

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 979**

51 Int. Cl.:

A61P 1/04 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2012 PCT/IB2012/001741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13034974**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2012 E 12780277 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019 EP 2753343**

54 Título: **Composición que comprende N-acetilcisteína y bacterias probióticas capaces de restaurar el propio efecto de barrera del estómago que se pierde durante el tratamiento de hiperacidez gástrica con inhibidores de la bomba de protones**

30 Prioridad:

09.09.2011 IT RM20110477

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

13.12.2019

73 Titular/es:

**PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)
Via E. Mattei 3
28100 Novara, IT**

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

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

ES 2 734 979 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

Composición que comprende N-acetilcisteína y bacterias probióticas capaces de restaurar el propio efecto de barrera del estómago que se pierde durante el tratamiento de hiperacidez gástrica con inhibidores de la bomba de protones

En el transcurso de las últimas pocas décadas, se han desarrollado diversos enfoques farmacológicos para el tratamiento farmacológico de hiperacidez gástrica, un estado que, si está presente en un grado marcado y durante periodos prolongados, puede dar lugar a diversas complicaciones o patologías tales como úlcera péptica y enfermedad de reflujo gastroesofágico.

Entre los fármacos más ampliamente usados están los que se basan en principios activos que pueden inhibir inhibidores del receptor de histamina H_2 tales como, por ejemplo, cimetidina, famotidina, nizatidina, ranitidina, o basados en principios activos capaces de inhibir prostaglandinas tales como, por ejemplo, misoprostol. Otra categoría de fármacos se basa en principios activos que realizan la función de protectores de la mucosa gástrica tales como, por ejemplo, sales de bismuto, sucralfato o fármacos antimuscarínicos o parasimpaticolíticos basados en pirenzepina y pipenzolato. Finalmente hay también antiácidos tales como, por ejemplo, bicarbonato de sodio, hidróxido de aluminio o hidróxido de magnesio e inhibidores de la bomba de protones basados en lansoprazol, esometazol, rabeprazol, pantoprazol y omeprazol.

Los inhibidores de la bomba de protones (PPI) son un grupo de moléculas cuya principal acción consiste en una reducción pronunciada en la acidez de los jugos gástricos durante un periodo de tiempo bastante largo (de 18 a 24 horas).

El grupo que contiene PPI es el sucesor de los antihistamínicos H_2 , y los inhibidores de PPI están más ampliamente extendidos que estos últimos debido a su mayor eficacia.

Los medicamentos mencionados anteriormente se usan en el tratamiento sintomático y etiológico de diversos síndromes, tales como: (i) dispepsia; (ii) úlcera gastroduodenal. Se usan PPI para tratar o prevenir úlceras gástricas y duodenales. También se usan en asociación con determinados antibióticos en el tratamiento de gastritis por *Helicobacter pylori*; (iii) síndrome de Zollinger-Ellison y (iv) enfermedad de reflujo gastroesofágico.

También se usan PPI en pacientes tratados con ácido acetilsalicílico a largo plazo u otros AINE. Al inhibir la función de la enzima ciclooxigenasa 1 (COX 1), estos fármacos tienen el efecto secundario de reducir la síntesis de prostaglandina, un proceso que depende de la misma enzima. Puesto que una de las funciones de la prostaglandina es la protección de la mucosa gástrica frente a la acidez, se usan PPI con el fin de reducir la acidez y proteger a la mucosa gástrica.

Este tipo de medicamento inhibe la enzima gástrica H^+/K^+ -ATPasa (la bomba de protones), que cataliza el intercambio de iones H^+ y K^+ . Esto crea una inhibición eficaz de la secreción de ácido.

En el microcanal en donde el pH es bajo, próximo a 2, estos inhibidores se ionizan y se transforman en moléculas que pueden establecer enlaces covalentes con el grupo tiol de cisteína (SH) de la subunidad de la bomba. La bomba se inhibe por tanto de manera irreversible. La renovación de la actividad de bombeo requiere la producción de nuevas bombas, un acontecimiento que requiere de 18 a 24 horas en promedio. Por tanto, una única dosis de PPI permite la inhibición de la secreción gástrica de aproximadamente 24 horas.

El hecho de que los inhibidores sean activos sólo en un entorno ácido explica cómo tienen un efecto mínimo sobre la H^+/K^+ -ATPasa extragástrica situada al nivel del recto y el colon.

En cualquier caso, aparte del mecanismo de acción específico, el efecto final de casi la totalidad de estas clases de fármacos para el tratamiento de hiperacidez gástrica, u otros estados patológicos mencionados anteriormente, es la elevación del pH gástrico según la cinética e intensidades dependientes de la molécula específica tomada y su dosificación. Una excepción, en este sentido, son las prostaglandinas y fármacos protectores para la mucosa gástrica que, en lugar de reducir la concentración de iones de hidrógeno intraluminal, aumentan la síntesis de moco e ión bicarbonato por las células de la pared gástrica, aumentando por tanto la protección de la mucosa frente a la acidez de la luz. En cualquier caso, fármacos capaces de reducir la hiperacidez gástrica constituyen el tratamiento de elección en casos de úlcera péptica o reflujo gastroesofágico, mientras que los protectores de la mucosa representan una terapia complementaria.

Se sabe, además, que la acidez gástrica normal constituye una barrera eficaz contra posibles organismos perjudiciales o patógenos ingeridos con la dieta normal. Muchos de ellos, de hecho, son particularmente sensibles a la acidez y no pueden sobrevivir durante más de cinco minutos, algunas veces incluso menos, a valores de pH por debajo de 3. Se deduce que muchos patógenos, entre ellos los que pertenecen al género *Salmonella*, no alcanzan el intestino vivos y, dejando a un lado los efectos perjudiciales sobre el organismo humano medidos por cualquier toxina secretada y ya presente en los alimentos, no son capaces de dar lugar a una infección intestinal y, por tanto, a

intoxicación alimentario avanzado.

Ha de mencionarse, sin embargo, que elevar los valores de pH gástrico normalmente encontrados en pacientes que toman fármacos para reducir o tratar la hiperacidez gástrica hace que estos pacientes estén más expuestos a infecciones tóxicas de la dieta provocadas especialmente por el consumo de alimentos crudos, particularmente pescado, carne y huevos.

Los pacientes que toman fármacos para reducir o tratar la hiperacidez gástrica, tales como inhibidores de la bomba de protones por ejemplo, tienen un valor de pH en el estómago de alrededor de 5.

Este valor de pH permite que *Enterobacteriaceae*, y cepas particulares de *E. coli* con acción descarboxilasa pronunciada, pasen a través de la barrera gástrica degradada. Las proteínas ingeridas durante la comida se degradan enzimáticamente en aminoácidos que, en presencia de acción descarboxilasa, se modifican a una serie de aminas biógenas que oscilan entre potencialmente peligrosas y altamente peligrosas tales como por ejemplo histamina, tiramina, putrescina y cadaverina. Los síntomas más comunes que pueden provocar estas aminas biógenas tienen un solapamiento completo con los efectos secundarios provocados por el uso de inhibidores de la bomba de protones (PPI), y son tal como sigue: diarrea, cefalea, náuseas, dolores abdominales y flatulencia. Cuando determinadas aminas biógenas reaccionan entonces con nitritos, se produce la formación de N-nitrosaminas. Estas nitrosaminas provocan una mutación genética a través de la alquilación del ADN, y su presencia está asociada con cáncer de estómago, intestino, páncreas y vejiga, y también con leucemia.

Una posible solución para estos pacientes no consiste, obviamente, en la suspensión del tratamiento farmacológico porque esto expondría a la mucosa gástrica o esofágica una vez más a los efectos perjudiciales mediados por los jugos gástricos. Por otro lado, no es ni siquiera concebible continuar el tratamiento farmacológico y dejar a los pacientes expuestos a estos riesgos de infección.

El documento WO 2007/100765 A2 describe un método para potenciar la actividad de macrófagos, que comprende las etapas de: seleccionar al menos un probiótico; digerir el al menos un probiótico con una enzima lítica de manera que la pared celular del al menos un probiótico se rompa liberando componentes del probiótico; administrar al menos uno de los componentes del probiótico a un sujeto que lo necesita.

Lu y Graham han revisado la mecanística que comprende las enfermedades de úlcera péptica y los posibles modos de tratarlas (Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 2007, 3(4), págs. 431-437).

