solo resulta de la acción bacteriana), reduce el pH intestinal manteniendo el ambiente del colon inhabitable para el crecimiento de agentes patógenos.

- 40 Los FOS también son prebióticos utilizados ampliamente. En términos químicos son fructanos de cadena corta, y en consecuencia solubles con un grado de polimerización que no excede las 8 unidades de carbohidrato. Desde el punto de vista biológico, la adición de esta mezcla de prebióticos parece que es adecuada y satisfactoria: como se ha informado recientemente estos prebióticos modifican considerablemente la composición de la microflora intestinal, por ejemplo aumentando las bifidobacterias del 20 al 71 % del total de la población intestinal.

- 45 El vehículo para su uso en las composiciones probióticas preferentemente comprende un prebiótico tal como un componente de fibra. El prebiótico puede servir como una fuente alimenticia para las especies probióticas tales como Lactobacilos y Bifidobacterias. En el tracto gastrointestinal superior el *Bifidobacterium* no crece debido al ambiente de oxígeno, pero el *Lactobacillus* puede ser metabólicamente activo. Si los procesos enzimáticos de un organismo siguen activos, buscará una fuente de alimento. La relación sinérgica entre el *Lactobacillus* como probióticos y un prebiótico, preferentemente inulina puede producir que los lactobacilos tengan una actividad metabólica. Esto puede ser beneficioso para el huésped como se ha señalado anteriormente, pero también significaría que las células puede que no sobrevivan a la acción fisiológica en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, puede pensarse que la relación sinérgica positiva entre los lactobacilos y la inulina en el tracto GI superior aumente la capacidad potenciadora inmunitaria de las composiciones que contienen probióticos, sobre las cepas de lactobacilos individuales que no tienen presente el prebiótico, pero esta relación sinérgica sería a expensas del porcentaje de supervivencia acumulada.
- 55

Las composiciones de vehículo de las composiciones descritas en el presente documento actúan adicionalmente para combatir el microambiente típico de trastornos intestinales, que contrarresta la colonización eficaz después de la suplementación con probióticos. Los probióticos a menudo se encuentran en un ambiente caracterizado por la inflamación, alteración de la ósmosis tisular, y situaciones pro-oxidativas, asociadas con la presencia de cationes libres, que evitan la colonización de los probióticos. Sin embargo, la composición desarrollada de esta manera permite tasas muy altas de colonización gastroentérica debido a que prepara el sustrato para la colonización eficaz simultáneamente con la llegada de la mezcla probiótica.

En referencia a los componentes prebióticos, se pueden emplear al respecto carbohidratos y fibras tal como GOS, xilooligosacáridos, maltodextrinas indigeribles, inulina, isomaltooligosacáridos, lactitol, lactulosa y transgalactooligosacáridos, incluso aunque se prefieran la inulina, fructosa y/o fructooligosacáridos (FOS) en particular. Más preferentemente, las composiciones probióticas descritas en el presente documento comprenden uno o más prebióticos en una cantidad de hasta aproximadamente el 80 % del total de la composición. En otra alternativa preferida, el prebiótico es una combinación de inulina y fructosa. La inulina está presente en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; más preferentemente la inulina está presente en una cantidad de aproximadamente el 10 al 100 % del vehículo; más preferentemente la inulina es aproximadamente el 20 % del vehículo. La fructosa está presente en una cantidad de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; más preferentemente la fructosa está presente en una cantidad de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; más preferentemente la fructosa está presente en una cantidad mayor del 50 % del vehículo de la composición.

La composición de vehículo comprende adicionalmente lactoferrina. La lactoferrina es una glicoproteína en particular con un peso de 80.000 Daltons, que se había descrito desde 1939. Se une al hierro libre que se encuentra normalmente en la leche mamaria, saliva, lágrimas y gránulos secretores secundarios de los neutrófilos, y las secreciones mucosas.

La lactoferrina tiene distintas actividades, especialmente una actividad antibacteriana y anti-inflamatoria. Como se ha demostrado en numerosos estudios, la lactoferrina presenta una particular afinidad por la unión con la pared externa de las bacterias Gram-negativas y con el hierro libre: por medio del primer mecanismo de acción, la lactoferrina ejerce su capacidad "citotóxica" sobre las bacterias patógenas, y por medio del segundo produce la quelación del hierro libre y lo retira del microambiente.

