

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 668**

51 Int. Cl.:

A61K 35/744 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A61K 36/8998 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)
A61P 1/10 (2006.01)
A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/GB2012/000841**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13072654**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12797955 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2780023**

54 Título: **Tratamiento del IBS con probióticos**

30 Prioridad:

16.11.2011 GB 201119774
09.12.2011 GB 201121207

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2018

73 Titular/es:

MULTIGERM UK ENTERPRISES LTD. (100.0%)
Sandy Farm Business Centre The Sands
Farnham
Surrey GU10 1PX, GB

72 Inventor/es:

SMITH, BARRY, EDWARD

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 655 668 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

Tratamiento del IBS con probióticos

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a preparaciones de probióticos que contienen bacterias probióticas viables, metabólicamente activas para su uso en el tratamiento del Síndrome de Colon Irritable.

10 **Antecedentes de la invención**

El Síndrome de Colon Irritable es la más común de todas las enfermedades gastrointestinales y es prevalente en alrededor del 10-15 % de la población del RU en cualquier momento dado. Es la causa de aproximadamente el 40 % de todas las visitas al hospital basándose en los gastroenterólogos del RU (y en cualquier parte) y es preocupante que, una vez que se hace el diagnóstico, más del 90 % de los pacientes siguen teniendo síntomas cinco años más tarde.

Afectando dos veces más a las mujeres que a los hombres, el IBS habitualmente comienza al final de la pubertad hacia la veintena y fluctúa en intensidad. Debido a la naturaleza de los síntomas puede ser vergonzoso hablar de ello y como resultado, el porcentaje de personas que padecen IBS en un momento dado probablemente es mayor que el informado. Los síntomas clave incluyen, dolor cólico de estómago y dolor, diarrea, estreñimiento e hinchazón, definiéndose muchos pacientes como que tienen IBS con 'diarrea' o 'estreñimiento' predominantes.

El IBS produce muchas molestias y angustia en mucha gente y aunque no pone en peligro la vida, produce un impacto grave en la calidad de vida de un individuo. La gente cada vez se da de baja laboral por periodos más largos debido al IBS y como mucha población está afectada la escala del problema sobre la economía y la carga sobre los servicios sanitarios es considerable.

Los investigadores no han descubierto aún ninguna causa específica del IBS. Las teorías incluyen las reacciones al alimento, es estrés, la motilidad anormal o hiper-sensibilidad visceral, absorción de demasiado fluido en el tracto digestivo, sobre-crecimiento bacteriano y el abuso de antibióticos, por nombrar unas cuantas. Como resultado, los GP y gastroenterólogos encuentran difícil advertir un curso de acción. Las directrices recomiendan tratar los síntomas más que encontrar la causa. Las opciones de tratamiento disponibles que utilizan agentes psicótrópos existentes, agonistas y antagonistas del receptor de la serotonina, se limitan a los casos más graves, y su uso no es que no tenga efectos secundarios. Algunos fármacos que se prescriben para el IBS se sabe que producen adicción, náuseas o somnolencia extrema y en algunos casos, los agentes se han retirado del mercado por los fabricantes farmacéuticos debido a los efectos secundarios adversos graves. Para los pacientes que no entran en la categoría 'grave' y cuando no hay una intolerancia alimentaria en los ensayos siguientes, los GP pueden ofrecer solo unas directrices generales sobre la dieta, estilo de vida y posibles tratamientos sin prescripción médica.

Esto deja a la mayoría de la población que padece IBS con pocas opciones salvo intentar y encontrar una solución por sí mismos. Para la mayoría de la gente, es común intentar controlar sus síntomas con una combinación de la mejor dieta, manejo del estrés, y medicinas sin prescripción o remedios alternativos. Sin embargo, muchos solo encuentran un alivio limitado. No es poco habitual que una persona con síntomas de IBS compre y consuma numerosos productos para su afección y que gaste cantidades de dinero significativas para intentar aliviarse. Estos incluyen fármacos antiespasmódicos aunque muchos se asocian con efectos secundarios sustancialmente anti-colinérgicos. La gente que padece IBS con estreñimiento dominante habitualmente comienza con laxantes, y los de diarrea predominante intentan los antidiarreicos. Sin embargo, casi todos estos tratamientos no tienen una eficacia demostrada en el tratamiento del IBS, o se asocian con efectos secundarios significativos. Muchos pacientes, que han intentado estos tratamientos repetidamente durante un periodo de tiempo, siguen estando insatisfechos y muchos buscan estrategias alternativas tales como un cambio de dieta, o terapias complementarias.

Algunos pacientes intentan una nueva estrategia dietética tal como una dieta alta o baja en fibra, o la eliminación de ciertos alimentos, por ejemplo, el trigo. Nunca se ha demostrado convincentemente un papel del desencadenamiento por la dieta, aunque muchos pacientes sienten un beneficio con el cambio de dieta. Los resultados de un estudio en la última década, particularmente desde la introducción de los criterios fundamentales de referencia de Roma para evaluar el IBS, muestran que hacer estos cambios tiene un impacto imitado en los pacientes con IBS. Muchos informan de un pequeño cambio en la defecación pero un aumento de gas y distensión cuando se siguen dietas altas en fibra o se utiliza un suplemento de fibra. Otras dietas de exclusión incluyen el gluten y la lactosa o las proteínas de la leche y aunque pueden mejorar a algunos, para la mayoría, siguen existiendo los síntomas de IBS.

Como resultado, la mayoría de la gente tiene que vivir con sus síntomas, aunque en muchos estudios, la gente menciona que el IBS les ha llevado a acortar la manera de vivir 'normalmente', o les produce la pérdida de sus actividades sociales o familiares, les impide ir a trabajar, sufriendo también algunas personas de depresión.

En la última década, el conocimiento de la población sobre la salud intestinal, su importancia en relación con el sistema inmunitario y otras funciones corporales vitales, ha sufrido un cambio enorme. La proliferación de artículos y estudios disponibles en internet, las campañas de salud dirigidas por el NHS y las organizaciones no gubernamentales, así como las actuaciones en las publicaciones de consumo, han ayudado al entendimiento y concientización de la población sobre el papel de la flora intestinal. En un estudio publicado por un consorcio europeo dirigido por MetaHit en 2010, los científicos anunciaban que compartimos un grupo central (de varios cientos) de genes microbianos diferentes que son responsables de al menos 600 funciones bioquímicas. El estudio demostraba que la población con enfermedades tiene un desequilibrio de la flora intestinal como pocos genes microbianos y esto podría estar relacionado con los que se encuentran en las afecciones GI.

Los probióticos se encuentran en varios formatos y el desafío principal es el suministro de las bacterias eficazmente y documentar un beneficio clínico para la salud en ensayos diseñados apropiadamente. Es difícil calcular una cantidad diaria específica de unidades formadoras de colonias (UFC) viables a un nivel que pruebe que confiera un beneficio para la salud. Sin embargo, incluso es más difícil producir un producto que pueda superar los cambios de temperatura ambiente, o los niveles de pH en el ambiente del huésped y mantener aun el mismo número de recuento viable – el punto en que se necesitan – y no en el momento de la fabricación. En formatos de probióticos en productos lácteos y secados por congelación, esto supone particularmente un desafío ya que los yogures se someten a digestión en el estómago, y los polvos y cápsulas necesitan varias horas para rehidratarse antes de que se activen.

Hasta la fecha, el formato puede ser una de las razones de por qué a las compañías de probióticos les cuesta demostrar la eficacia en el IBS que está soportada por fuertes evidencias.

Los organismos microbiológicos se utilizan frecuentemente como suplementos alimentarios. Un ejemplo son las bacterias probióticas que se sabe que tienen efectos beneficiosos en la flora intestinal aumentando la resistencia a enfermedades infecciosas tales como la diarrea. Los probióticos también han demostrado que están implicados en la modificación de la química sanguínea y en la inmunomodulación (véase las referencias listadas como Beneficios Potenciales para la salud en la sección de referencias).

Las bacterias probióticas se pueden encontrar en productos lácteos tales como el yogur y las especies que se sabe que tienen beneficios para la salud incluyen los de los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*. Sin embargo, los productos lácteos con probióticos tienen una vida corta en almacenamiento.

Los métodos actuales para almacenar cultivos bacterianos utilizan normalmente la liofilización, también denominada secado por congelación. En este proceso, el agua se elimina del organismo por sublimación y el organismo se puede revivir después de la adición de agua. Sin embargo, las bacterias congeladas por vacío no son metabólicamente activas y se sabe bien que los productos secados por congelación normalmente pierden mucha de su resistencia después de varias semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (Fonseca et al y Murga et al).

Además, muchos probióticos comerciales parece que no contienen todas las especies mencionadas en la etiqueta, y si están presentes las bacterias el número de bacterias viables a menudo es muy bajo (J. Hamilton-Miller).

Sumario de la invención

Un estudio con ocultación doble controlado por placebo se llevó a cabo en una cohorte de pacientes con Síndrome de Colon Irritable particularmente grave utilizando una preparación probiótica basada en un líquido no lácteo que se caracterizaba por la presencia de una alta cantidad de bacterias probióticas metabólicamente activas viables. Este estudio clínico demostró claramente una mejora estadísticamente significativa en el índice de gravedad de síntomas de IBS, a continuación de un periodo de tratamiento de 3 meses con la preparación probiótica.

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona una preparación probiótica, que comprende bacterias probióticas metabólicamente activas, viables en un sustrato líquido no lácteo, para su uso en el tratamiento del Síndrome de Colon Irritable.