Huynh *et al.* han descrito un estudio en el que se usa N-acetilcisteína para tratar la infección de *Helicobacter pylori* infección (Digestive Diseases and Sciences, 2004, 49(11/12), págs. 1853-1861).

Gotteland *et al.* proporcionaron una revisión de la utilidad de probióticos en el control de la colonización gástrica por *Helicobacter pylori* (Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2006, 23(8), págs. 1077-1086).

Del Piano revisó datos *in vitro* de la resistencia de ciertas bacterias probióticas recubiertas y no recubiertas al jugo gástrico, bilis humana y secreción pancreática y han correlacionado esto con la colonización del intestino *in vivo* (Gut Microbes, 2011, 2(2), págs. 120-123).

Sigue habiendo, por tanto, la necesidad de permitir a los pacientes que lo necesitan, por un lado, tomar fármacos para reducir o tratar la hiperacidez gástrica y, por otro lado, evitar que se expongan a infecciones patógenas altamente peligrosas o a riesgos de infecciones patógenas recurrentes.

En particular, sigue habiendo la necesidad de poder responder a las necesidades mencionadas anteriormente por medios de una composición de origen natural, libre de efectos secundarios, con una eficacia antimicrobiana mejorada y selectiva contra patógenos, tales como por ejemplo coliformes que son un grupo de bacterias que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae* y que incluye, entre otros, *Citrobacter*, *Enterobacter*, preferiblemente *Enterobacter cloacae*, *Escherichia*, preferiblemente *E. coli*, incluyendo el serotipo O157:H7, *Hafnia*, *Klebsiella*, preferiblemente *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* y *Yersinia*, u otros patógenos tales como los *Clostridiaceae*, incluyendo *Clostridium difficile*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*. El solicitante ha respondido a las necesidades mencionadas anteriormente con una composición que, por un lado, es capaz de restaurar la funcionalidad de la barrera gástrica, teniendo un efecto protector contra microorganismos patógenos o perjudiciales y, por el otro, es capaz de tener una eficacia mejorada y selectiva contra los propios patógenos.

La composición de la presente invención es capaz de restaurar la funcionalidad de la barrera gástrica, normalmente ejercida por los jugos gástricos, que se reduce particularmente en pacientes que toman fármacos para reducir o tratar la hiperacidez gástrica. Dicha composición es capaz de minimizar los efectos secundarios asociados con la ingesta farmacológica basada en fármacos inhibidores de la bomba de protones (PPI abreviado). Dicha composición, además, demuestra una eficacia mejorada contra microorganismos patógenos o perjudiciales.

Tras una intensa actividad de investigación, el propietario ha encontrado sorprendentemente que una combinación

seleccionada (o mezcla) de bacterias probióticas es capaz de permitir a los pacientes que lo necesitan, por un lado, tomar fármacos de PPI para reducir o tratar la hiperacidez gástrica y, por otro lado, evitar exponerse a infecciones patógenas altamente peligrosas o a riesgos de infecciones patógenas recurrentes.

- 5 En resumen, la invención se refiere a una composición farmacéutica o dietética o un suplemento o un dispositivo médico, para su uso en el tratamiento de sujetos que están tomando un inhibidor de la bomba de protones para reducir o tratar la hiperacidez gástrica, que comprende las siguientes cepas:

10 1. *Lactobacillus pentosus* LPS01 DSM 21980

2. *Lactobacillus plantarum* LP01 LMG P-21021

3. *Lactobacillus rhamnosus* LR06 DSM 21981

- 15 4. *Lactobacillus delbrueckii* LDD 01 (DSMZ 20074) DSM 22106

en asociación con N-acetilcisteína; siendo dichas cepas capaces de colonizar el estómago a un valor de pH comprendido entre 4,0 y 5,5 y de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada.

- 20 La eficacia antibacteriana mostrada por cada cepa individual de bacterias se demuestra que está, en dicha composición, aumentada y es más selectiva contra patógenos como resultado de la presencia de N-acetilcisteína

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

- 25 Aunque la presente divulgación se refiere a muchos microorganismos que son adecuados para tratar a sujetos que están tomando fármacos para tratar la hiperacidez, no obstante ha de entenderse que se busca protección para la invención tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

- 30 La tabla 1 y la tabla 2 muestran, a modo de ejemplo, un grupo de microorganismos adecuados para tratar a sujetos.

La tabla 3 muestra los resultados de los ensayos de PCR específica de especie llevados a cabo para identificar las especies bacterianas administradas.

- 35 La tabla 4 muestra la cuantificación de las células bacterianas totales y del *Lactobacillus* total (valor $\pm$ EEM, log10 UFC/ml del jugo gástrico o gramo de material del cepillado duodenal) en d0 (todos los grupos) y en d10 (grupo B).

- 40 La tabla 5 muestra los resultados del ensayo de PCR específico de especie en el grupo B en d₀ y en d₁₀. La presencia de especies correlacionadas se muestra mediante un "+", mientras que su ausencia se muestra mediante una "-".

La tabla 6 muestra la cuantificación de los grupos microbianos específicos en muestras fecales en d0 (todos los grupos) y d10 (grupo B). Los resultados se expresan como log10 de UFC/gramo de heces (valor $\pm$ EEM).

- 45 La figura 1 se refiere al recuento bacteriano total presente en las muestras tomadas de los sujetos del estudio clínico (figura A y figura B).

- 50 La figura 1A muestra la comparación entre sujetos tratados de manera crónica con PPI (totales del grupo de PPI: PPI + "PPI más probióticos") y el grupo de control. Los datos se expresan como un promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC). La figura 1B muestra la comparación entre sujetos tratados de manera crónica con PPI y los tratados con "PPI más probióticos" y el grupo de control. Los datos se expresan como un promedio $\pm$ S.E.M. de las unidades formadoras de colonias (UFC).

- 55 La figura 2 muestra las cantidades de bacterias encontradas en el jugo gástrico y tras el cepillado duodenal en los sujetos tratados.

- 60 El propietario ha realizado una intensa actividad de investigación y selección, al final de la cual encontró que las cepas de bacterias probióticas que pertenecen a al menos una especie elegida del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*, *L. delbr. subsp. delbrueckii*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. lactis*, *L. pentosus*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* y *S. thermophilus* tienen una aplicación válida en el tratamiento de sujetos que están tomando inhibidores de la bomba de protones (PPI) para reducir o tratar la hiperacidez gástrica. Además, el propietario ha encontrado que la eficacia antibacteriana demostrada por las cepas de bacterias que son el sujeto de la presente invención aumenta y son más selectivas contra patógenos como resultado de la presencia de N-acetilcisteína (NAC) en dicha composición.
- 65

Además, el propietario ha encontrado que la eficacia antibacteriana demostrada por las cepas de bacterias que son el sujeto de la presente invención aumenta y son más selectivas contra patógenos como resultado de la presencia de N-acetilcisteína y lisozima gastroprotegida microencapsulada en dicha composición. La lisozima se microencapsula en una matriz lipídica. Ventajosamente, la matriz lipídica es de origen vegetal y tiene un punto de fusión comprendido entre 30°C y 80°C, preferiblemente entre 40°C y 70°C, incluso más preferiblemente entre 50°C y 60°C.

La composición de la presente invención comprende N-acetilcisteína en asociación con las cepas de bacterias de la presente invención: N-acetilcisteína que es un derivado de N-acetilato del aminoácido cisteína.

El propietario ha encontrado que el uso de N-acetilcisteína en asociación con una o dos o tres o cuatro o cinco o seis cepas de bacterias, descritas en las tablas 1 y 2, o en la presente invención, es capaz de disolver la biopelícula bacteriana producida por las propias bacterias patógenas y que usan dichos patógenos como protección. En la práctica, se ha observado que las bacterias patógenas son capaces de formar un recubrimiento protector (biopelícula) alrededor de las células. La biopelícula hace que las células de los patógenos sean más difíciles de atacar y estén mejor protegidas. La N-acetilcisteína es capaz de penetrar en la biopelícula de las células y disolverla, facilitando el ataque sobre las células patógenas por medio de las bacteriocinas y/o los metabolitos y/o el agua oxigenada producidos por las cepas de bacterias que son el sujeto de la presente invención.

El propietario ha encontrado, además, que el uso de lisozima gastroprotegida microencapsulada hace posible atravesar la barrera gastroduodenal y llegar completa al colon en donde tiene éxito en ejercer su acción de inhibición de los *Clostridiaceae*, incluyendo *C. difficile*, gracias a la acción lítica de la enzima sobre la espora.