La lactoferrina, así como limita el crecimiento intestinal de bacterias patógenas, ejerce propiedades anti-inflamatorias y recogida de radicales libres. Esta capacidad dual es particularmente importante en el intestino, en el que las bacterias patógenas a veces encuentran condiciones ideales para proliferar peligrosamente, ya que el pH típico de este órgano limita la operación correcta de la transferrina, una proteína responsable normalmente de la retirada del hierro libre, que es una fuente de radicales libres y que en consecuencia daña las membranas mucosas intestinales. Preferentemente, la composición de vehículo comprende lactoferrina en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 10 %; más preferentemente la lactoferrina está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 %; más preferentemente la lactoferrina está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,5 %.

También se ha descrito que la lactoferrina funciona como un prebiótico, proporcionando un sustrato para la fermentación por las bacterias comensales.

Las sales minerales que se emplean son una o más seleccionadas de entre el grupo que consiste en magnesio, potasio, zinc y opcionalmente cobre y las sales de los mismos, incluyendo pero sin limitarse a gluconato magnésico, citrato potásico, gluconato de zinc y citrato de cobre.

Como es bien conocido, durante las enfermedades, el metabolismo celular y tisular da lugar, especialmente si se asocia con una pérdida de líquidos a una pérdida de sodio, potasio, magnesio y cloro. Estos electrolitos son esenciales para correcto funcionamiento de las células de las fibras musculares (incluyendo las células de las fibras de músculo liso), el equilibrio de electrolitos y el equilibrio osmótico de las células y tejidos. En particular, una reducción de las reservas de potasio y el magnesio genera debilidad, contracciones musculares ineficaces y deficiencia de transmisión del pulso en la placa neuromuscular, espasmos. La adición de magnesio y/o potasio evita las deficiencias en el evento de estrés, infección, temperatura ambiental aumentada, esfuerzo físico, diarrea, etc.

El magnesio está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %; más preferentemente el magnesio está presente en una cantidad de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 20 %; más preferentemente aproximadamente un 14 a aproximadamente un 16 % de la composición de vehículo. Más preferentemente el magnesio está presente como gluconato magnésico.

El potasio está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %; más preferentemente el potasio está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 10 %; más preferentemente aproximadamente un 5 % de la composición de vehículo. Más preferentemente el potasio está presente como citrato potásico.

El zinc es un elemento vital que es vital para el sustento de la actividad de más de 100 enzimas, incluyendo las ADN

y ARN polimerasas, donde opera como una coenzima. Una deficiencia leve de cobre da lugar a una ligera hipofunción del sistema inmunitario, con un aumento del riesgo de trastornos relacionados con el frío (tal como síndromes de parainfluenza y gripe). En niños, una deficiencia leve de zinc puede dar lugar a un ligero retraso del crecimiento, mientras que una deficiencia grave produce la detención del crecimiento e hipogonadismo. Finalmente, la ausencia de zinc durante la gestación es teratogénica. La presencia de zinc promueve el funcionamiento del sistema inmunitario. El zinc está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %; más preferentemente el zinc está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 20 %; más preferentemente aproximadamente el 5 % de la composición de vehículo. Más preferentemente el zinc está presente como gluconato de zinc.

Opcionalmente, se puede añadir cobre al vehículo. El cobre es un elemento que se absorbe a nivel intestinal mediante mecanismos de transporte específico. En el hígado, se conjuga con la ceruloplasmina, como resultado de los cual se distribuye en todos los tejidos. Se excreta mediante la bilis y las heces. En los tejidos, el cobre es parte de la estructura de numerosas enzimas que incluyen la amino oxidasa, hierro oxidasa, superóxido dismutasa, tirosinasa, etc. La deficiencia de cobre, que es poco común, puede producir leucopenia, anemia, disfunciones musculoesqueléticas y despigmentación cutánea. Una deficiencia durante la gestación puede dar lugar a un peso bajo al nacer del bebé. El cobre, si está presente, normaliza las funciones inmunitarias, sobre todo ayudando a combatir las enfermedades invernales soportada por virus comunes.