En una realización, la preparación probiótica es capaz de un suministro de bacterias probióticas metabólicamente activas viables en el tracto intestinal de un sujeto humano sin originar su digestión.

En una realización, las bacterias probióticas de la preparación probiótica son estables cuando se mantienen en un cultivo a pH 3,0 durante un periodo de al menos 6 horas.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona una preparación probiótica que comprende bacterias probióticas metabólicamente activas, viables en un sustrato líquido no lácteo que comprende una mezcla de carbohidratos complejos y azúcares simples, donde la relación del contenido de carbohidratos total respecto al contenido de azúcares reducidos de la preparación probiótica está en el intervalo de desde 8:1 a 2:1, para su uso en el tratamiento del Síndrome de Colon Irritable.

La preparación probiótica que se utiliza en el tratamiento de IBS como se describe en el presente documento se puede preparar cultivando una o más cepas de bacterias acidolácticas probióticas en un sustrato de cultivo derivado de granos de cereales malteados. Más específicamente, la preparación probiótica se puede preparar cultivando una o más cepas de bacterias acidolácticas probióticas en un extracto de cebada germinada.

5 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una preparación probiótica que comprende bacterias probióticas metabólicamente activas viables en un sustrato líquido no lácteo, para su uso en el tratamiento del Síndrome de Colon Irritable, donde la preparación probiótica se prepara cultivando una o más cepas de bacterias probióticas en un extracto de cebada germinada.

10 La invención proporciona adicionalmente el uso de una preparación probiótica que comprende bacterias probióticas metabólicamente activas viables en un sustrato líquido no lácteo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del Síndrome de Colon Irritable.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra las unidades formadoras de colonias totales por mililitro (ufc/ml) durante el tiempo (en minutos) durante una comparación entre un producto probiótico secado por congelación multicepa disponible en el comercio (MS-FD1 y MS-FD2 en la figura), un popular producto probiótico basado en leche con una única cepa disponible en el mercado (SS-MB1 y SS-MB2 en la figura) y la preparación probiótica del ejemplo 3 (Symprove™ que contiene múltiples cepas de bacterias) (SYM en la figura). La comparación se llevó a cabo a un pH de 3.

20 La Figura 2 muestra las unidades formadoras de colonias totales por mililitro (ufc/ml) durante el tiempo (en minutos) durante una comparación entre el producto probiótico secado por congelación multicepa (MS-FD1 y MS-FD2 en la figura), un producto probiótico basado en leche de una única cepa (SS-MB1 y SS-MB2 en la figura) y la preparación probiótica del ejemplo 3 (Symprove™ que contiene múltiples cepas de bacterias) (SYM en la figura). La comparación se llevó a cabo a un pH de 6.

30 **Descripción detallada de la invención**

La invención proporciona un tratamiento eficaz del Síndrome de Colon Irritable (IBS) utilizando una preparación probiótica que se ha demostrado, en un estudio con ocultación doble controlado por placebo, que proporcionan una reducción sin precedentes estadísticamente en la gravedad de los síntomas del IBS, medida con el índice de gravedad de síntomas de IBS.

35 La preparación probiótica que se utiliza en el tratamiento eficaz del IBS es un producto basado en un líquido (y normalmente un producto basado en agua) que no es lácteo y no está secado por congelación. La preparación probiótica contiene bacterias probióticas metabólicamente activas viables en un sustrato líquido que es capaz de suministrar las bacterias probióticas metabólicamente activas viables en el tracto intestinal, donde las bacterias probióticas comienzan a establecerse y multiplicarse rápidamente. Las bacterias probióticas de la preparación por tanto están “vivas” y listas para funcionar inmediatamente después de la ingestión de la preparación.

40 Los productos probióticos de la técnica anterior están disponibles predominantemente en formatos lácteos o secados por congelación tales como polvos o cápsulas. Con el fin de que los probióticos trabajen eficazmente y en su punto óptimo, se tienen que dirigir a los sitios específicos en el tracto intestinal sin provocar la digestión así como evitando los extremos. Si se produce la digestión, los ácidos del estómago pueden debilitar o destrozarse las bacterias probióticas. Para algunos probióticos esto es un desafío ya que como están contenidos en bebidas tipo yogur el estómago inicialmente los ‘ve’ como un alimento. Por otro lado, los probióticos secados por congelación se han sometido a una temperatura de alrededor de menos 80 °C y las fimbrias se pueden romper durante el proceso de congelación. Los probióticos secados por congelación tienen que rehidratarse antes de que sean capaces de funcionar adecuadamente. Esto puede llevar varias horas. El hallazgo de un “sistema de transporte” eficaz para las bacterias probióticas es un objetivo clave para los fabricantes que producen suplementos probióticos o alimentos funcionales.

45 La preparación probiótica que se describe en el presente documento y que han demostrado ser eficaces clínicamente en el tratamiento de IBS grave no padecen estos inconvenientes, ya que las bacterias probióticas se transportan en un sustrato basado en líquido, normalmente un sustrato basado en agua, que protege y transporta las bacterias probióticas con seguridad a través del estómago (sin desencadenar la digestión) hasta los intestinos donde rápidamente comienzan a establecerse y multiplicarse. Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, se cree que la naturaleza viable de las bacterias probióticas en la preparación que se describe en el presente documento y que muestran ser clínicamente eficaces en el tratamiento del IBS les permiten establecerse rápidamente en el tracto gastrointestinal del paciente, quizá a los 15 a 20 minutos de la ingestión. Se cree que dicho rápido establecimiento contribuye a la eficacia sin precedentes que se observa en el tratamiento clínica del IBS, dando como resultado una reducción significativa de la gravedad de los síntomas del IBS.

Definiciones

5 “Probiótico” – como se utiliza en el presente documento el término “probiótico” se va a interpretar de acuerdo con el informe conjunto de la FAO/OMS y las directrices para el uso de probióticos, en los que los probióticos se definen como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped”. La expresión “bacterias probióticas” se refiere a cualquier cepa bacteriana que cumple esta definición de un “probiótico”.

10 “Bacterias acidolácticas (LAB)” – como se utiliza en el presente documento la expresión “bacterias acidolácticas (LAB)” se refiere a un grupo de bacterias Gram positivas, catalasa negativa, no móviles, anaerobias que fermentan los carbohidratos a ácido láctico. Este grupo incluye los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*.

15 “Bacterias acidolácticas probióticas” – como se utiliza en el presente documento, la expresión “bacterias acidolácticas probióticas” se refiere a bacterias acidolácticas que también satisfacen la definición de un “probiótico” como se utiliza en el presente documento. Las bacterias acidolácticas probióticas incluyen, pero no se limitan a, las de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*.

20 “Síndrome de Colon Irritable” – el Síndrome de Colon Irritable es un trastorno con síntomas cólicos crónicos o recurrentes. El trastorno se manifiesta por una variedad de síntomas, que pueden variar de un paciente a otro. Los síntomas clave incluyen, dolor cólico estomacal y dolor, diarrea, constipación e hinchazón, definiéndose muchos pacientes como que tienen un IBS predominantemente ‘diarreico’ o ‘con estreñimiento’. La expresión “Síndrome de Colon Irritable” como se utiliza en el presente documento pretende englobar todas las formas de esta afección. Se pueden utilizar los Criterios de Roma del IBS con fines diagnósticos.

25

Criterios de Roma del IBS

30 La fundación Roma es una organización independiente sin ánimo de lucro que proporciona soporte para actividades diseñadas para crear datos científicos e información educacional para ayudar al diagnóstico y tratamiento de trastornos funcionales gastrointestinales. Los criterios de Roma del IBS I y II se definieron y se han actualizado recientemente por gastroenterólogos internacionales punteros para ayudar a los clínicos a mejorar el diagnóstico y el manejo de IBS. Los criterios de Roma III permiten la presencia de síntomas de IBS durante un espacio de tiempo corto.

35 Los criterios de Roma definen el IBS por la presencia de dolor abdominal asociado con defecaciones alteradas, en ausencia de un trastorno bioquímico o estructural identificable. Los síntomas clave incluyen, dolor cólico estomacal y dolor, diarrea, estreñimiento e hinchazón, definiéndose muchos pacientes como que tienen IBS predominantemente ‘diarreico’ o ‘con estreñimiento’.

40 Estos criterios son valiosos para el manejo preciso de ensayos clínicos.

Criterios de Roma II del Síndrome de Colon Irritable

45 El dolor de estómago o las molestias durante 12 semanas consecutivas en los últimos 12 meses en el que están presentes dos o tres características:

- alivio por un movimiento intestinal
- aparición asociada con un cambio en la frecuencia de defecación
- aparición asociada con un cambio en la apariencia o forma de las heces

50

Lo siguiente apoya acumulativamente el diagnóstico de IBS:

- frecuencia de defecación anormal
- forma anormal de las heces
- eliminación de heces anormales
- eliminación de mucosa

55

Criterios de Roma III del Síndrome de Colon irritable

60 Criterio diagnóstico *

Dolor abdominal recurrente o molestias ** al menos 3 días/mes en los últimos 3 meses asociados con uno o más de los siguientes:

- Mejoran con la defecación
- Aparición asociada con un cambio en la frecuencia de defecación

65

- Aparición asociada con un cambio en la forma (apariciencia) de las heces

* Criterio cumplido durante los últimos 3 meses con aparición de síntomas al menos 6 meses antes del diagnóstico

5 ** “Molestias” significa una sensación molesta no descrita como dolor. En investigación patofisiológica y ensayos clínicos, una frecuencia de dolor/molestias de al menos 2 días a la semana durante la exploración de evaluación se recomienda para la elegibilidad del sujeto.