La cantidad de N-acetilcisteína presente en la composición que es el sujeto de la presente invención está comprendida entre 10 y 1.000 mg/día, preferiblemente entre 50 y 200 mg/día, incluso más preferiblemente entre 60 y 150 mg/día. N-acetilcisteína, que está disponible en el mercado en forma no microencapsulada y en una forma farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en forma sólida, se mezcla con las bacterias probióticas, preferiblemente en forma sólida o liofilizada, usando técnicas y equipo conocidos por los expertos en el campo para dar una composición homogénea.

La cantidad de lisozima gastroprotegida microencapsulada que puede estar presente en la composición que es el sujeto de la presente invención está comprendida entre 10 y 2.000 mg/día, preferiblemente entre 400 y 1.000 mg/día, incluso más preferiblemente entre 500 y 800 mg/día, preferiblemente en forma sólida; se mezcla con las bacterias probióticas, preferiblemente en forma sólida o liofilizada, usando técnicas y equipo conocidos por los expertos en el campo, para dar una composición homogénea. La lisozima está disponible en el mercado en una forma farmacéuticamente aceptable.

Las cepas de bacterias se seleccionaron porque son capaces de colonizar el estómago a un valor de pH comprendido entre 4 y 5,5; preferiblemente entre 4,5 y 5. A este valor de pH las cepas seleccionadas actúan por medio de la producción de sustancias activas tales como bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada.

La composición de la presente invención puede ser una composición dietética, por ejemplo una composición simbiótica, o un suplemento o una composición farmacéutica o un dispositivo médico.

TABLA 1

N.º	Nombre	N.º de presentación	Fecha de presentación	Propietario
1	<i>Streptococcus thermophilus</i> B39	LMG P-18383	5.05.1998	PROBIOTICAL S.p.A
2	<i>Streptococcus thermophilus</i> T003	LMG P-18384	5.05.1998	PROBIOTICAL S.p.A
3	<i>Lactobacillus pentosus</i> 9/1 ei	LMG P-21019	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776/1 bi (LP02)	LMG P-21020	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> 476LL 20 bi (LP01)	LMG P-21021	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> PR ci (LP03)	LMG P-21022	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776/2 hi (LP04)	LMG P-21023	16.10.2001	MOFIN S.R.L.
8	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>paracasei</i> 181A / 3 aiai	LMG P-21380	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A
9	<i>Lactobacillus</i> perteneciente al grupo acidófilo 192A/1 aiai	LMG P-21381	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A
10	<i>Bifidobacterium longum</i> 175A/1 aiai	LMG P-21382	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A

11	<i>Bifidobacterium breve</i> 195A/1 aici	LMG P-21383	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A
12	<i>Bifidobacterium lactis</i> 32A/3 aiai	LMG P-21384	31.01.2002	PROBIOTICAL S.p.A
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/2 gi	LMG P-21385	31.01.2002	MOFIN S.R.L.
14	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 hi	LMG P-21387	15.03.2002	MOFIN S.R.L.
15	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci	LMG P-21838	31.01.2002	MOFIN S.R.L.
16	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/4 li	LMG P-21389	15.03.2002	MOFIN S.R.L.
17	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB1	DSM 16506	18.06.2004	PROBIOTICAL S.p.A
18	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB5	DSM 16507	18.06.2004	PROBIOTICAL S.p.A
19	<i>Bifidobacterium longum</i> BL 03	DSM 16603	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
20	<i>Bifidobacterium breve</i> BR 03	DSM 16604	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
21	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i> LR 04	DSM 16605	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
22	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LDB 01	DSM 16606	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
23	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> LDB 02	DSM 16607	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
24	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y02	DSM 16590	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
25	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y03	DSM 16591	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
26	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y04	DSM 16592	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
27	<i>Streptococcus thermophilus</i> Y05	DSM 16593	20.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 03	DSM 16594	21.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
29	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 04	DSM 16595	21.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
30	<i>Bifidobacterium breve</i> BR 04	DSM 16596	21.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
31	<i>Bifidobacterium Pseudocatenulatum</i> BP 01	DSM 16597	21.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
32	<i>Bifidobacterium Pseudocatenulatum</i> BP 02	DSM 16598	21.07.2004	PROBIOTICAL S.p.A
33	<i>Staphylococcus xylosus</i> SX 01	DSM 17102	01.02.2005	PROBIOTICAL S.p.A
34	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 02	DSM 17103	01.02.2005	PROBIOTICAL S.p.A
35	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 07	DSM 17104	01.02.2005	PROBIOTICAL S.p.A
36	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO8	DSM 17843	21.12.2005	PROBIOTICAL S.p.A
37	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO9	DSM 17844	21.12.2005	PROBIOTICAL S.p.A
38	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO100	DSM 17845	21.12.2005	PROBIOTICAL S.p.A
39	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF06	DSM 18295	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
40	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF07	DSM 18296	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
41	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF08	DSM 18297	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
42	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF09	DSM 18298	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
43	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS01	DSM 18299	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
44	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS02	DSM 18300	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
45	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS03	DSM 18301	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
46	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS04	DSM 18302	24.05.2006	PROBIOTICAL S.p.A
47	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> (reclasificado el 11.05.2009 como <i>Bifidobacterium catenulatum</i> sp./pseudocatenulatum 31, ID 09-255)	DSM 18350	15.06.2006	PROBIOTICAL S.p.A
48	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-15	DSM 18351	15.06.2006	PROBIOTICAL S.p.A
49	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-18 (reclasificado el 11.05.2009 como <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> EI-18, ID 09-256)	DSM 18352	15.06.2006	PROBIOTICAL S.p.A
50	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> EI-20	DSM 18353	15.06.2006	PROBIOTICAL S.p.A

51	<i>Streptococcus thermophilus</i> FRai	DSM 18613	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
52	<i>Streptococcus thermophilus</i> LB2bi	DSM 18614	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
53	<i>Streptococcus thermophilus</i> LRci	DSM 18615	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
54	<i>Streptococcus thermophilus</i> FP4	DSM 18616	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
55	<i>Streptococcus thermophilus</i> ZZ5F8	DSM 18617	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
56	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO4	DSM 18618	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
57	<i>Streptococcus thermophilus</i> S1ci	DSM 18619	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
58	<i>Streptococcus thermophilus</i> 641bi	DSM 18620	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
59	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A/1ai	DSM 18621	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
60	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A/2ai	DSM 18622	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
61	<i>Streptococcus thermophilus</i> IDC11	DSM 18623	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
62	<i>Streptococcus thermophilus</i> ML3di	DSM 18624	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
63	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO3	DSM 18625	13.09.2006	MOFIN S.R.L.
64	<i>Streptococcus thermophilus</i> G62	DSM 19057	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
65	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1192	DSM 19058	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB18	DSM 19059	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
67	<i>Streptococcus thermophilus</i> CCR21	DSM 19060	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
68	<i>Streptococcus thermophilus</i> G92	DSM 19061	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
69	<i>Streptococcus thermophilus</i> G69	DSM 19062	21.02.2007	MOFIN S.R.L.
70	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 10	DSM 19063	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
71	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 11	DSM 19064	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
72	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 12	DSM 19065	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
73	<i>Streptococcus thermophilus</i> YO 13	DSM 19066	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
74	<i>Weissella</i> ssp. WSP 01	DSM 19067	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
75	<i>Weissella</i> ssp. WSP 02	DSM 19068	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
76	<i>Weissella</i> ssp. WSP 03	DSM 19069	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
77	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 09	DSM 19070	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
78	<i>Lactococcus lactis</i> NS 01	DSM 19072	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
79	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 10	DSM 19071	21.02.2007	PROBIOTICAL S.p.A
80	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 10	DSM 19187	20.03.2007	PROBIOTICAL S.p.A
81	<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 11	DSM 19188	20.03.2007	PROBIOTICAL S.p.A
82	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhannosus</i> LR 05	DSM 19739	27.09.2007	PROBIOTICAL S.p.A
83	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB01	DSM 19818	30.10.2007	PROBIOTICAL S.p.A
84	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 01	DSM 19948	28.11.2007	PROBIOTICAL S.p.A
85	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 02	DSM 19949	28.11.2007	PROBIOTICAL S.p.A
86	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 03	DSM 19950	28.11.2007	PROBIOTICAL S.p.A
87	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 04	DSM 19951	28.11.2007	PROBIOTICAL S.p.A
88	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 05	DSM 19952	28.11.2007	PROBIOTICAL S.p.A
89	<i>Bifidobacterium Pseudocatenulatum</i> B660	DSM 21444	13.05.2008	PROBIOTICAL S.p.A
90	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 02	DSM 21717	06.08.2008	PROBIOTICAL S.p.A
91	<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC 08	DSM 21718	06.08.2008	PROBIOTICAL S.p.A
92	<i>Lactobacillus pentosus</i> LPS 01	DSM 21980	14.11.2008	PROBIOTICAL S.p.A
93	<i>Lactobacillus rhannosus</i> LR 06	DSM 21981	14.11.2008	PROBIOTICAL S.p.A