Opcionalmente, la composición de vehículos puede comprender adicionalmente glutatión y/o arabinogalactanos.

El glutatión, también conocido como GSH, es un tripéptido que consiste en glicina, cistina y glutamato. Opera dentro de las células como un cofactor de las enzimas glutatión transferasa y glutatión peroxidasa, que se utilizan por las células para demoler moléculas letales tales como el peróxido de hidrógeno. Debido a la presencia de un grupo sulfhidrilo, el glutatión puede pasar alternativamente de una forma reducida a una forma oxidada, actuando como antioxidante. Debido a su capacidad para reaccionar con sustancias oxidantes tales como los radicales libres, hidroperóxidos y lipoperóxidos, es por lo tanto esencial, y se considera como una enzima clave en la prevención del envejecimiento celular. Aunque es un péptido, no es necesaria una gastroprotección debido a que se hidroliza poco por los jugos gástricos y las peptidasas presentes. La absorción oral es muy buena, y tiene lugar en el intestino. También se administra recientemente a altas dosis a pacientes que se someten a tratamientos oncológicos y del VIH. El producto es muy seguro. No parece que existan datos de toxicidad. La aceptación de los pacientes y la tolerabilidad del producto son también muy altas. El glutatión, si está presente, refuerza las defensas antioxidantes del cuerpo y evita el envejecimiento celular y tisular. El glutatión está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente un 20 %; más preferentemente el glutatión está presente en una cantidad de aproximadamente un 0.1 a aproximadamente un 5 %; más preferentemente aproximadamente un 1 % de la composición de vehículo.

Los arabinogalactanos son polisacáridos con alto peso molecular (aproximadamente 200.000 Daltons), cuya cadena principal es un polímero de ácido galacturónico que está parcialmente carboximetilada y acetilada en las posiciones laterales con ramnogalacturonanos. Desde el punto de vista biológico son unos fuertes estimulantes de macrófagos (en los macrófagos humanos y murinos se observa un aumento excelente de la producción de óxido nítrico durante la actividad fagocítica si se estimula por estos compuestos) y estimula la actividad de los linfocitos T (las poblaciones tanto auxiliares como citotóxicas).

Los arabinogalactanos, se están presentes, llevan a cabo una acción inmunoestimulante y refuerzan la respuesta a la infección por agentes patógenos. Más en particular, la adición opcional de un inmunógeno específico de T no absorbido (arabinogalactano) puede permitir la activación de la respuesta específica de T local, que tiene lugar en las áreas de ganglios linfáticos del intestino (placas de Peyer), produciendo de esta manera una reducción de la fracción patógena simultáneamente con la llegada de la fracción probiótica piógena. La simultaneidad de los dos eventos facilita adicionalmente los eventos de colonización y proliferación que de otra manera serían difíciles por la fracción patógena sensible a T.

Opcionalmente, las composiciones de la presente divulgación comprenden adicionalmente sacaromicetos o levaduras. La presencia de sacaromicetos o levaduras (si se utilizan) está justificada por el hecho de que liberan elementos traza y vitaminas con valor nutricional y que compitan con los agentes patógenos. Las levaduras se pueden emplear también en forma de un lisado enriquecido con glucanos, es decir, estructuras de polisacárido que limitan la adherencia bacteriana de los agentes patógenos a la mucosa intestinal. Preferentemente, las composiciones descritas pueden contener en particular *Saccharomyces cerevisiae* y/o *boulardii*. Particularmente, el *Saccharomyces boulardii* que se emplea es el *Saccharomyces boulardii* ATCC 74012.