10 “Tratamiento” de IBS – como se utiliza en el presente documento en el contexto específico de IBS, el término “tratamiento” se refiere a una mejora en uno o más síntomas asociados con IBS. Esto se puede medir en términos de valoración de síntomas para una mejora en la calidad de vida o una mejora del índice de gravedad de los síntomas de IBS (es decir, la reducción de la gravedad de los síntomas), o ambos.

15 “Carbohidratos complejos” – como se utiliza en el presente documento la expresión “carbohidratos complejos” incluye tanto oligosacáridos como polisacáridos. “Oligosacáridos” son polímeros de sacáridos que contienen de 3 a 10 unidades de sacárido; mientras que el término “polisacáridos” incluye estructuras poliméricas más largas, tales como las formadas por unidades de sacáridos (o disacáridos) repetidas.

20 “Azúcares simples” – como se utiliza en el presente documento la expresión “azúcares simples” se refiere a monosacáridos y disacáridos a menos de que se establezca otra cosa.

25 “Azúcares reductores” – como se utiliza en el presente documento, la expresión “azúcares reductores” se refiere a azúcares que tienen un grupo aldehído o son capaces de formar un grupo aldehído en solución mediante isomerización. La presencia de azúcares reductores se puede determinar mediante el método de Nelson-Somogyi utilizando glucosa como referencia convencional (Somogyi, M. (1952) Journal of Biological Chemistry., Vol. 195., p. 30 19; reproducido en muchos libros de texto convencionales de química de carbohidratos). Aunque ciertos carbohidratos complejos (por ejemplo, los almidones) pueden contener extremos reductores, y por lo tanto cumplen la definición de “azúcares reductores”, una determinación del contenido de “azúcares reductores”, en una muestra determinada (por ejemplo, una muestra de una preparación probiótica como se describe en el presente documento) utilizando el método de Nelson-Somogyi puede tomarse como una aproximación de la cantidad de azúcares simples en la muestra, aunque los azúcares simples contengan una mayor proporción de extremos reductores por unidad de peso que los carbohidratos complejos.

35 “Contenido total de carbohidratos” – como se utiliza en el presente documento, las expresiones “carbohidratos totales” o “contenido total de carbohidratos” se refiere a la cantidad total de carbohidratos complejos y azúcares simples presentes en un producto determinado (por ejemplo, en una preparación probiótica como se describe en el presente documento). El contenido total de carbohidratos se puede medir utilizando un ensayo de ácido sulfúrico-fenol, utilizando glucosa como referencia convencional (Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) Analytical Chemistry, vol. 28., p. 350).

40 Cuando se hace referencia en el presente documento a la relación de contenido total de carbohidratos respecto a contenido de azúcares reductores de un producto basado en un líquido (por ejemplo, en una preparación probiótica) esta se va a determinar calculando la relación del contenido total de carbohidratos del producto, medido por el método de ácido sulfúrico-fenol descrito en el presente documento (con el resultado expresado en mg/ml), respecto al contenido de azúcares reductores del producto, medido por el método de Nelson-Somogyi descrito en el presente documento (con el resultado expresado en mg/ml).

50 “No lácteo” – como se utiliza en el presente documento la expresión “no lácteo” se refiere a productos que no contienen y no se basan en leche de un mamífero. En consecuencia, los productos no lácteos no contienen y no se basan en leche, mantequilla, queso (incluyendo queso vegetariano), yogur, nata, leche en polvo, suero de leche, lactosa, lactoproteínas (incluyendo caseínas y caseinatos), grasa de leche anhidra o kéfir.

Cepas bacterianas probióticas

55 Las bacterias probióticas incluidas en la preparación probiótica comprenden al menos las especies seleccionadas de entre el grupo que consiste en: *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus*.

60 La referencia a *Lactobacillus casei* pretende incluir cualquier cepa bacteriana clasificada originalmente como *Lactobacillus casei* pero re-clasificada ahora como *Lactobacillus rhamnosus*. En consecuencia, la referencia a *Lactobacillus rhamnosus* puede incluir cepas bacterianas que se habían clasificado previamente como *Lactobacillus casei*. Se utiliza una combinación de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* o ambos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*.

65 El producto Symprove™ (que contiene *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* ha demostrado que es particularmente eficaz en la reducción de la gravedad de los

síntomas de IBS, y también que mejora las valoraciones de calidad de vida en pacientes de IBS, en el estudio clínico descrito en el presente documento. La cepa de *Lactobacillus casei* en el Symprove™ se caracterizó originalmente como *Lactobacillus casei* pero ahora se ha re-clasificado como que está estrechamente relacionada con *Lactobacillus rhamnosus*.

Un factor clave para conseguir una eficacia terapéutica en el tratamiento del IBS, como se mide por la reducción en la gravedad de los síntomas de IBS según el índice de gravedad de síntomas de IBS, es la capacidad para suministrar una alta cantidad de bacterias probióticas metabólicamente activas viables en el tracto gastrointestinal del paciente que se somete a tratamiento. Con el fin de conseguir esto, en realizaciones ejemplares, la población total de bacterias metabólicamente activas de la preparación probiótica puede estar en el intervalo de desde $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro, preferentemente en el intervalo de desde $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro. Cada cepa individual de bacterias metabólicamente activas presentes en la preparación probiótica puede estar presentes en el intervalo de desde $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro, más preferentemente en el intervalo de desde $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro.

En el caso de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* o ambos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*, se prefiere que el menos uno y preferentemente cada una de estas cepas estén presentes en el intervalo de desde $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro, preferentemente en el intervalo de desde $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro.

La población de *L. acidophilus*, puede ser menor de $1,0 \times 10^5$ células viables por mililitro.

En una realización ejemplar, la preparación puede comprender una combinación de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* o ambos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*, donde la cantidad de bacterias de cada una de estas cepas bacterianas está en el intervalo de desde $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro, más preferentemente en el intervalo de desde $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro, y contiene adicionalmente *Lactobacillus acidophilus*. La población de *L. acidophilus* puede ser menor de $1,0 \times 10^5$ células viables por mililitro.

Aunque la cantidad total de bacterias en la preparación descrita en el presente documento puede parecer que es más baja que la de las preparaciones probióticas típicas secadas por congelación, es importante señalar que las bacterias son viables. Como se señaló en otra parte del presente documento, se cree que la naturaleza viable de las bacterias en la preparación probiótica descrita en el presente documento y que han demostrado ser eficaces en el tratamiento del IBS les permite establecerse más rápidamente en el tracto gastrointestinal de un paciente, quizá a los 15 a 20 minutos de la ingestión. Se cree que dicho establecimiento rápido contribuye a los efectos beneficiosos de la preparación en el tratamiento del IBS.

Otra ventaja clave de la preparación probiótica descrita en el presente documento, y que ha demostrado ser útil en el tratamiento del IBS, es que las cepas probióticas son significativamente más estables a pH 3 que los productos probióticos de propiedad basados en leche o secados por congelación, y por lo tanto será más probablemente capaz de tolerar las duras condiciones que se encuentran en el tracto GI humano. En particular, se ha demostrado que las bacterias probióticas descritas en la preparación del presente documento son estables tanto a pH 6 como a pH 3. En realizaciones ejemplares las bacterias probióticas de la preparación probiótica son estables cuando se mantienen en cultivo a pH 3 durante un periodo de al menos 6 horas. En este contexto "estable" se considera que significa que cuando las bacterias se cultivan a pH 3, 37 °C, en un medio de cultivo convencional (por ejemplo, en caldo MRS) durante un periodo de al menos 6 horas, el recuento bacteriano (ufc/ml) no baja más de 0,5 log₁₀ unidades por debajo del recuento bacteriano (ufc/ml) en el tiempo cero. En realizaciones específicas el recuento bacteriano debería mantenerse por encima de 10^6 ufc/ml durante al menos 6 horas cuando se cultiva a un pH 3, 37 °C, en caldo MRS convencional. De hecho, puede observarse que el recuento bacteriano aumenta cuando se cultiva en estas condiciones.

Composición de la preparación probiótica

La preparación probiótica descrita en el presente documento y que ha demostrado ser clínicamente eficaz en el tratamiento del IBS comprende bacterias probióticas metabólicamente activas viables en un sustrato líquido no lácteo. La función del sustrato es sustentar y mantener la viabilidad de las bacterias probiótica, particularmente durante el almacenamiento de la preparación, de manera que se puede mantener las bacterias probióticas, y luego suministrarse al paciente, en una forma viable, metabólicamente activa. Para conseguir este objetivo, el sustrato líquido contiene normalmente una mezcla de carbohidratos complejos y azúcares simples. En particular, el sustrato puede comprender una mezcla de polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos.

En ciertas realizaciones, la preparación probiótica se puede caracterizar por la relación de contenido total de carbohidratos respecto al contenido de azúcares reductores de la preparación, que refleja la mezcla compleja de polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos presentes. En realizaciones ejemplares, la relación de contenido total de carbohidratos respecto al contenido de azúcares reductores de la preparación está en el intervalo de desde 8:1 a 2:1, más típicamente en el intervalo de desde 5:1 a 2,5:1, o en el intervalo de desde 4:1 a 3:1. Los

medios de medición del contenido total de carbohidratos y contenido de azúcares reductores, y el cálculo de la relación entre ellos, se ha definido anteriormente.