94	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> DSMZ 20074	DSM 22106		PROBIOTICAL S.p.A
95	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP1	DSM 22107	10.12.2008	PROBIOTICAL S.p.A
96	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS01	DSM 22775	23.07.2009	PROBIOTICAL S.p.A
97	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS06	DSM 22776	23.07.2009	PROBIOTICAL S.p.A
98	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB01	DSM 22892	28.08.2009	PROBIOTICAL S.p.A
99	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM 22893	28.08.2009	PROBIOTICAL S.p.A
100	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB03	DSM 22894	28.08.2009	PROBIOTICAL S.p.A
101	<i>Bifidobacterium lactis</i> BS05	DSM 23032	13.10.2009	PROBIOTICAL S.p.A
102	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA06	DSM 23033	13.10.2009	PROBIOTICAL S.p.A
103	<i>Lactobacillus brevis</i> LBR01	DSM 23034	13.10.2009	PROBIOTICAL S.p.A
104	<i>Bifidobacterium animalis/lactis</i> BS06	DSM 23224	12.01.2010	PROBIOTICAL S.p.A
105	<i>Bifidobacterium longum</i> BL05	DSM 23234	12.01.2010	PROBIOTICAL S.p.A
106	<i>Bifidobacterium longum</i> BL04	DSM 23233	12.01.2010	PROBIOTICAL S.p.A
107	<i>Bifidobacterium bifidum</i> MB109	DSM 23731	29.06.2010	PROBIOTICAL S.p.A
108	<i>Bifidobacterium breve</i> MB113	DSM 23732	29.06.2010	PROBIOTICAL S.p.A
109	<i>Bifidobacterium lactis</i> B2409	DSM 23733	29.06.2010	PROBIOTICAL S.p.A
110	<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE01	DSM 23877	05.08.2010	PROBIOTICAL S.p.A
111	<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE02	DSM 23878	05.08.2010	PROBIOTICAL S.p.A
112	<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE03	DSM 23879	05.08.2010	PROBIOTICAL S.p.A
113	<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE04	DSM 23880	05.08.2010	PROBIOTICAL S.p.A
114	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LPC09	DSM 24243	23.11.2010	PROBIOTICAL S.p.A
115	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA07	DSM 24303	23.11.2010	PROBIOTICAL S.p.A
116	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB04	DSM 24437	04.01.2011	PROBIOTICAL S.p.A
117	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS04	DSM 24618	02.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
118	<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR01	DSM 24619	02.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
119	<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR02	DSM 24620	02.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
120	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA09	DSM 24621	02.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
121	<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS05	DSM 24622	02.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
122	<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC11	DSM 24623	02.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
123	<i>Bifidobacterium infantis</i> BI02	DSM 24687	29.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
124	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB06	DSM 24688	29.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
125	<i>Bifidobacterium longum</i> BL06	DSM 24689	29.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
126	<i>Bifidobacterium lactis</i> BS07	DSM 24690	29.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
127	<i>Bifidobacterium longum</i> PCB133	DSM 24691	29.03.2011	PROBIOTICAL S.p.A
128	<i>Bifidobacterium breve</i> B632	DSM 24706	07.04.2011	PROBIOTICAL S.p.A
129	<i>Bifidobacterium breve</i> B2274	DSM 24707	07.04.2011	PROBIOTICAL S.p.A
130	<i>Bifidobacterium breve</i> B7840	DSM 24708	07.04.2011	PROBIOTICAL S.p.A
131	<i>Bifidobacterium longum</i> B1975	DSM 24709	07.04.2011	PROBIOTICAL S.p.A
132	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 17938		BIOGAIA
133	<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC 55730		BIOGAIA
134	<i>Lactobacillus reuteri</i>	PTA ATCC 6475		BIOGAIA

135	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ATCC 53103		GORBACH / GOLDIN
136	<i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i> BB-12®	DSM 15954		CHR. HANSEN
137	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	FERM BP-1366		YAKULT
138	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	DSM 9843		INSTITUT ROSELL
139	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> CRL-431	ATCC 55544		CERELA
140	<i>Lactobacillus crispatus</i> P 17631	LMG P-17631		PROGE FARM S.r.L.
141	<i>Lactobacillus acidophilus</i> P 18806	LMG P-18806		PROGE FARM S.r.L.
142	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> P 18805	LMG P-18805		PROGE FARM S.r.L.
143	<i>Lactobacillus gasseri</i> P 17632	LMG P-17632		PROGE FARM S.r.L.
144	<i>Lactobacillus gasseri</i> P 18137	LMG P-18137		PROGE FARM S.r.L.
145	<i>Lactobacillus paracasei</i> I1688	CNCM I-1688		PROGE FARM S.r.L.
146	<i>Lactobacillus plantarum</i> P 17630	LMG P-17630		PROGE FARM S.r.L.
147	<i>Lactobacillus salivarius</i> I1794	CNCM I-1794		PROGE FARM S.r.L.
148	<i>Bifidobacterium longum</i> BB536	BAA-999TM		MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD

Se eligen cepas particularmente preferidas para tratar sujetos de entre las enumeradas en la tabla 2.

TABLA 2

5

Cepa	N.º de presentación	Patógeno antagonizado	Propietario de la cepa
<i>Lactobacillus pentosus</i> LPS 01	DSM 21980	<i>Escherichia coli</i> , coliformes	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 01	LMG P-21021	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 02	LMG P-21020	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 03	LMG P-21022	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 04	LMG P-21023	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus pentosus</i> LPS 01	DSM 21980	Productor de bacteriocinas y agua oxigenada.	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 5	CNCM I-789	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 10	DSM 19187	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 09	DSM 18298	<i>Candida albicans</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus fermentum</i> LF 11	DSM 19188	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactococcus lactis</i> NS 01	DSM 19072	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium</i>	Probiotical S.p.A.

		<i>botulinum, Clostridium butyricum, Listeria</i>	
<i>Lactobacillus salivarius</i> LS04	DSM 24618	<i>Candida, Enterococcus faecalis y faecium, Neisseria gonorrhoeae</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR01	DSM 24619	Potente productor de agua oxigenada/inhibición no específica y de amplio espectro.	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus crispatus</i> LCR02	DSM 24620	Potente productor de agua oxigenada/inhibición no específica y de amplio espectro.	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA09	DSM 24621	<i>Candida</i> , por coagregación	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus gasseri</i> LGS05	DSM 24622	Potente productor de ácido láctico/inhibición no específica y de amplio espectro.	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC11	DSM 24623	<i>Staphylococcus aureus</i> Potente productor de agua oxigenada / inhibición no específica y de amplio espectro.	Probiotic
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR06	DSM 21981	<i>Candida krusei, Candida albicans, Candida glabrata, Escherichia coli, Gardnerella vaginalis</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 17938	<i>Escherichia coli</i> , otros coliformes, <i>Helicobacter pylori, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa, Shigella spp, Campylobacter jejuni, Bacillus subtilis, Clostridium perfringens, Candida albicans, Aspergillus flavus, Tripanosoma cruzi, Eimeria tenella</i>	BioGaia
<i>Lactobacillus reuteri</i>	PTA ATCC 6475		BioGaia
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE 01	DSM 23877		Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE 02	DSM 23878		Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE 03	DSM 23879		Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus reuteri</i> LRE 04	DSM 23880		Probiotical S.p.A.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC 5730		BIOGAIA
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i> DSMZ 20074	DSM 22106	<i>Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Bifidobacterium longum</i> PCB 133	DSM 24691	<i>Campylobacter jejuni</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Bifidobacterium longum</i> BL06	DSM 24689	<i>Campylobacter jejuni</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Bifidobacterium longum</i> B1975	DSM 24709	<i>Klebsiella oxytoca, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli</i>	Probiotical S.p.A.
<i>Bifidobacterium breve</i> B2274	DSM 24707		Probiotical S.p.A.
<i>Bifidobacterium breve</i> B632	DSM 24706		Probiotical S.p.A.
<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM		Probiotical S.p.A.