Con respecto a la adición opcional adicional de ingredientes que no sean directamente probióticos, su principal objetivo es de alguna manera proporcionar una ventaja prebiótica adicional; lo anterior se aplica, por ejemplo, a transportadores de cisteína, tal como la N-acetilcisteína y similares; lo mismo se aplica a ingredientes con acción quelante sobre cationes y aniones libres como las procianidinas, antocianos, y catequinas con cualquier grado de polimerización, y similares; y lo mismo se aplica a elementos que ya modulan la respuesta inmunitaria a nivel entérico, como las distintas especies de Echinacea, Uncaria y Astragalus. Finalmente, lo mismo se aplica a la adición de macro o micronutrientes y vitaminas hidro o liposolubles. Por último, la adición de antioxidantes puede

tener adicionalmente un efecto protector sobre los probióticos contenidos en las composiciones descritas en el presente documento. SE ha descubierto que las composiciones descritas en el presente documento poseen una actividad de mejora de la salud considerable, mantienen y/o recuperan la salud intestinal, evitan las consecuencias del estrés y llevan a cabo una acción anti-inflamatoria e inmunomoduladora. Al mismo tiempo, garantizan la colonización eficaz. El efecto de las composiciones es mayor que la que se obtiene después de la administración por separado de los componentes individuales del a combinación, aparentemente debido a una sinergia entre los distintos componentes.

Las composiciones particularmente preferidas contienen:

- a) una mezcla de componentes probióticos que comprende *Bifidobacterium longum* R175, *Lactobacillus helveticus* R52, y *Lactobacillus plantarum* R1012.
- b) un vehículo que comprende:

- 1) un componente prebiótico que comprende inulina y fructosa;
- 2) lactoferrina;
- 3) una mezcla de sales minerales que consiste en sales de magnesio, potasio, y de zinc; y
- 4) glutatión.

Preferentemente, la composición contiene:

- a) una mezcla de componentes probióticos que comprende 50 mil millones UFC/g de *Bifidobacterium longum*; 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus helveticus*; y 150 mil millones UFC/g de *Lactobacillus plantarum*; y
- b) un vehículo que comprende:

- 1) una mezcla de prebióticos que comprende aproximadamente el 80 % del total de la composición de vehículo en el que los prebióticos son inulina y fructosa, en el que la inulina está presente en una cantidad de aproximadamente un 10 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; más preferentemente la inulina es aproximadamente el 20 % del vehículo y la fructosa está presente en una cantidad de aproximadamente un 1 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; más preferentemente la fructosa está presente en una cantidad de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 100 % de la composición de vehículo; más preferentemente la fructosa está presente en una cantidad mayor del 50 % del vehículo de la composición;
- 2) lactoferrina en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente un 10 %; más preferentemente la lactoferrina está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 5 %; más preferentemente la lactoferrina está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,5 %.
- 3) sales minerales que se seleccionan de entre el grupo que consiste en sales de magnesio, potasio y de zinc, en las que el magnesio está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %; más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente un 20 %; más preferentemente aproximadamente 14 a aproximadamente un 16 % de la composición de vehículo y el magnesio es gluconato magnésico; en el que el potasio está presente en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %; más preferentemente el potasio está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 10 %; más preferentemente aproximadamente el 5 % de la composición de vehículo y además el potasio es citrato potásico; y además en el que el zinc está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente el 100 %; más preferentemente el zinc está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 20 %; más preferentemente aproximadamente el 5 % de la composición de vehículo y en el que el zinc está presente como gluconato de zinc; y
- 4) glutatión, en el que el glutatión está presente en la composición de vehículo en una cantidad de aproximadamente 0 a aproximadamente un 20 %; más preferentemente el glutatión está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 5 %; más preferentemente aproximadamente el 1 % de la composición de vehículo.

Las composiciones particularmente preferidas adicionales contienen:

- a) una mezcla de componentes probióticos que comprende *Bifidobacterium longum* R175 y *Lactobacillus rhamnosus* R11; y *Saccharomyces boulardii*; y
- b) un vehículo que comprende:

- 1) un componente prebiótico que consiste en inulina y fructosa;
- 2) lactoferrina;
- 3) una mezcla de sales minerales que consiste en sales de magnesio, potasio y sales de zinc; y
- 4) glutatión.

De acuerdo con un aspecto preferido, las composiciones descritas en el presente documento se utilizarán para preparar suplementos de la dieta.

Las composiciones de acuerdo con la presente divulgación se podrían formular adecuadamente para la

administración oral, y se prepararán de acuerdo con procedimientos convencionales bien conocidos en la tecnología farmacéutica, tales como las que se describen en Remington's Pharmaceutical Handbook, Mack Publishing Co., N.Y., USA, utilizando excipientes, diluyentes, cargas y agentes anti-apelmazantes aceptables para su uso final. Los ingredientes adicionales ejemplares incluyen ácido cítrico, óxido magnésico, dióxido de silicio y otros ingredientes que apreciara un experto en la técnica.