5 En realizaciones adicionales ejemplares de la preparación probiótica, el contenido total de carbohidratos de la preparación puede estar en el intervalo de desde 20 ng/ml a 40 ng/ml, o en el intervalo de desde 20 mg/ml a 30 mg/ml y el contenido total de azúcares reductores puede estar en el intervalo de desde 5 mg/ml a 20 mg/ml, o en el intervalo de desde 5 mg/ml a 10 mg/ml.

10 La preparación probiótica comprende también preferentemente componentes proteicos y peptídicos. Normalmente la cantidad total de proteínas y péptidos presentes en la preparación probiótica está en el intervalo de desde 1 mg/ml a 2 mg/ml y la cantidad total de péptidos de alto peso molecular (de peso molecular mayor de 5000 Daltons) está en el intervalo de desde 100 µg/ml a 300 µg/ml. En una realización específica, la concentración de proteínas y péptidos puede ser aproximadamente de 2 mg/ml y la concentración de péptidos de alto peso molecular puede ser aproximadamente de 250 µg/ml.

15 La preparación probiótica puede contener componentes adicionales tales como, por ejemplo, celulosa, almidón, β-glucanos, pentosanós, polifenoles, ácidos ribonucleicos, lípidos, fosfatos, flavonoides, aminoácidos, vitaminas (B₁, B₂, C y E), silicatos y elementos traza.

20 La preparación probiótica puede comprender un extracto de cebada germinada que contiene las cepas bacterianas probióticas.

25 Una realización ejemplar de la preparación probiótica comprende un extracto de cebada germinada y una combinación de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* o ambos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*, donde el recuento bacteriano de cada una de estas cepas bacterianas está en el intervalo de desde $1,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro, más preferentemente en el intervalo de desde $1,0 \times 10^7$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro, y contiene adicionalmente *Lactobacillus acidophilus*.

30 Se pueden añadir componentes adicionales a la preparación probiótica, tales como saborizantes y/o colorantes, para mejorar la palatabilidad en pacientes humanos.

35 El pH de la preparación puede controlarse convenientemente por la adición de un tampón adecuado o una combinación de agentes tampón. Los tampones preferidos incluyen, por ejemplo, citrato tri-sódico o tampones fosfato. El pH de la preparación basada en líquido que se describe en el presente documento se mantienen normalmente en el intervalo de desde 3,8 a 4,5, y en particular a un pH de aproximadamente 4,0, durante el almacenamiento a largo plazo. La preparación probiótica se puede almacenar a cualquier temperatura desde 4 °C hasta una temperatura ambiente (de aproximadamente 25 °C). El producto Symprove™ descrito en el presente documento ha demostrado que se mantienen estable (en términos de recuento bacteriano) durante un periodo de al menos 6 meses cuando se almacena a aproximadamente 4 °C, y durante al menos 4 meses cuando se almacena a 25 °C.

45 La preparación puede comprender adicionalmente un agente anti-fúngico, tal como por ejemplo, sorbato potásico esterilizado y/o un anti-oxidante, tal como la vitamina C.

En una realización preferida, el sustrato de cultivo puede contener material particulado, por ejemplo, partículas que no excedan 1 mm de diámetro.

50 La realización más preferida de la preparación probiótica, que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del IBS en el estudio clínico descrito en el presente documento, es el producto denominado Symprove™, que contiene células metabólicamente activas, viables de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*, que se puede preparar de acuerdo con los ejemplos proporcionados en el presente documento. La cepa de *Lactobacillus casei* en el Symprove™ se caracterizó originalmente como *Lactobacillus casei* pero ahora se ha re-clasificado como el *Lactobacillus rhamnosus* estrechamente relacionado.

55 El producto Symprove™ está basado en agua, con un contenido típico de agua de aproximadamente un 95 % (v/v). El alto contenido en agua es ventajoso ya que puede dar como resultado que el producto se perciba en el sistema GI humano como una bebida más que como una "comida", evitando así que se desencadene la digestión.

60 La preparación probiótica también puede estar libre de lactosa, ya que no está basada en leche, y libre de gluten. En particular el producto Symprove™ ha demostrado que cumple los criterios aceptados para la clasificación como "libre de gluten" basados en ELISA de Gliadina. Los lotes del producto contienen típicamente menos de 10 ppm de gluten cuando se miden por ELISA de Gliadina.

65

Tratamiento del IBS

Preferentemente, el tratamiento del Síndrome de Colon Irritable comprende la mejora de los síntomas asociados con la afección. Por lo tanto, el tratamiento del IBS puede incluir la mejora de uno o más de dolor estomacal, dolores cólicos de estómago, diarrea, estreñimiento o hinchazón. El tratamiento de IBS incluye el tratamiento de ambas formas de la afección dominante en diarrea y dominante en estreñimiento. Como se demuestra en el presente documento, el tratamiento de los pacientes con IBS establecida, incluyendo los individuos con un diagnóstico de acuerdo con los criterios de Roma III en los que han fallado los tratamientos de primera y segunda línea, puede dar como resultado una mejoría significativa de la gravedad de los síntomas de IBS.

La dosificación precisa dependerá de muchos factores, no solo el mínimo de la gravedad de una afección del paciente individual. La dosis más apropiada puede determinarla un médico encargado y en general debería ser una dosis que dé como resultado un efecto beneficioso, por ejemplo, una mejora de los síntomas del IBS. Normalmente, la dosificación del producto Symprove™ que se prepara de acuerdo con los ejemplos podría ser de 1 ml/kg de peso corporal por día o 50 ml por día para un paciente adulto. La frecuencia y la duración del tratamiento variarán de un paciente a otro. Un periodo de tratamiento típico es de 12 semanas, pero el periodo puede ser más largo o más corto. Normalmente, la frecuencia de dosificación será diariamente, aunque también se pueden utilizar otras frecuencias de dosificación.

En una realización, el Síndrome de Colon Irritable es un Síndrome de Colon Irritable clasificado por Roma III. En otra realización preferida, el paciente que necesita tratamiento es un paciente en el que han fallado los tratamientos de primera y segunda línea.

Para el tratamiento de pacientes humanos con IBS, la preparación probiótica se administra normalmente por vía oral, por ejemplo, como una bebida. Si es conveniente, la preparación probiótica se puede incorporar a productos alimentarios o bebidas para consumo humano a condición de que no afecte la viabilidad de las bacterias en la preparación.

Para su uso en seres humanos, en el tratamiento de IBS, puede ser conveniente formular la preparación probiótica en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en una alícuota de dosis única de la preparación líquida que esté lista para beber.

La preparación probiótica que se va a utilizar en el tratamiento del IBS como se describe en el presente documento es una preparación basada normalmente en un líquido que ventajosamente no se seca por congelación.

Las preparaciones de bacterias secadas por congelación que se utilizan actualmente contienen normalmente pocas, si es que hay alguna, bacterias metabólicamente activas. Además, las preparaciones de bacterias secadas por congelación pierden algunas de sus características y actividad al rehidratarse. También, las bacterias reactivadas tienen una vida de almacenaje corta y se pueden mantener en almacenamiento solo durante un corto espacio tiempo. Las bacterias secadas por congelación a menudo no se re-hidratan para su uso en el animal huésped. Si se re-hidratan, entonces se tienen que utilizar el mismo día, de otra manera pueden tener una pérdida de viabilidad rápida y el deterioro por organismos contaminantes.

Un problema adicional con las preparaciones secadas por congelación anterior es que son higroscópicas (atraen el polvo del aire) y por lo tanto se tiene que utilizar un paquete en unos pocos días de la apertura, de otra manera la hidratación parcial producirá una pérdida rápida de viabilidad.

La preparación probiótica basada en un líquido que se proporciona en el presente documento para su uso en el tratamiento del IBS evita los problemas enumerados anteriormente asociados con el uso de cultivos bacterianos secados por congelación. Además, también se ha demostrado que los cultivos bacterianos basados en un líquido preparados como se describe en el presente documento son más robustos que las bacterias preparadas por los métodos conocidos en la técnica anterior, lo que posibilita que las bacterias se establezcan más rápidamente en los animales huéspedes y toleren el duro ambiente del tracto digestivo de los mamíferos.

Fabricación de la preparación probiótica

La preparación probiótica para su uso en el tratamiento del IBS como se describe en el presente documento, se puede preparar cultivando una o más cepas bacterianas probióticas en un sustrato de cultivo, tal como por ejemplo, un extracto de cebada germinada. El sustrato de cultivo puede prepararse comenzando con semillas de cebada o malteando la muestra utilizando el procedimiento de fabricación descrito posteriormente en el presente documento. Este método es sustancialmente como se describe en el documento WO 2006/035218.

El sustrato de cultivo se puede preparar de acuerdo con un método que comprende:

someter el cereal malteado a una etapa de macerado en el que el cereal malteado se mezcla con líquido acuoso y se somete a condiciones de tiempo y temperatura que limitan la extensión de conversión de carbohidratos

complejos en azúcares simples de manera que se obtiene una mezcla de carbohidratos complejos, azúcares simples, proteínas y péptidos; y separar la mezcla de carbohidratos complejos y azúcares sencillos, proteínas y péptidos del cereal malteado gastado para obtener un sustrato de cultivo

5 Las expresiones “cereal malteado” o “malta” como se utiliza en el presente documento se refiere al producto del procedimiento de malteado aplicado a los granos de cereal. El malteado es un procedimiento bien conocido en la técnica de la cerveza.