B7840	24708		
-------	-------	--	--

Las cepas de la tabla 2 se han sometido a prueba individualmente para el propósito de identificar el patógeno que son capaces de antagonizar (inhibir el crecimiento o reducir el número de uno o más especies/géneros microbianos patógenos o perjudiciales), tal como se establece en la columna 3 de la tabla 2.

La tabla 2 muestra que las bacterias son capaces de producir agua oxigenada o al menos una bacteriocina con una acción inhibidora sobre uno o más especies/géneros microbianos patógenos o perjudiciales.

Todas las cepas descritas y/o reivindicadas en la presente solicitud de patente se han depositado según el Tratado de Budapest y están disponibles para el público previa petición a la Autoridad de depósito competente.

Las composiciones descritas en el presente documento tienen una aplicación válida para su uso tanto en el tratamiento de sujetos que están tomando fármacos de PPI para reducir y/o tratar la hiperacidez gástrica como en el tratamiento de una úlcera provocada por una deficiencia en los mecanismos protectores de la mucosa (por ejemplo secreción reducida o receptividad a prostaglandina E, como en el caso de tomar aspirina u otros AINE) o por una infección por *H. pylori*. En otras palabras, la composición descrita en el presente documento tiene una aplicación válida también para los sujetos a los que se les recetan PPI/otros fármacos antiácidos aunque no muestren hiperacidez gástrica, pero con una lesión de la mucosa gástrica y/o duodenal consecuente con una razón alterada de acidez gástrica/mecanismos protectores de la mucosa.

Se ha encontrado que las composiciones de la presente invención son capaces de usarse de manera válida en el tratamiento de úlcera péptica o reflujo gastroesofágico.

En una realización, la composición comprende *Lactobacillus pentosus* LPS01 DSM 21980 y/o *Lactobacillus plantarum* LP01 LMG P-21021 y/o *Lactobacillus rhamnosus* LR06 DSM 21981 y/o *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (MB386) LDD01 DSMZ 20074 (DSM 22106) en una cantidad comprendida entre 1×10^9 y 10×10^9 UFC/cepa/dosis, preferiblemente entre 3 y 5×10^9 UFC/cepa/dosis; NAC en una cantidad comprendida entre 10 y 200 mg, preferiblemente entre 50 y 150 mg/dosis, incluso más preferiblemente entre 60 y 100 mg/dosis; maltodextrina de patata en una cantidad comprendida entre 1 y 5 gramos/dosis, preferiblemente entre 2 y 3 gramos/dosis.

En otra realización, la composición de la presente invención comprende además la cepa *Lactobacillus fermentum* LF 09 DSM 18298 y/o la cepa *Lactococcus lactis* NS 01 DSM 19072.

En otra realización, la composición de la presente invención comprende además al menos una cepa elegida del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en: (a) *Lactobacillus reuteri* LRE 01 DSM 23877; (b) *Lactobacillus reuteri* LRE 02 DSM 23878; (c) *Lactobacillus reuteri* LRE 03 DSM 23879; (d) *Lactobacillus reuteri* LRE 04 DSM 23880.

Las cepas seleccionadas de la presente invención son capaces de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada, siendo estas sustancias capaces de combatir, inhibir o reducir eficazmente bacterias patógenas. Estas cepas encuentran aplicación válida y uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de infecciones y/o patologías relacionadas con bacterias gramnegativas patógenas.

Las bacterias patógenas se eligen del grupo que comprende los coliformes. Los coliformes son un grupo de bacterias que pertenecen a la familia de *Enterobacteriaceae*. El grupo comprende más de cincuenta géneros, entre ellos *Citrobacter*, *Enterobacter*, preferiblemente *Enterobacter cloacae*, *Escherichia*, preferiblemente *E. coli*, incluyendo el serotipo O157:H7, *Hafnia*, *Klebsiella*, preferiblemente *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* y *Yersinia*. Otros patógenos siempre de interés en el contexto de la presente invención pertenecen a las especies elegidas del grupo que comprende *Clostridiaceae*, *C. difficile* incluido, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter pylori*. El patógeno *E. coli* se elige de entre *E. coli* O157:H7 y *E. coli* O104:H4. Preferiblemente, el patógeno *E. coli* se elige del grupo que comprende *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 35218 y *E. coli* ATCC 25922. Un patógeno adicional antagonizado por las cepas de bacterias de la presente invención es *Clostridium difficile*. Las cepas *L. rhamnosus* LR06 DSM 21981, *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, *L. pentosus* LPS01 DSM 21980 y *L. delbr. subsp. delbrueckii* LDD01 DSM 22106 se han sometido a prueba *in vitro* contra el serotipo O157:H7 y han demostrado una fuerte actividad antagonista.

Se ha encontrado que una composición que comprende *Lactobacillus pentosus* LPS01 DSM 21980, *Lactobacillus plantarum* LP01 LMG P-21021, *Lactobacillus rhamnosus* LR06 DSM 21981 y *Lactobacillus delbrueckii* LDD 01 (MB386) DSM 20074 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LDD01 DSMZ 20074 DSM 22106 en una cantidad en peso comprendida en la razón de 1:1:1:1 a 3:3:3:1 (por ejemplo 1×10^9 UFC/cepa/dosis y 3×10^9 UFC/cepa/dosis) y una cantidad de NAC comprendida entre 50 y 150 mg ejerce una fuerte acción antagonista.

En la composición de la presente invención, la mezcla de cepas de bacterias está presente en una cantidad

comprendida entre el 0,5% y el 20% en peso, en comparación con el peso total de la composición, preferiblemente de entre el 2,5% y el 8%.

En una realización preferida, la composición puede comprender además al menos una fibra prebiótica y/o hidratos de carbono con acción bifidógena. La fibra prebiótica que tiene una aplicación en la composición de la presente invención es una fibra que deben usar las cepas de bacterias presentes en la composición, pero no los patógenos que se pretende antagonizar. En el caso de que el patógeno que va a antagonizarse pertenezca al género *Candida*, los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS) tienen una aplicación válida porque dichas fibras no las usa *Candida*; mientras que los glucooligosacáridos (GOS_{α}) son capaces de inhibir directamente *E. coli* por medio de varios metabolitos. La fibra prebiótica puede elegirse por tanto según las necesidades del caso y el patógeno que va a antagonizarse entre: inulina, fructooligosacáridos (FOS), galacto- y transgalactooligosacáridos (GOS y TOS), glucooligosacáridos (GOS_{α}), xilooligosacáridos (XOS), quitosanooligosacáridos (COS), oligosacáridos de soja (SOS), isomaltooligosacáridos (IMOS), almidón resistente, pectina, *psyllium*, arabinogalactanos, glucomananos, galactomananos, xilanos, lactosacarosa, lactulosa, lactitol y otros diversos tipos de cauchos, fibra de goma arábica, fibra de carruba, fibra de avena, fibra de bambú, fibras de cítricos y, en general, fibras que contienen una porción soluble y una porción insoluble, en razones variables entre sí. En una realización preferida de la invención, la composición comprende al menos una fibra prebiótica elegida de entre las mencionadas anteriormente y/o mezclas adecuadas entre ellas en cualquier porcentaje relativo. La cantidad de fibras prebióticas y/o de hidratos de carbono con acción bifidógena, si están presentes en la composición, está comprendida entre el 0% y el 60% en peso, preferiblemente entre el 5% y el 45% e incluso más preferiblemente entre el 10% y el 30%, en comparación con el peso total de la composición. En este caso la composición o suplemento tiene una acción simbiótica y propiedades funcionales.

Además, la composición puede comprender también otros principios activos y/o componentes tales como vitaminas, minerales, péptidos bioactivos, sustancias con acción antioxidante, agente hipocolesterolémico, agente hipoglucémico, agentes antiinflamatorios y antiedulcorantes en una cantidad generalmente comprendida entre el 0,001% y el 20% en peso, preferiblemente entre el 0,01% y el 5% en peso, en cualquier caso dependiendo del tipo de componente activo y su dosis diaria recomendada si hay alguno, en comparación con el peso total de la composición.

La composición dietética que es el sujeto de la presente invención (por ejemplo, una composición simbiótica, o un suplemento o una composición farmacéutica) se prepara según las técnicas y el equipo conocido por los expertos en el campo.