Las composiciones se podrían formular por ejemplo, en forma de papelillos solubles, formas solubles orales, cápsulas, comprimidos, comprimidos masticables, comprimidos multi-capa con liberación dependiente del tiempo y el pH, y granulados.

Las composiciones se pueden utilizar para aumentar y/o mejorar la viabilidad y supervivencia de las especies probióticas, más particularmente para aumentar y/o mejorar la viabilidad de *Bifidobacterium longum*. Dichos procedimientos comprenden la mezcla del componente probiótico que comprende *Bifidobacterium longum* solo o en combinación con una o más especies probióticas y un vehículo que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más prebióticos; una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más sales minerales; una cantidad terapéuticamente eficaz de lactoferrina y opcionalmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de glutatión. Como se utiliza en el presente documento, "cantidad" se refiere a la cantidad o la concentración que es apropiada en el contexto. La cantidad de un material que constituye una cantidad terapéuticamente eficaz varía de acuerdo con factores tales como la potencia, eficacia, y similares, del material en particular, la vía de administración, y la forma de dosificación utilizada. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un material en particular se puede seleccionar por los expertos habituales en la técnica con la debida consideración de dichos factores. La concentración del material depende de la dosificación deseada.

Las dichas composiciones formuladas, como se han descrito en el presente documento, son estables en almacenamiento a temperatura ambiente.

De manera adicional, las composiciones desveladas en el presente documento también se pueden utilizar para mejorar y/o aumentar el efecto terapéutico de los materiales probióticos. Aunque las composiciones desveladas presentan una supervivencia del probiótico mejorada, se cree que las formulaciones tienen una mayor eficacia ya que sobrevive una cantidad mayor del probiótico al tránsito a través del tracto gastrointestinal superior e inferior. En consecuencia, las composiciones del presente divulgación se pueden utilizar para mejorar y/o aumentar la salud gastrointestinal y/o la inmunidad en un sujeto humano que tiene necesidad de las mismas.

Algunos ejemplos de formulaciones se exponen posteriormente. Bien entendido que los intervalos numéricos y parámetros expuestos en el amplio ámbito de la divulgación son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se exponen lo más precisamente posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene ciertos errores inherentes que resultan necesariamente de la desviación estándar que se encuentra en sus respectivas mediciones de ensayo. Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren la invención sin limitar como resultado el ámbito.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar el procedimiento reivindicado y su práctica.

Ejemplos

Ejemplo 1

NOMBRE DEL COMPONENTE		mg/papelillo
Material probiótico:		
<i>Lactobacillus helveticus</i> Rosell 52	150 mil millones UFC/g	73,333
<i>Bifidobacterium longum</i> R175	50 mil millones UFC/g	20,000
<i>Lactobacillus plantarum</i> Rosell 1012	150 mil millones UFC/g	20,000
Material de vehículo:		
Óxido magnésico		41,446
Gluconato magnésico		341,297
Citrato potásico		138,290
Gluconato de Zinc		111,111
Glutatión		20,000
Lactoferrina		11,364
Citrato de cobre		2,834
Inulina		500,000
Fructosa		1291,125

(continuación)

NOMBRE DEL COMPONENTE	mg/papelillo
Excipientes adicionales (opcionales)	
Sucralosa	4,000
Acesulfamo K	12,000
Saborizante	150,000
Aerosil 200	40,000
Colorante : E124	2,200
Colorante : E102	1,000
Ácido cítrico anhidro	220,000

5 La formulación descrita anteriormente se prepara de la siguiente manera: Se mezclan el *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum* con inulina y se mezclan a 32 rpm durante aproximadamente 10 minutos. A continuación, se añaden fructosa, gluconato magnésico, gluconato de zinc, ácido cítrico, saborizantes, citrato potásico, óxido de magnesio, dióxido de silicio, glutatión, acesulfamo potásico, lactoferrina, y sucralosa a la mezcla y se mezclan a 32 rpm otros 10 min.