10 En un procedimiento típico de malteado los granos de cereal (por ejemplo, semillas de cebada o muestras de malteado) se germinan para inducir la movilización de los nutrientes almacenados. Las semillas germinadas producen varias enzimas para movilizar los almacenes de proteínas y carbohidratos, que incluyen α -amilasas que hidrolizan el almidón en maltosa. Un cereal ejemplar es la cebada, pero se pueden utilizar también otros cereales, tales como arroz, trigo, maíz y avena o incluso mezclas de los mismos. El proceso de germinación es bien conocido
15 en general. Se apreciará que el método puede llevarse a cabo proporcionando granos malteados o un sustrato sintético que comprenda una mezcla de carbohidratos, proteínas y enzimas.

Normalmente, los granos malteados se pasan por un rodillo antes de procesarlos adicionalmente. La rotura de los granos pasándolos por un rodillo facilita el acceso del agua y la extracción de nutrientes durante la etapa de macerado, mientras que evitando el aplastamiento de los granos ayuda a la separación posterior del sustrato de cultivo de los granos malteados gastados.
20

La malta preparada se somete a la etapa de macerado que se parece a la etapa de macerado utilizada en los métodos cerveceros (véase por ejemplo, Kunze, W. Technology Brewing and Malting (1996)). El término “macerado” es bien conocido en el campo de la cerveza y se refiere a un procedimiento en el que los granos se agitan en presencia de agua calentada a temperaturas determinadas con el fin de preparar un mosto. Durante la etapa de macerado los carbohidratos de los granos malteados se rompen dando lugar a maltosa.
25

El método descrito en el presente documento también implica una etapa de maceración en la que los granos de cereal malteados se mezclan con un líquido acuoso (normalmente agua) y la mezcla se calienta a temperaturas determinadas. Esta etapa de maceración, sin embargo, no es conforme al procedimiento de macerado típico de los cerveceros. Los cerveceros tienen como objetivo convertir tanto carbohidrato en azúcares simples como sea posible, para la posterior fermentación en alcohol. Por el contrario, las condiciones de la etapa de maceración descrita en el presente documento se escogen específicamente para limitar la extensión de la conversión en azúcares simples, dejando cantidades significativas de carbohidratos en formas más complejas oligoméricas y poliméricas.
30

La extensión de la conversión del carbohidrato se puede limitar de manera que la cantidad de azúcares reductores presentes en el sustrato de cultivo resultante, expresado como un porcentaje (p/p) del contenido total de carbohidratos esté en el intervalo de desde un 10 % (p/p) a un 50 % (p/p). Como se ha señalado anteriormente, el contenido de azúcares reductores medido por el método de Nelson-Somogyi es una buena aproximación de la cantidad total de azúcares simples presentes.
35

El límite de conversión deseado de azúcares complejos en simples se puede conseguir aumentando la temperatura de la etapa de maceración durante un corto periodo de tiempo, normalmente 30 minutos, sin permitir que la mezcla de granos malteados/agua repose a temperaturas intermedias. Los procesos de cerveceros tradicionales incluyen un reposo a 60-65 °C y 70-74 °C, ya que esto permite que las enzimas produzcan altas concentraciones de azúcares simples (principalmente maltosa). En consecuencia, la etapa de macerado descrita en el presente documento no comprende reposos a temperaturas en el intervalo de desde 60 °C a 65 °C y/o a temperaturas en el intervalo de desde 70 °C a 74 °C.
40

La etapa de maceración puede comprender mezclar el cereal malteado con agua a una temperatura en el intervalo de desde 30 °C a 45 °C, el reposo de la mezcla durante 1 a 2 horas, aumento de la temperatura a una temperatura en el intervalo de desde 75 °C a 85 °C durante un periodo de tiempo de desde 20 a 60 minutos, preferentemente 30 minutos, y después reposo de la muestra a una temperatura en el intervalo de desde 75 °C a 85 °C durante un periodo de tiempo en el intervalo de desde 30 a 90 minutos. A la temperatura más alta, cualquiera de las enzimas presentes en la mezcla se inactiva y se pueden extraer los nutrientes. Las temperaturas más altas en el intervalo de desde 76 °C a 80 °C y específicamente 78 °C se prefieren en general. La temperatura en esta etapa tiene que ser lo suficientemente alta durante un periodo lo suficientemente largo para inactivar todas las enzimas presentes en la preparación. Se apreciará que la temperatura precisa y los tiempos que se utilizan pueden variar de alguna manera de acuerdo con el tipo de cereal que se utilice.
45
50
55
60

El procedimiento descrito en el presente documento limita específicamente la cantidad de conversión de azúcares complejos en azúcares simples. Además, el reposo inicial a una temperatura en el intervalo de 30 °C a 45 °C proporciona una ventaja adicional ya que maximiza la liberación de aminoácidos y péptidos. Las temperaturas hacia el extremo más alto de este intervalo, es decir, desde 40 °C a 45 °C o específicamente aproximadamente 45 °C se prefieren en general. El fin de esta etapa es hidrolizar las proteínas almacenadas presentes en los granos de
65

cereales en aminoácidos y péptidos disponibles. La combinación óptima de tiempo y temperatura para conseguir la hidrólisis deseada puede variar de alguna manera dependiendo del tipo de granos utilizado.

La presencia de altas concentraciones de proteínas, péptidos y aminoácidos es deseable en un sustrato de cultivo que se va a utilizar para sustentar el crecimiento de microorganismos ya que proporciona una fuente útil de nitrógeno. Los procedimientos de macerado típicos que se utilizan en la fabricación de cerveza tradicional no incluirían en general un reposo a una temperatura en este intervalo, ya que los cerveceros normalmente no buscan conseguir un alto contenido en proteínas o aminoácidos en un mosto que se pretende para la fermentación para producir alcohol.

Cuando se completa la etapa de maceración, por ejemplo, cuando se han extraído todos los nutrientes deseados de los ahora granos malteados "gastados", la mezcla resultante que comprende carbohidratos complejos y azúcares simples, proteínas y péptidos se puede separar de los granos gastados para obtener un sustrato de cultivo utilizando medios adecuados. Normalmente, esto implica la filtración grosera, por ejemplo utilizando un filtro de 1 mm tal como una cesta de hilo trenzado, dando lugar a una solución que contiene partículas gruesas. Una característica del procedimiento descrito en el presente documento es que el sustrato de cultivo no se clarifica, lo que sería en general el caso de del mosto preparado durante la fabricación de cerveza tradicional. En la fabricación de cerveza tradicional el mosto se clarifica en general para retirar todas las partículas groseras, produciendo de esta manera un líquido claro.

La presencia de alguna materia particulada en un sustrato de cultivo que se prepara de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento es ventajosa con respecto al uso posterior en el sustento del crecimiento de bacterias ya que proporciona tanto nutrientes de liberación lenta como superficies particuladas para la adhesión de los cultivos bacterianos.

Si fuera necesario, el sustrato de cultivo que se prepara de acuerdo con el procedimiento descrito en el presente documento se puede esterilizar antes de su uso posterior. Como se apreciará esto se puede llevar a cabo cocinando durante una hora o por autoclave a 120 °C durante aproximadamente 20 minutos.

Se puede añadir un tampón o varios componentes tampón al sustrato de cultivo si es necesario. Los tampones preferidos son tampones de citrato tri-sódico, o fosfato. Si el sustrato de cultivo se va a esterilizar, el tampón(es) se puede añadir antes, durante o después de la esterilización como sea conveniente.

El sustrato de cultivo preparado se inocula con las cepas bacterianas probióticas deseadas y se cultivaron hasta que alcanzaron el recuento bacteriano deseado necesario para la preparación probiótica. En una realización específica, las bacterias probióticas se cultivan en el sustrato de cultivo hasta que alcanzan una concentración de entre 1×10^6 y 1×10^9 unidades formadoras de colonias por mililitro. En este punto el cultivo (o la fermentación) se puede enfriar hasta aproximadamente 4 °C y la combinación de temperatura, pH, fase de crecimiento y composición de sustrato residual proporciona las condiciones de equilibrio que permiten el mantenimiento de un estado de crecimiento cerca del equilibrio durante el almacenamiento a largo plazo. En este estado cercano al equilibrio, que se puede mantener durante un periodo de al menos 5-6 meses, se mantiene la población de bacterias probióticas metabólicamente activas, normalmente en un intervalo de 10^6 a 10^9 células viables por mililitro. Se apreciará que el número preciso de células viables en un estado cercano al equilibrio puede variar de alguna manera dependiendo de las especies de bacterias probióticas utilizadas. Normalmente, que el recuento bacteriano (ufc/ml) sea "estable" significa que no varían más de 1 unidad de \log_{10} , o más preferentemente más de 0,5 unidades \log_{10} , cuando el producto se almacena a 4 °C durante 5 meses y/o cuando se almacenan a 25 °C durante 4 meses.

El método de fabricación implica una etapa de cultivo en el que las bacterias probióticas se cultivan en un sustrato de cultivo hasta que alcanzan una concentración que hace posible que se consiga la condición cercana al equilibrio durante el almacenamiento posterior. Una característica importante del método es que el sustrato que se utiliza proporciona un suministro equilibrado de nutrientes que contiene una mezcla de carbohidratos complejos y azúcares simples donde una alta proporción del contenido de carbohidratos está en forma de carbohidratos complejos que se pueden utilizar como fuente de energía por las bacterias probióticas. Esta mezcla ayuda a limitar la energía disponible inmediata durante la etapa de cultivo. La composición y las características preferidas del sustrato de cultivo es/son preferentemente como se ha descrito anteriormente. El sustrato de cultivo se prepara preferentemente de granos de cereales malteados utilizando el método de fabricación descrito en el presente documento, y es normalmente un extracto de cebada germinada. Se apreciará, sin embargo, que no es estrictamente necesario utilizar un sustrato de cultivo preparado de acuerdo con este método. Se pueden conseguir resultados similares utilizando un sustrato de cultivo preparado sintéticamente mezclando las proporciones necesarias de carbohidratos complejos y azúcares simples, proteínas y péptidos.