En una realización preferida, la composición contiene bacterias en una concentración comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{11} UFC/g de mezcla de bacterias, preferiblemente entre 1×10^8 y 1×10^{10} UFC/g de mezcla de bacterias.

En una realización preferida, la composición contiene bacterias en una concentración comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{11} UFC/dosis, preferiblemente entre 1×10^8 y 1×10^{10} UFC/dosis. La dosis puede estar comprendida entre 0,2 y 10 g, por ejemplo es de 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g. Las bacterias probióticas usadas en la presente invención pueden estar en forma sólida, en particular en forma de polvo, polvo deshidratado o forma liofilizada. Todas las composiciones de la presente invención se preparan según técnicas conocidas por los expertos en el campo y mediante el uso de equipo conocido.

En una realización, la composición de la presente invención comprende además un fármaco para reducir o tratar la hiperacidez gástrica. Esta composición es una composición farmacéutica y forma un objeto de la presente invención. Dicho fármaco se elige del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en: inhibidores del receptor H_2 , preferiblemente cimetidina, famotidina, nizatidina o ranitidina; prostaglandinas preferiblemente misoprostol; protectores de la mucosa gástrica, preferiblemente sales de bismuto o sucralfato; fármacos antimuscarínicos o parasimpaticolíticos, preferiblemente pirenzepina o pipenzolato; antiácidos, preferiblemente bicarbonato de sodio, hidróxido de aluminio o hidróxido de magnesio; inhibidores de la bomba de protones, preferiblemente lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol y omeprazol. Preferiblemente, dicho fármaco se elige del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en: inhibidores del receptor H_2 , preferiblemente cimetidina, famotidina, nizatidina o ranitidina; fármacos antimuscarínicos o parasimpaticolíticos, preferiblemente pirenzepina o pipenzolato; antiácidos, preferiblemente bicarbonato de sodio, hidróxido de aluminio, hidróxido de magnesio; inhibidores de la bomba de protones, preferiblemente elegidos del grupo que comprende lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol y omeprazol.

Incluso más preferiblemente, dicho fármaco se elige del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en: inhibidores del receptor H_2 , preferiblemente cimetidina, famotidina, nizatidina o ranitidina; inhibidores de la bomba de protones, preferiblemente elegidos del grupo que comprende lansoprazol, esomeprazol, rabeprazol, pantoprazol y omeprazol. Tanto las bacterias como el fármaco están presentes de manera íntima en dicha composición. Por ejemplo, las bacterias y el fármaco están presentes juntos en un comprimido, una pastilla o un granulado en una forma farmacéutica adecuada para administración oral.

Es esencial que las bacterias y el fármaco se administren simultáneamente y actúen simultáneamente porque es

necesario restaurar el efecto de barrera eliminado por los inhibidores de la bomba de protones (PPI), gracias a la acción de las bacterias probióticas de la presente invención, que producen bacteriocinas y son capaces de colonizar el estómago como resultado del hecho de que los inhibidores de la bomba de protones han elevado el pH hasta un valor de aproximadamente 4 a 5,5; preferiblemente de 4,5 a 5.

En otra realización preferida, la composición de la presente invención está en forma de un dispositivo médico. En este caso las bacterias están presentes en una composición adecuada para administración oral tal como por ejemplo un comprimido, una pastilla o un granulado y, por separado, el fármaco indicado para reducir o tratar la hiperacidez gástrica, tal como se describió anteriormente, está presente en otra composición adecuada para administración oral. Ventajosamente, el fármaco es un inhibidor de la bomba de protones elegido del grupo que comprende lansoprazol, esometazol, rabeprazol, pantoprazol y omeprazol.

Se administran, por tanto, dos comprimidos, por ejemplo, uno que contiene las bacterias y el otro que contiene el fármaco. En cualquier caso los dos comprimidos deben administrarse simultáneamente, dado que es necesario que las bacterias actúen simultáneamente con la acción de los inhibidores de la bomba de protones. En el caso del dispositivo médico, también, es esencial que las bacterias y el fármaco se administren a una corta distancia en el tiempo porque es necesario restaurar el efecto de barrera eliminado por los inhibidores de la bomba de protones (PPI), gracias a la acción de las bacterias que producen bacteriocinas que son capaces de colonizar el intestino como resultado del hecho de que los inhibidores de la bomba de protones han elevado el pH hasta un valor de aproximadamente 4 a 5,5; preferiblemente de 4,5 a 5.

El propietario ha encontrado que las bacterias enumeradas en la tabla 1 o la tabla 2 o tal como se usan en la invención y definidas en las reivindicaciones 1-6 son capaces de colonizar el estómago a un valor de pH de alrededor de 5 restaurando el efecto de barrera reducido o eliminado por la elevación del pH tras la acción de los fármacos indicados para reducir o tratar la hiperacidez gástrica tales como, por ejemplo, un fármaco que inhibe la bomba de protones elegido del grupo que comprende lansoprazol, esometazol, rabeprazol, pantoprazol y omeprazol.

En el sentido más amplio del término, los antibióticos se definen como especies moleculares producidas por un organismo y activas contra el crecimiento de otros organismos. En la práctica, sin embargo, los antibióticos se consideran generalmente como metabolitos secundarios activos a bajas concentraciones en el bloqueo del crecimiento de microorganismos. Los productos secundarios del metabolismo tales como ácidos orgánicos, amoníaco y agua oxigenada no se incluyen en la categoría de antibióticos. Los antibióticos son moléculas que pueden ser moléculas peptídicas (penicilina), producidas por sistemas multienzimáticos y cuya biosíntesis no se bloquea por inhibidores de la síntesis de proteínas. Las bacteriocinas, por otro lado, son productos de síntesis ribosómica. Las bacteriocinas son moléculas peptídicas producidas por síntesis ribosómica que pueden estar asociadas también con lípidos o hidratos de carbono. Aunque algunas bacteriocinas producidas por bacterias grampositivas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*) tienen espectros de inhibición limitados a determinadas cepas que pertenecen a la misma especie que el microorganismo productor, la mayoría de ellas muestran un amplio espectro de acción contra diversas especies bacterianas, tanto grampositivas como gramnegativas. La clasificación actual de las bacteriocinas se basa tanto en su naturaleza química como en su espectro de acción.

Sección experimental

A. MÉTODOS

El presente ensayo clínico piloto se realizó en 10 sujetos, 9 de los cuales habían estado tomando PPI durante más de un mes. El grupo constituido por sujetos tratados con PPI se dividió adicionalmente en dos subgrupos: pacientes tratados con PPI más una mezcla de cepas de lactobacilos seleccionados (3 mil millones de *L. rhamnosus* LR06 DSM 21981, 3 mil millones de *L. plantarum* LP01 LMG P-21021, 3 mil millones de *L. pentosus* LPS01 DSM 21980 y mil millones de *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* LDD01) durante 5-10 días antes del examen endoscópico. Las muestras biológicas, constituidas por jugo gástrico y material de cepillado duodenal, se tomaron durante la gastroscopia llevada a cabo en los pacientes que habían estado en ayunas durante 12-24 horas. Los materiales biológicos, conservados en líquido de Amies, se sometieron a análisis microbiológicos adecuados para evaluar la carga bacteriana. Se usó medio de cultivo no selectivo (LaptG) para obtener la carga bacteriana total, mientras que, para seleccionar los lactobacilos heterofermentantes, se usó medio de caldo MRS con la adición del antibiótico vancomicina (2 µg/ml), preparando diluciones en serie de la muestra de partida. La última dilución que se encontró positiva al crecimiento bacteriano (usando la densidad óptica) hizo posible deducir el orden de magnitud de la propia carga.

Para verificar la presencia de las cepas probióticas administradas, se llevaron a cabo ensayos de PCR con los siguientes conjuntos de cebadores: Rhall/Prl para *L. rhamnosus*; pREV/pentF para *L. pentosus*; pREV/planF para *L. plantarum* y SS1/DB1 para *L. delbr. subsp. delbrueckii* LDD01.

B. RESULTADOS

Los resultados para la carga bacteriana total demostraron que los sujetos tratados con PPI (totales del grupo de PPI:

PPI + “PPI más probióticos”) muestran un gran número de bacterias, tanto en el jugo gástrico como en el cepillado duodenal, en comparación con el grupo de control (sin PPI, sin probióticos) que se encontró que era prácticamente estéril (figura 1A). El análisis de la carga bacteriana de los sujetos tratados con PPI más probióticos reveló una diferencia considerable entre los dos grupos analizados (1,5 log; figura 1B).