Ejemplo 2

NOMBRE DEL COMPONENTE	mg/papelillo
Materiales probióticos:	
<i>Saccharomyces boulardii</i> 20 mil millones	100,000
<i>Bifidobacterium longum</i> R175 50 mil millones	20,000
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Rosell 11 150 mil millones UFC/g	46,667
Material de vehículo:	
Gluconato de magnesio	511,945
Gluconato de zinc	50,000
Lactoferrina	11,364
Fructosa	2585,024
Inulina	500,000
Excipientes adicionales (opcionales)	
Saborizante de melocotón 68AP0551	70,000
Ácido cítrico anhidro	50,000
Colorante : 1 % beta caroteno	28,000
Sucralosa	7,000
Aerosil 200	20,000
TOTAL	4000,00

10

Ejemplo 3

NOMBRE DEL COMPONENTE	mg/papelillo
Materiales probióticos:	
<i>Lactobacillus helveticus</i> Rosell 52 150 mil millones UFC/g	73,333
<i>Bifidobacterium longum</i> R175 50 mil millones UFC/g	20,000
<i>Lactobacillus plantarum</i> Rosell 1012 150 mil millones UFC/g	20,000
Vehículo:	
Óxido magnésico	41,446
Gluconato de magnesio	341,297
Citrato potásico	138,290

(continuación)

NOMBRE DEL COMPONENTE	mg/papelillo
Gluconato de zinc	111,111
Glutación	20,000
Lactoferrina	11,364
Inulina	500,000
Fructosa	1335,678
Excipientes adicionales (opcionales):	
Sucralosa	4,000
Acesulfamo K	12,000
Saborizante	150,000
Aerosil 200	40,000
Colorante: E124	2,200
Colorante: E102	1,000
Ácido cítrico anhidro	220,000
TOTAL	3000,00

La formulación descrita anteriormente se prepara de la siguiente manera: Se mezclan *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium longum*, con inulina y se mezclan a 32 rpm durante aproximadamente 10 min. A continuación, se añade fructosa, gluconato magnésico, gluconato de zinc, ácido cítrico, saborizante, citrato potásico, óxido magnésico, dióxido de silicio, glutatión, acesulfamo potásico, lactoferrina y sucralosa a la mezcla y se mezcla a 32 rpm otros 10 min.

Ejemplo 4

Las especies probióticas contenidas en la formulación descrita en el Ejemplo 3 se ensayaron para determinar la tasa de supervivencia de los probióticos. Se ensayó la supervivencia de las cepas probióticas en la composición de la presente invención en comparación con las cepas individuales, en un modelo *in vitro* dinámico del tracto gastrointestinal superior, también conocido como TIM-1. El modelo TIM-1 puede simular condiciones de la cámara gástrica y el intestino delgado del ser humano, y por lo tanto se puede utilizar para evaluar el porcentaje de supervivencia acumulada de los probióticos según transitan por el tracto gastrointestinal superior.

La composición del ejemplo 3 ensayada en el TIM-1 contenía una cantidad total de células probióticas (unidades formadoras de colonias, o UFC) de $9,81 \times 10^9$ UFC en número. Cuando se evaluaron los niveles individuales de las cepas probióticas contenidas en la composición del Ejemplo 3, la cantidad de cada cepa cuantificada por placa microbiana era:

8,0 x 10⁹ UFC de *Lactobacillus helveticus*
 8,7 x 10⁸ UFC de *Lactobacillus plantarum*
 9,1 x 10⁸ UFC de *Bifidobacterium longum*

El nivel cuantificado de cada cepa de probiótico en la composición del Ejemplo 3 era el nivel diana utilizado cuando se ensayaban las cepas individuales en el modelo TIM-1. En otras palabras, el nivel de las cepas probióticas, sea en el producto o individualmente, se estableció que era de 8×10^9 UFC para *L. helveticus*, $8,8 \times 10^8$ UFC para *L. plantarum* y $9,1 \times 10^8$ UFC para *B. longum*.