La etapa de cultivo se debe llevar a cabo de tal manera que se tenga cuidado de no cultivar bacterias durante mucho tiempo, para evitar la producción de condiciones acidas que inhibirían de otra manera el crecimiento posterior así como limitaría el periodo de almacenamiento de la preparación resultante. Por otra parte, si la etapa de cultivo se termina prematuramente, esto limitará la producción de biomasa. El pH de la preparación durante el cultivo de las bacterias probióticas se puede utilizar como un indicador del estado cercano al equilibrio. En una realización típica,

los cultivos de bacterias acidolácticas se pueden cultivar hasta que se alcanza un pH de 4,5 +/- 0,3 unidades.

Se apreciará que el pH del sustrato de cultivo puede variar de alguna manera dependiendo del intervalo de pH óptimo de la bacteria probiótica que se utilice. En una realización típica (adecuada para bacterias acidolácticas) el pH se debería mantener en el intervalo de desde 3,8 a 4,5 durante el almacenamiento. Se añaden preferentemente tampones, tales como de citrato tri-sódico y fosfatos al sustrato de cultivo para controlar el pH durante el crecimiento de la bacteria probiótica y el almacenamiento posterior.

Se apreciará que el tiempo exacto de la etapa de cultivo de la bacteria probiótica hasta un estado cercano al equilibrio depende de la especie utilizada. El cultivo de las bacterias probióticas se puede llevar a cabo en cualquier aparato de cultivo adecuado. En realizaciones específicas la etapa de cultivo se puede llevar a cabo mediante la fermentación en un matraz de fermentación. Las bacterias probióticas utilizadas son bacterias acidolácticas de los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*, y mezclas de los mismos, como se ha descrito anteriormente. Si dichas especies se van a cultivar utilizando un medio de cultivo "convencional" que consista en muchos azúcares simples fermentables el exceso de suministro de energía daría lugar a un exceso de la producción de ácido por las bacterias acidolácticas, que limitaría la producción de biomasa y la vida de almacenamiento del cultivo resultante. Por el contrario, la mezcla de carbohidratos complejos y azúcares simples presentes en el sustrato de cultivo utilizado en el método de fabricación descrito en el presente documento suministra la energía para el crecimiento en la etapa inicial de cultivo y también para el mantenimiento durante el almacenamiento del producto.

La etapa de cultivo se puede llevar a cabo utilizando una única especie de bacteria probiótica, y se pueden cultivar dos o más especies bacterianas independientemente en medios de cultivo separados y luego mezclarlas antes o después de la etapa de enfriamiento. Los sustratos de cultivo utilizados para el cultivo independiente de dos o más especies bacterianas diferentes pueden ser de la misma o diferente composición. Por tanto, es posible optimizar las condiciones de cultivo para los cultivos de especies bacterianas individuales y luego combinar los cultivos para el almacenamiento en condiciones que permitan el mantenimiento del crecimiento en equilibrio para cada una de las especies individuales en el cultivo.

En otros métodos de fabricación, se pueden cultivar dos o más especies bacterianas diferentes en un único cultivo en el mismo sustrato de cultivo, a condición de que sus tasas de crecimiento sean comparables de manera que una especie no domine la población.

A continuación de la etapa de cultivo, la preparación probiótica se puede analizar por métodos convencionales para determinar la pureza microbiológica y el recuento de bacterias probióticas. También es posible cultivar dos o más combinaciones diferentes de bacterias probióticas juntas en sustratos de cultivo separados y luego combinar los cultivos en una preparación probiótica final. Un cultivo de combinación se podría mezclar de manera similar con un cultivo de especies bacterianas únicas.

Los cultivos de partida para la etapa de cultivo del método incluyen, por ejemplo, bacterias secadas por congelación o cultivos líquidos.

Se apreciará que la preparación probiótica se puede utilizar inmediatamente pero más habitualmente la preparación se almacenará antes de su uso. La temperatura óptima para el almacenamiento con el fin de mantener el estado de crecimiento cercano al equilibrio en los cultivos es aproximadamente de 4 °C pero el lector experto apreciará que la temperatura podría variar de alguna manera. Como se ha señalado anteriormente, la preparación probiótica es estable durante al menos 4 meses incluso cuando se almacena a temperatura ambiente (a aproximadamente 25 °C). Por conveniencia, se pueden dispensar alcuotas de la preparación probiótica producida por el método en un envase estéril adecuado antes del almacenamiento a largo plazo.

Es una ventaja clave de la preparación descrita en el presente documento que el producto mantiene la viabilidad e integridad [de las bacterias probióticas] cuando se almacena por periodos extensos, normalmente durante al menos 5 o 6 meses. Sin embargo, se apreciará que no es esencial para el método que la preparación probiótica se tenga que almacenar actualmente durante 5-6 meses antes de su uso.

Para evitar el crecimiento de hongos o levaduras, se puede añadir un agente antifúngico tal como sorbato potásico estéril, antes del almacenamiento de la preparación probiótica. Los agentes antifúngicos son en primer lugar para evitar el deterioro por levaduras u hongos durante el uso por los usuarios finales, una vez que el envase del producto se ha abierto. Además, se puede añadir un antioxidante, por ejemplo, vitamina C para ayudar a prevenir el deterioro del producto durante el almacenamiento. Se apreciará que también se pueden utilizar otros agentes bien conocidos en la técnica como agentes antifúngicos o antioxidantes.

Un método alternativo de producción de la preparación probiótica que no necesita una etapa de cultivo activa implica simplemente inocular el sustrato de cultivo (por ejemplo, el extracto de cebada germinada preparado como se describe en el presente documento) con un cultivo(s) de bacterias probióticas. Los cultivos de partida para el método incluyen, por ejemplo, bacterias secadas por congelación o cultivos líquidos. El sustrato de cultivo se puede inocular con una o más especies bacterianas. Preferentemente, la concentración de las células viables en el cultivo de

partida es un exceso de 10^6 células viables por mililitro.

La invención se entenderá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos experimentales no limitantes:

5 **Ejemplo 1. Producción de un sustrato de cultivo, utilizando un medio basado en cebada**

(A) Germinación (malteado)

Día 1

10 La cebada (semillas o granos de una muestra malteada) se empaparon con agua durante 2 a 24 horas, dependiendo del lote del grano. Se puede incluir en el agua un 0,1 % (p/v) de hipoclorito sódico (lejía) para inhibir el crecimiento de contaminantes durante la fase de germinación. Después de 4 horas, el agua se drena de los granos y se dejan los granos en reposo a temperatura ambiente de 10 a 30 °C durante aproximadamente 1 día.

15 Día 2

20 Los granos se empapan en agua limpia durante otro periodo de 4 horas. Se puede añadir al agua peróxido de hidrógeno (un 0,1 % p/v) para este y los remojos posteriores. El peróxido de hidrógeno proporciona oxígeno a los granos geminados, y actúa como un desinfectante. De manera alternativa, se puede utilizar hipoclorito sódico. Después de 4 horas, se drena el agua de los granos y se dejan los granos en reposo durante aproximadamente 1 día. El agitado ocasional (por ejemplo, cada 4 horas) de los granos puede mejorar la germinación aumentando el intercambio gaseoso, proporcionando oxígeno y retirando el dióxido de carbono.

25 Día 3 en adelante

30 El ciclo de empapado, drenaje y reposo se continúa hasta que las raicillas que emergen de los granos en germinación tiene 2 a 4 mm de longitud. Este estado de crecimiento indicaba que los granos habían producido enzimas para la movilización de nutrientes almacenados. Estas enzimas son centrales para la producción posterior del medio de cultivo, durante el 'macerado'. Se podría permitir una modificación más extensa de los granos, dejando la fase de germinación hasta que las raicillas tienen varios milímetros de longitud. Sin embargo demasiado crecimiento simplemente convertirá los nutrientes en raíces y brotes vegetales, que no se pueden utilizar en la fermentación.

35 **(B) Paso del rodillo**

40 Cuando los granos habían germinado suficientemente, se molieron con una moladora de rodillo. El molido se ajustó de manera que los granos se abran por rotura pero no se destruyan ni se aplanen completamente. La rotura de los granos permite el acceso del agua y la extracción de nutrientes durante el macerado, mientras que evitando la destrucción de los granos ayuda en las etapas de filtración.

(C) Preparación de un sustrato de cultivo

45 Los granos geminados molidos, se mezclaron con agua suficiente para cubrirlos, a 45 °C, y se dejó la mezcla a 45 °C durante 1 hora.

Después de 1 hora a 45 °C, la temperatura se aumentó hasta 78 °C durante un periodo de 30 minutos.

50 Se permitió que la muestra reposara a 78 °C durante 1 hora. Después del reposo a 78 °C, los granos gastados se separaron por filtración. Se utilizó un filtro relativamente grueso (por ejemplo, una cesta de hilo trenzado de 1 mm de hueco) dando lugar a una solución que contenía cantidades significativas de sólidos suspendidos. Los granos gastados se desecharon y el líquido se trató entonces por calor para pasteurizarlo o esterilizarlo. En este experimento particular el líquido se coció durante 45 minutos. Se añadió entonces un tampón (un 0,5 % (p/v) de citrato tri-sódico) y la mezcla se coció durante 15 minutos adicionales para dar lugar al sustrato de cultivo final.