La figura 1A muestra la comparación entre los sujetos tratados de manera crónica con PPI (totales del grupo de PPI: PPI + “PPI más probióticos”) y el grupo de control. Los datos se expresan como un promedio de las unidades formadoras de colonias (UFC). La figura 1B se refiere a la comparación entre sujetos tratados de manera crónica con PPI y aquellos tratados con “PPI más probióticos”. Los datos se expresan como un promedio $\pm$ EEM de las unidades formadoras de colonias (UFC).

La selección de los lactobacilos heterofermentantes, mediante el crecimiento en caldo MRS con la adición del antibiótico vancomicina en diluciones en serie, permitió demostrar que la mayoría de las bacterias encontradas en los sujetos tratados con “PPI más probióticos” pertenecían al grupo de heterofermentación, tal como se muestra en el gráfico circular reproducido en la figura 2, en el que el área es proporcional a la población microbiana total.

El análisis usando el ensayo de PCR específico de especie mostró la presencia de las especies. *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. delbr. subsp. delbrueckii* en todos los sujetos tratados con “PPI más probióticos”, mientras que no se encontró la especie *L. pentosus* (tabla 3). Probablemente esta especie no posee las características necesarias para su supervivencia en el medio gástrico. El resultado positivo para la especie. *L. plantarum*, mostrado en un sujeto tratado con PPI sólo es probable que se atribuya a los hábitos alimenticios del sujeto.

ESTUDIO PILOTO

Materiales y métodos

1. El estudio

Un total de 30 individuos (17 hombres y 13 mujeres) de edades comprendidas entre 19 y 57 años y tratados con PPI se incluyeron espontáneamente (febrero-marzo de 2011). Otros 10 individuos (4 hombres y 6 mujeres) de entre 22 y 64 años que no hicieron uso de PPI (fármacos inhibidores de la bomba de protones) se incluyeron como grupo de control representativo de personas con acidez gástrica normal. Los criterios de inclusión para participar en el estudio comprendieron: edad entre 18 y 70 años, tratamiento crónico con PPI durante al menos de 3 a 12 meses consecutivos (para los primeros tres grupos), ningún otro problema de salud conocido en el momento de la inclusión, ninguna patología que requiera tratamiento con antibióticos; se les informó y dieron su consentimiento para participar en el estudio piloto. Los individuos también se seleccionaron basándose en ciertos criterios de exclusión: edad inferior a 30 años, embarazo en curso o lactancia materna, enfermedades degenerativas crónicas graves, déficits cognitivos graves, cirugía abdominal previa, diverticulitis, estados de inmunodeficiencia, enfermedad intestinal orgánica concomitante, tratamiento con antibióticos. Después de obtener el consentimiento informado, los individuos se dividieron en cuatro grupos (A, B, C y D). Los grupos A y B incluyeron sujetos que se habían sometido a un tratamiento a largo plazo con PPI (de al menos 12 meses consecutivos), mientras que el grupo C incluyó sujetos que se habían sometido a un tratamiento corto con PPI, de desde 3 hasta 12 meses consecutivos. Finalmente, el grupo D incluyó a los individuos de control que no se habían tratado con PPI y con efecto de barrera gástrica fisiológica. El grupo A (10 individuos) fue el grupo de control para el tratamiento a largo plazo con PPI y no recibió tratamiento. Cada sujeto del grupo B (10 individuos) recibió 10 sobres que contenían 30 mg cada uno de *L. rhamnosus* LR06 (DSM 21981), *L. pentosus* LPS01 (DSM 21980) y *L. plantarum* LP01 (LMG P-21021) correspondiente a 3×10^9 UFC/cepa/sobre, y 10 mg de microorganismo *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LDD01 (DSM 22106) equivalente a 1×10^9 UFC/sobre, 60 mg de N-acetilcisteína (NAC) y 2,34 gramos de maltodextrina de patata. El número total de células vitales por sobre fue de 10 mil millones (10×10^9 UFC). El grupo C (10 individuos) fue el grupo de estudio para el tratamiento a corto plazo con PPI y no recibió probióticos. El objetivo de este grupo fue comparar el crecimiento bacteriano en el grupo C en comparación con el grupo A, porque se supuso que la concentración bacteriana en la luz gástrica y en la mucosa duodenal debe ser mayor en los sujetos que se habían sometido a un tratamiento a largo plazo con PPI que en pacientes que se habían sometido a tratamiento con PPI durante no más de 12 meses. Los individuos en el grupo B consumieron un sobre/día durante la comida principal, preferiblemente durante la cena, con el objetivo de permitir que las bacterias permanezcan más tiempo en la luz del estómago y se distribuyan de manera homogénea junto con la N-acetilcisteína. El contenido del sobre se disolvió en medio vaso de agua fría antes de tomarlo. La administración duró 10 días. El jugo gástrico y el material del cepillado duodenal se recogieron durante la gastroscopia en los sujetos después de un ayuno de al menos 12 horas desde la última vez que se tomaron los probióticos. De esta manera, no había transcurrido menos de medio día desde la última vez que los individuos tomaron los probióticos. Más específicamente, la gastroscopia se realizó a tiempo cero (d_0) en todos los grupos (A, B, C y D) y después de 10 días (d_{10}); es decir, después del final de la toma de los probióticos con referencia al grupo B solamente. Las muestras fecales se recogieron en d_0 en todos los grupos (A, B, C y D) y en d_{10} sólo para el grupo B. Los sujetos de los grupos A, B y C continuaron el tratamiento con sus fármacos de PPI específicos a la misma dosis durante toda la duración del estudio piloto.

2. Recogida de las muestras fecales.

Las heces se recogieron al inicio del estudio (d_0) en todos los grupos (A, B, C y D) y en el grupo B en d_{10} . Las muestras fecales para el recuento de los grupos específicos de bacterias en la flora intestinal (aproximadamente 10 gramos) se recogieron de los voluntarios en recipientes de plástico estériles previamente llenos de 20 ml de medio de transporte líquido Amies (BD Italia, Milán, Italia), se mantuvieron a 4°C en la casa del voluntario y se entregaron al laboratorio en el plazo de 24 horas de la recogida.

3. Cuantificación de las células bacterianas vitales totales y *Lactobacillus* totales y análisis genómico de ensayos de PCR en el jugo gástrico y el material de cepillado duodenal.

El jugo gástrico y el material de cepillado duodenal se recogieron durante una gastroscopia llevada a cabo en pacientes que habían estado en ayunas durante 12-24 horas. Las gastroscopias se realizaron en el Departamento de Gastroenterología del Ospedale Maggiore della Carità en Novara. Las muestras de material de cepillado (aproximadamente 1-2 gramos) se conservaron en recipientes de plástico estériles previamente llenos de 10 ml de medio de transporte líquido Amies (BD Italia, Milán, Italia). Todas las muestras se mantuvieron a 4°C y se entregaron al laboratorio en el plazo de 24 horas tras su recogida.

Las muestras se analizaron tan pronto como se recibieron en el laboratorio y, en cualquier caso, en el plazo de 24 horas de la recogida. Las muestras se pesaron y se transfirieron a un recipiente estéril (Stobag), se diluyeron 1:10 peso/volumen con medio Amies y se homogeneizaron con un aparato Stomacher durante 4 minutos a 230 rpm. Las muestras se sometieron a una dilución decimal en serie usando 1 ml de una solución salina en cada dilución (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} para los recuentos de células vitales totales y células totales de *Lactobacillus*). Las muestras se sembraron en placa sobre medios de cultivo de agar específicos. En el grupo D, las diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-6} se sembraron en placa porque se esperaba que los recuentos bacterianos fueran significativamente más bajos que los de otros grupos. Se usó el medio de cultivo no selectivo LAPTg para células vitales totales, mientras que el recuento selectivo de *Lactobacillus* totales se realizó mediante el cultivo agar de acetato Rogosa (Oxoid, Milán, Italia). Todas las placas sembradas con lactobacilos se incubaron durante de 48 a 72 horas a 37°C en condiciones anaerobias (GasPak) con un kit Anaerocult (Merck, Darmstadt, Alemania), mientras que las placas con LAPTg se incubaron en condiciones aerobias durante de 24 a 48 horas a 37°C. El ensayo de PCR específico de especie se realizó en un extracto de ADN genómico total obtenido de las muestras de jugo gástrico procesado y del material de cepillado duodenal, con el objeto de verificar y cuantificar la presencia de bacterias probióticas administradas a los voluntarios. En particular, los cebadores usados fueron los siguientes: *L. rhamnosus* (Rha/PRI), *L. pentosus* (PENT f/PLAN f/pREV), *L. plantarum* (LFPR/PLAN II) y *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (Ldel7/Lac2). La cuantificación de la población total de bacterias y el total de lactobacilos en el jugo gástrico y en el material de cepillado duodenal, y también el ensayo de PCR específico de especie, se realizó en el laboratorio de Biolab Research Srl en Novara, Italia.