En los experimentos actuales, las cepas probióticas individuales y la composición del Ejemplo 3 se administran con un alimento (desayuno continental europeo ligero). Así, la cantidad final de cada una de las cepas, cuando se mezclan con el alimento, se confirmó y por tanto, el nivel medio de inicio para queda probiótico que se utilizó, tanto individualmente así como en la composición del Ejemplo 3, era:

8,6 x 10⁹ UFC de *Lactobacillus helveticus*
 7,0 x 10⁸ UFC de *Lactobacillus plantarum*
 1,4 x 10⁹ UFC de *Bifidobacterium longum*

Los resultados del ensayo TIM-1 se representan en la tabla siguiente:

Cepa probiótica		% supervivencia acumulada	% medio de supervivencia acumulada	Unidades formadoras de colonias (UFC)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Ejecución 1a	2,20	1,4	1,2 x 10 ⁸ UFC
	Ejecución 2a	0,44		

(continuación)

Cepa probiótica		% supervivencia acumulada	% medio de supervivencia acumulada	Unidades formadoras de colonias (UFC)
	Ejecución 2b	0,49		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ejecución 1a	12,45	9,7	6,8 x 10E7 UFC
	Ejecución 2a	5,63		
	Ejecución 1b	12,92		
	Ejecución 2b	7,77		
<i>Bifidobacterium longum</i>	Ejecución 1a	29,55	42,9	6,0 x 10E8 UFC
	Ejecución 2a	31,20		
	Ejecución 1b	68,55		
	Ejecución 2b	42,11		

A continuación, cada una de las cepas identificadas posteriormente se ensayó individualmente mediante el TIM-1. Los datos se presentan posteriormente en la tabla siguiente.

Cepa probiótica		% supervivencia acumulada	% medio de supervivencia acumulada	Unidades formadoras de colonias (UFC)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Ejecución 1	13,11	13,1	1,1 x 10E9 UFC
	Ejecución 2	13,15		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ejecución 1	45,17	39,2	2,7 x 10E8 UFC
	Ejecución 2	33,24		
<i>Bifidobacterium longum</i>	Ejecución 1	0,01	0,02	2,8 x 10E5 UFC
	Ejecución 2	0,02		

5

Estos datos muestran que hay un efecto sinérgico de la composición. Más específicamente, el número de las células probióticas de *Bifidobacterium longum* que sobreviven al tránsito a través del tracto gastrointestinal superior es más de 1000 veces mayor (más de $3_{\log 10}$) que cuando se ensayan sin los otros probióticos y el vehículo. Cuando se administra el *Bifidobacterium longum* independientemente de la composición de la invención no demostraba una supervivencia robusta. De hecho el *Bifidobacterium longum* tenía solamente un 0,02 % de supervivencia acumulada cuando se administraba solo en comparación con el 42,9 % de supervivencia acumulada cuando se administraba en combinación con *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum* y el vehículo que comprendía: un prebiótico (inulina y fructosa), gluconato de zinc, gluconato magnésico, citrato potásico; glutatión y lactoferrina; y opcionalmente ácido cítrico, óxido magnésico y dióxido de silicio.

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición probiótica que comprende una mezcla de componentes probióticos que comprende 50 mil millonesmil millones UFC/g de *Bifidobacterium longum*; 150 mil millonesmil millones UFC/g de *Lactobacillus helveticus*; y 150 mil millonesmil millones UFC/g de *Lactobacillus plantarum*; y un vehículo que comprende: una
5 mezcla de prebióticos que comprende inulina en una cantidad del 20 % del vehículo y fructosa en una cantidad de más del 50 % del total de la composición de vehículo; lactoferrina en una cantidad de un 0,5 % de la composición de vehículo; gluconato magnésico en una cantidad del 14 al 16 % del total de la composición de vehículo; el citrato potásico está presente en una cantidad del 5 % del total de la composición de vehículo; y gluconato de zinc en una
10 cantidad del 5 % del total de la composición de vehículo; y glutatión, en el que el glutatión está presente en la composición de vehículo en una cantidad del 1 % del total de la composición de vehículo.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso por administración oral para el mantenimiento y/o recuperaciónrecuperación de la salud intestinal o para evitar la disbiosis de cualquier etiología en mamíferos.
3. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 1, para la preparación de una formulación de
15 administración oral para el mantenimiento y/o recuperaciónrecuperación de la salud intestinal o para evitar la disbiosis de cualquier etiología en mamíferos.