55 **Ejemplo 2: Análisis del sustrato de cultivo**

(a) Análisis de carbohidratos:

60 El contenido total de carbohidratos se determinó utilizando el ensayo de ácido sulfúrico-fenol, con glucosa como referencia convencional (Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956) Analytical Chemistry, vol. 28., p. 350).

65 Los azúcares reductores se determinaron utilizando el método de Nelson-Somogyi, de nuevo con glucosa como referencia convencional (Somogyi, M. (1952) Journal of Biological Chemistry., vol. 195., p. 19). Ambos azúcares complejos y simples tienen extremos reductores, pero los azúcares simples tienen un número mayor de extremos

reductores por unidad de masa. Por lo tanto, mientras que el método de Nelson-Somogyi detecta azúcares complejos, la señal es tan baja que es insignificante. El método de Nelson-Somogyi da por lo tanto una buena aproximación del nivel de azúcares simples en una muestra.

5 Resultados:

Los azúcares totales en el sustrato están en el intervalo de 20 a 40 mg/ml (miligramos por mililitro)

Los azúcares reductores están en el intervalo de 5 a 20 mg/ml.

10

(b) Análisis de proteínas y péptidos:

La proteína total se determinó utilizando dos ensayos, con albúmina sérica bovina como referencia convencional:

- 15 (i) El reactivo Biuret (Itzhaki, R. F y Gill, D. M. (1964) Analytical Biochemistry, Vol. 9., p. 401-410.
 (ii) El método Lowry, modificado por Ohnishi y Barr. (Ohnishi, S. T. y Barr, J. K. (1978) Journal of Biological Chemistry, Vol. 193, p. 265).

20 Los péptidos con peso molecular por encima de 5000 daltons se determinaron utilizando el reactivo de Bradford (Bradford, M. M. (1976) Analytical Biochemistry, Vol. 72, p. 248-254).

Resultados:

La proteína total y los péptidos están en el intervalo de 1 a 2 miligramos por mililitro.

25

Los péptidos de alto peso molecular (mayores de 5000 daltons) están en el intervalo de 100 a 300 microgramos por mililitro.

Ejemplo 3: Producción de un cultivo bacteriano metabólicamente activo

30

(A) Fermentación

El sustrato de cultivo preparado de acuerdo con el ejemplo 1 se enfrió a 37 °C y se añadieron los cultivos bacterianos. Ejemplos de un inóculo adecuado son bacterias secadas por congelación o cultivos de partida líquidos (normalmente un 1 % (v/v) de un cultivo de una noche en caldo de nutrientes).

35

En este ejemplo se cultivaron las siguientes bacterias en dos matraces:

- 40 (i) *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*;
 (ii) Una cepa de *Lactobacillus casei* que ahora se ha re-clasificado como *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*.

45 Se llevó a cabo la fermentación durante 16-20 horas, hasta que el pH alcanzó 4,5 +/- 0,3 unidades. La mezcla de fermentación se enfrió a 4 °C y se sometió a técnicas convencionales para evaluar la calidad (para determinar la pureza y el recuento de las bacterias).

En este punto, se puede añadir sorbato potásico estéril (un 0,005 % p/v de concentración final) al caldo fermentado. Esto actúa para inhibir el crecimiento de cualquier hongo o levadura que pueda aparecer debido a contaminación durante el manejo por el usuario final. También se puede añadir vitamina C (un 0,01 % p/v de concentración final) como antioxidante.

50

A continuación de los ensayos para asegurar la calidad, se pueden mezclar diferentes lotes para dar los productos con mezclas complejas de especies bacterianas, si fuera necesario.

55 En el ejemplo que se presenta aquí, la mezcla de dos lotes de bacterias daba lugar a un producto final que contenía las bacterias *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y la cepa de *Lactobacillus casei* que se ha re-clasificado ahora como *Lactobacillus rhamnosus*.

60 Los lotes de este producto final contienen normalmente 2,3 g de carbohidratos por 100 ml, de los cuales 0,7 g son azúcares y 1,6 g son de almidón. El recuento bacteriano en el producto final es normalmente menor de $1,0 \times 10^5$ de *L. acidophilus* y normalmente al menos $1,0 \times 10^7$ de cada uno de *L. plantarum*, *E. faecium* y la cepa de *Lactobacillus casei* que ahora se ha re-clasificado como *Lactobacillus rhamnosus*.

65 Los lotes del producto final se ensayaron en cuanto a la presencia utilizando el ensayo ELISA de Gliadina y se determinó que contenían menos de 15 ppm de gluten, y más habitualmente menos de 10 ppm de gluten, satisfaciendo la definición del Codex Alimentarius de libre de gluten.

El producto Symprove™ descrito en el presente documento está disponible en el mercado en MultigerM UK Enterprises Ltd.

5 Ejemplo 4: Efectos beneficiosos de la preparación en el tratamiento del Síndrome de Colon Irritable

Un estudio de 186 pacientes con IBS clasificado como Roma III, demostraba que un producto preparado de acuerdo con el ejemplo 3 (al que se hace referencia en el presente documento como Symprove™, disponible en el mercado en MultigerM UK Enterprises Ltd.), que comprende una mezcla de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Lactobacillus casei* que ahora se ha re-clasificado como *Lactobacillus rhamnosus*, puede mejorar incluso los síntomas de IBS más graves.

Este ensayo estaba controlado por placebo, aleatorizado, con ocultación doble en un único centro que implicaba el tratamiento con Symprove™ (1 ml/kg de peso corporal) frente a un placebo durante 3 meses. Los pacientes se reclutaron de dos grandes GP prácticos de Londres y de las referencias de los GP al Departamento del King's College Hospital, Londres. En todos los pacientes habían fallado los tratamientos de primera y segunda línea convencionales para los GP. Se exploraron 391 pacientes iniciales para el ensayo y 186 eran elegibles y consintieron al ensayo (cumplían los criterios de ROMA III, exclusión de enfermedad orgánica por extensa investigación incluyendo permeabilidad intestinal, calprotectina fecal, endoscopia, endoscopia de cápsula sin cables, colonoscopia y radiología cuando estaba indicada). Utilizando un protocolo de aleatorización por computadora de dos estadios, simple no estratificado (el generador de números pseudo-aleatorio tornado Mersenne) 124 recibieron el tratamiento activo y 62 el placebo. La medición del resultado principal era la reducción de la valoración de gravedad de síntomas de IBS (IBS-SSS) a los 3 meses. Todos los pacientes eran sintomáticos con una IBS-SSS > 150.

No había diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento con respecto a los detalles demográficos (relación masculino/femenino, edad media, duración de la enfermedad o tratamientos previos). No había diferencias significativas ($p > 0,1$) en las valoraciones IBS-SSS pre-tratamiento entre los pacientes tratados con el activo 303 ± 68 de la media \pm SD) y el placebo (306 ± 80) ($p = 0,841$). Durante la última semana de tratamiento (la semana 12) había una mejora mayor estadísticamente significativa ($p < 0,027$) en la media de IBS-SSS (230 ± 109) en los pacientes tratados con Symprove™ en comparación con el placebo 270 ± 103). El número de salidas durante el estudio no se diferenciaba significativamente entre los 2 grupos y no fueron evidentes eventos adversos graves.

Los datos recopilados de este estudio dirigido por investigadores con doble ocultación utilizando un comparador enmascarado, demuestra una mejoría estadísticamente significativa en la gravedad de los síntomas de IBS (pre-ensayo frente a las dos últimas semanas de tratamiento; medida por el índice de gravedad de síntomas de IBS) con el producto preparado de acuerdo con el ejemplo 3 (al que se hace referencia en el presente documento como Symprove™) cuando se comparaba con el placebo ($p = 0,012$). El estudio era más robusto que la mayoría de otros estudios de probióticos en IBS, e implicaba un periodo de tratamiento de 3 meses en pacientes con IBS en los que habían fallado los tratamientos de primera y segunda línea y en los que los síntomas eran suficientemente graves para que los GP los refirieran al hospital. Esos pacientes constituyen el tope del 1 % de gravedad de síntomas.

El éxito de este ensayo indica que la patología subyacente del IBS – cualquiera que sea su naturaleza exacta – se afrontó por tratamiento con el producto del ejemplo 3.

45 Ejemplo 5: Comparación del producto del ejemplo 3 con otros probióticos a pH fisiológico

Se compararon un producto probiótico secado por congelación multi-cepa de propiedad (al que se hace referencia en el presente documento como MS-FD), un producto probiótico basado en leche de una única cepa (al que se hace referencia en el presente documento como SS-MB) y el producto final del ejemplo 3 (identificado en el presente documento como Symprove™, un probiótico de múltiples cepas que contiene células bacterianas metabólicamente activas, viables), inoculando un caldo MRS de pH conocido mantenido a 37 °C con cada producto de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se colocaron en placas entonces alícuotas de cada uno en gel de agar cada 30 minutos durante 6 horas, se incubaron y se llevó a cabo el recuento de las ufc.

A un pH 6 ambos probióticos de múltiples cepas alcanzaban recuentos de ufc estables, el MS-FD alcanzaba el pico a $2,2 \times 10^6$ y el Symprove™ alcanzaba $1,1 \times 10^9$ ufc sobre las seis horas, el probiótico de una única cepa (SS-MB) daba lugar a un recuento más bajo con como mucho $2,4 \times 10^6$ ufc detectable sobre las 6 horas. A un pH 3 tanto MS-FD como SS-MB presentaban un rápido descenso de los recuentos de ufc en cada punto de datos sucesivo de 30 minutos, ambos cayeron por debajo de las 1000 ufc a las 6 horas. El producto Symprove™ mantenía recuentos de ufc estables por encima de 10^6 en todos los puntos de datos con un aumento de las ufc que se volvía aparente después de 4 horas y alcanzaba $4,8 \times 10^7$ a las seis horas. Los resultados se representan en las figuras 1 y 2.

En este modelo, el producto Symprove™ era el único probiótico que demostraba la capacidad de suministrar recuentos de ufc consistentes inmediatamente después, y durante seis horas a continuación de la inoculación a dos niveles de pH fisiológicos. En este experimento, el producto Symprove™ suministraba el recuento final de ufc más alto tanto a pH 3 como a pH 6.

Referencias

F. Fonseca, C. Béal, y G. Corrieu. *J. Dairy Res.* 67 (1):83-90, 2000.

5 M. L. F. Murga, A. P. D. Holgado, y G. F. de Valdez. *Cryobiology* 36 (4):315-319, 1998.

J. Hamilton-Miller. *Lancet* 355 (9201):413-414, 2000.

Kunze, W. *Technology Brewing and Malting* (1996)

10

Diarrea y estreñimiento

T. Arvola, K. Laiho, S. Torkkeli, H. Mykkänen, S. Salminen, L. Maunula, y E. Isolauri. *Pediatrics* 104 (5):L1-L4, 1999.

15

R. Bennet, S. L. Gorbach, B. R. Goldin, T. W. Chang, B. E. Laughon, W. B. Greenough, y J. G. Bartlett. *Nutrition Today* 31 (6):35S-38S, 1996.

20

A. Bomba, R. Nemcová, S. Gancarcíková, R. Herich, y R. Kastel. *Adv.Exp.Med.Biol.* 473:185-190, 1999.

N. M. De Roos y M. B. Katan. *Am.J.Clim.Nutr.* 71 (2):405-411, 2000.

25

H. L. DuPont. *J.Pediatr.* 134 (1):1-2, 1999.

S. L. Gorbach. *Am.J.Gastroenterol.* 95 (1):S2-S4, 2000.

30

M. Heyman. *J.Am.Coll.Nutr.* 19 (2):137S-146S, 2000.

E. Isolauri, M. Kaila, H. Mykkanen, W. H. Ling, y S. Salminen. *Dig.Dis.Sci.* 39 (12):2595-2600, 1994.

R. A. Oberhelman, E. H. Gilman, P. Sheen, D. N. Taylor, R. E. Black, L. Cabrera, A. G. Lescano, R. Meza, y G. Madico. *J.Pediatr.* 134 (1):15-20, 1999.

35

R. D. Rolfe. *J.Nutr.* 130 (2):396S-402S, 2000.

J. Saavedra. *Am.J.Gastroenterol.* 95 (1):S16-S18, 2000.

40

C. Scarpignato y P. Rampal. *Chemotherapy* 41 ((supl 1)):48-81, 1995.

A. V. Shornikova, I. A. Casas, H. Mykkänen, E. Salo, y T. Vesikari. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 16 (12):1103-1107, 1997.

J. A. Vanderhoof, D. B. Whitney, D. L. Antonson, T. L. Hanner, J. V. Lupo, y R. J. Young. *J.Pediatr.* 135 (5):564-568, 1999.

45

Síndrome de Colon Irritable

P. Brigidi, B. Vitali, E. Swennen, G. Bazzocchi, y D. Matteuzzi. *Res.Microbiol.* 152 (8):735-741, 2001.

50

K. Niedzielin, H. Kordecki, y B. Birkenfeld. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* 13 (10):1143-1147, 2001.

S. Nobaek, M. L. Johansson, G. Molin, S. Ahme, y B. Jeppsson. *Am.J.Gastroenterol.* 95 (5):1231-1238, 2000. Documento WO2007/036230

Revisión general:

55

Marteau, P. y Rambaud, J-C, (1996) 'Therapeutic applications of probiotics in humans' in Leeds, A. R. y Rowland, I. R. (eds.) *Gut flora and health - past, present and future*, Royal Society of Medicine Press Limited, London. Stark, B. A. y Wilkinson, (eds.) (1989) *Probiotics. Theory and Applications*, Chalcombe Publications, Bucks, UK. 21

60

Composiciones probióticas

Documento WO2006/035218

65

Documento WO2011/078781

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación probiótica que comprende bacterias probióticas metabólicamente activas, viables en un sustrato líquido no lácteo, para su uso en el tratamiento del Síndrome de Colon Irritable, donde la preparación probiótica comprende una mezcla de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* o ambos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*.
- 10 2. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la preparación probiótica comprende una mezcla de carbohidratos complejos y azúcares simples, donde la relación de contenido de carbohidratos totales respecto al contenido de azúcares reductores de la preparación probiótica está en el intervalo de desde 8:1 a 2:1.
- 15 3. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el recuento total de bacterias metabólicamente activas en la preparación está en el intervalo de desde $1,0 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^9$ células viables por mililitro.
- 20 4. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el recuento total de al menos uno de, y más preferentemente de cada uno de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* o una combinación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* en la preparación es al menos de $1,0 \times 10^6$ células viables por mililitro.
- 25 5. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 donde el recuento total de al menos uno de, y más preferentemente de cada uno de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, y *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus rhamnosus* o una combinación de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus* en la preparación es al menos de $1,0 \times 10^7$ células viables por mililitro.
- 30 6. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la preparación probiótica tiene un contenido total de carbohidratos en el intervalo de desde 20 mg/ml a 40 mg/ml y un contenido de azúcares reductores en el intervalo de desde 5 mg/ml a 20 mg/ml.
- 35 7. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende adicionalmente proteínas y péptidos, donde la cantidad total de proteínas y péptidos está en el intervalo de desde 1 mg/ml a 2 mg/ml y donde la cantidad total de péptidos de alto peso molecular está en el intervalo de desde 100 µg/ml a 300 µg/ml.
- 40 8. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde el pH de la preparación se mantiene en el intervalo de desde 3,8 a 4,5.
- 45 9. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la preparación probiótica se prepara cultivando la cepa(s) bacteriana probiótica en un extracto de cebada germinada.
- 50 10. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la preparación comprende adicionalmente un agente antifúngico preferentemente donde el agente antifúngico es sorbato potásico esterilizado.
- 55 11. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la preparación comprende adicionalmente un antioxidante preferentemente donde el antioxidante es vitamina C.
12. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento de pacientes diagnosticados con Síndrome de Colon Irritable clasificado como Roma III.
13. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en el tratamiento de pacientes diagnosticados con Síndrome de Colon Irritable en los que han fallado los tratamientos de primera y segunda línea para el Síndrome de Colon Irritable.
14. La preparación probiótica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para el tratamiento de pacientes con una valoración de gravedad de los síntomas del Síndrome de Colon Irritable mayor de 150.

Figura 1

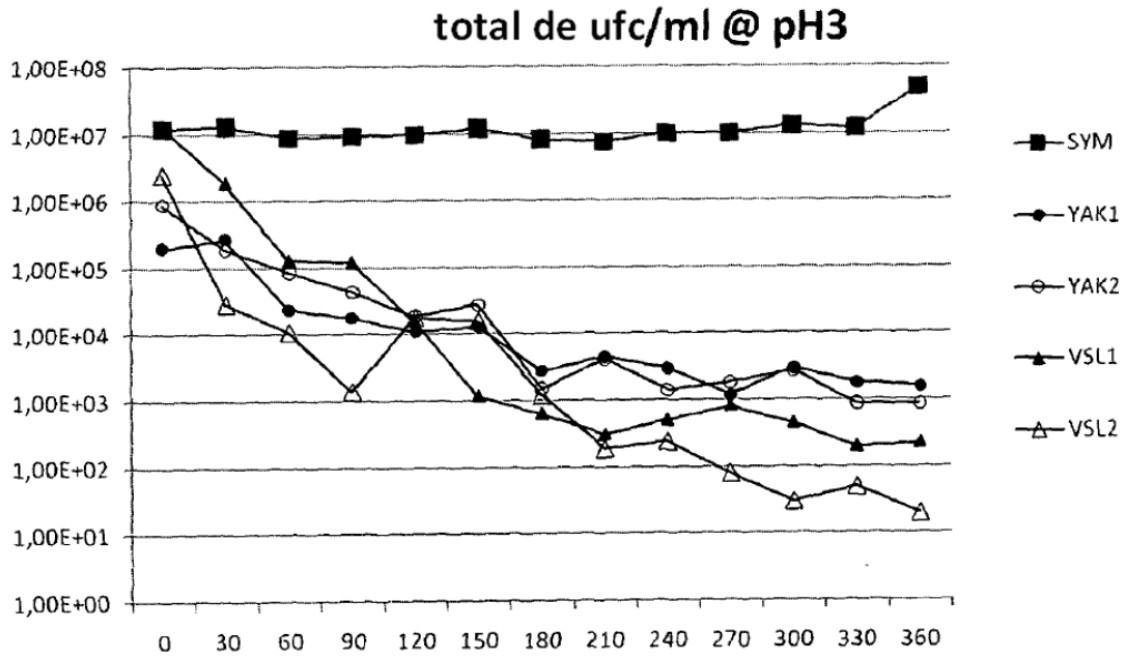


Figura 2