4. Cuantificación de los grupos microbianos específicos presentes en las muestras fecales.

Las muestras se examinaron tan pronto como llegaron al laboratorio. Las muestras se pesaron (aproximadamente 30 gramos) y se transfirieron a un recipiente estéril (Stobag), se diluyeron con líquido Amies para obtener una dilución de 1:10 peso/volumen y se homogeneizaron posteriormente en un aparato Stomacher durante 4 minutos a 230 rpm. Las muestras se sometieron luego a una dilución decimal en serie usando una solución salina estéril y 0,1 ml de la dilución apropiada (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} para coliformes totales, *Escherichia coli* y enterococos; 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} para levaduras y mohos). Las muestras se sembraron en placa en medios de cultivo de agar. Los enterococos se contaron usando agar Slanetz-Bartley (SB) (Oxoid, Milán, Italia); los coliformes totales y *Escherichia coli* se contaron en Petrifilm CC (3M, Segrate, Milán, Italia) y en Chromo IDCPS (BioMerieux, Florencia, Italia), las levaduras y los mohos totales en agar de extracto de levadura dextrosa cloranfenicol (YGC) (Sigma-Aldrich, Milán, Italia). Los enterococos, los coliformes totales y las *Escherichia coli* se incubaron en condiciones aerobias a 37°C durante de 24 a 48 horas, mientras que las levaduras y los mohos se incubaron en condiciones aerobias a 25°C durante de 24 a 48 horas.

La cuantificación de los grupos microbianos enumerados anteriormente en las muestras fecales se realizó en el laboratorio de Biolab Research Srl en Novara, Italia.

5. Análisis estadístico

Todos los valores obtenidos sobre la concentración de la población bacteriana total y sobre los lactobacilos totales en el jugo gástrico y en el material de cepillado duodenal se expresan como el promedio del número de células vitales por ml o por gramo de muestra $\pm$ el error estándar promedio ($m \pm EEM$). Todos los valores relacionados con la concentración de grupos microbianos fecales específicos se expresan como el número promedio de células vitales/gramo de heces $\pm$ error estándar del promedio ($m \pm EEM$). Se usaron pruebas de la t apareadas o independientes de los análisis estadísticos para evaluar los resultados y compararlos entre d_0 y d_{10} en el grupo B (apareado) y d_0 entre los distintos grupos (independientes). En particular, los resultados del grupo A se compararon con los grupos B, C y D en d_0 (nivel inicial). Las diferencias se consideraron significativas con $p \leq 0,05$.

6. Resultados

6.1 Cuantificación de las células bacterianas totales, *Lactobacillus* totales y análisis genómico de ensayos de PCR en el jugo gástrico y el material de cepillado duodenal.

Los 40 individuos se sometieron a gastroscopia a tiempo cero (d_0), mientras que el grupo B también se sometió a gastroscopia al final de la suplementación con probióticos (d_{10}). No se registraron retiradas, ya que la preparación se había tolerado y aceptado muy bien por cada participante en el grupo B, el único que recibió suplementos probióticos entre los d_0 y d_{10} .

Los resultados con respecto a las células bacterianas totales y *Lactobacillus* totales en los jugos gástricos y en el material de cepillado duodenal se muestran en la tabla 4.

Tabla (4): Cuantificación de las células bacterianas totales y *Lactobacillus* totales (valor $\pm$ EEM, $\log_{10}$ UFC/ml del jugo gástrico o gramo de material de cepillado duodenal) en d_0 (todos los grupos) y en d_{10} (grupo B).

a) comparación entre los cuatro grupos en d_0

Parámetros considerados	Grupo A log UFC/ml o g	Grupo B log UFC/ml o g	Grupo C log UFC/ml o g	Grupo D log UFC/ml o g	p (A frente a B)	p (A frente a C)	p (A frente a D)	p (C frente a D)
Jugo gástrico, d_0								
Bacterias totales	8,50 $\pm$ 0,28	8,60 $\pm$ 0,17	5,47 $\pm$ 0,30	2,48 $\pm$ 0,21	0,4441	0,0012	0,0011	0,0910
<i>Lactobacillus</i> totales	6,99 $\pm$ 0,34	7,15 $\pm$ 0,25	5,01 $\pm$ 0,40	1,62 $\pm$ 0,17	0,5767	0,1402	0,1365	0,2822
Cepillado duodenal								
Bacterias totales	8,37 $\pm$ 0,28	8,32 $\pm$ 0,33	5,80 $\pm$ 0,33	2,60 $\pm$ 0,20	0,8204	0,0139	0,0137	0,0739
<i>Lactobacillus</i> totales	6,80 $\pm$ 0,23	6,76 $\pm$ 0,33	4,00 $\pm$ 0,17	1,35 $\pm$ 0,15	0,8868	0,0083	0,0083	0,1387

b) porcentaje de *Lactobacillus* totales en d_0 en los cuatro grupos

Muestra biológica	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
	%	%	%	%
Jugo gástrico	3,06	3,51	34,91	13,93
Cepillado duodenal	2,71	2,74	1,58	5,59

c) comparación entre el tiempo cero (d_0) y d_{10} en el grupo B

Tiempo	Grupo B		
	log UFC/ml o log UFC/g	% de <i>Lactobacillus</i> totales	p§
d_0			
Jugo gástrico			
Bacterias totales	8,60 $\pm$ 0,17		**
<i>Lactobacillus</i> totales	7,15 $\pm$ 0,25	3,51	**
Cepillado duodenal			
Bacterias totales	8,32 $\pm$ 0,33		**
<i>Lactobacillus</i> totales	6,76 $\pm$ 0,33	2,74	**

d ₁₀			
<i>Jugo gástrico</i>			
Bacterias totales	7,71 ± 0,27		0,0023
<i>Lactobacillus</i> totales	7,70 ± 0,27	98,03	0,0742
Cepillado duodenal			
Bacterias totales	7,47 ± 0,32		0,0256
<i>Lactobacillus</i> totales	7,44 ± 0,32	93,50	0,0355

** Tiempo cero de referencia de comparación (d₀)

§ Comparación entre (d₀) y (d₁₀)

Es interesante observar que está presente una reducción significativa en los parámetros bacterianos totales en d₁₀ en el grupo B en comparación con el nivel inicial (tabla 4c).

6.2 Resultados del ensayo de PCR específico de especie.

Los resultados del ensayo de PCR específico de especie en el grupo B en d₁₀ en comparación con d₀ confirmaron la presencia de las cuatro especies de probióticos administrados. Un panorama general se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del ensayo de PCR específico de especie en el grupo B en d₀ y en d₁₀. La presencia de especies correlacionadas se muestra con un "+", mientras que su ausencia se muestra con un "-".

a) jugo gástrico

Grupo	Individuos	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>
d ₀	1	+	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	-	+	-	-
	9	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
d ₁₀	1	+	+	-	+
	2	+	+	-	+
	3	+	+	+	-
	4	+	+	-	+
	5	+	+	+	+
	6	+	-	-	+
	7	+	+	-	+
	8	+	+	+	+
	9	+	+	-	+
	10	+	-	+	+

b) cepillado duodenal

Grupo	Individuos	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i>
d ₀	1	+	-	-	-

	2	-	-	-	-
	3	-	-	+	-
	4	-	-	-	-
	5	+	-	-	-
	6	-	-	-	-
	7	-	-	-	-
	8	-	-	-	-
	9	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
d ₁₀	1	+	+	+	+
	2	+	+	-	+
	3	-	+	+	-
	4	+	+	-	+
	5	+	+	-	+
	6	+	+	-	+
	7	+	+	-	+
	8	+	+	+	+
	9	+	+	+	-
	10	+	+	+	+

En el jugo gástrico, *L. plantarum* y *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* fueron las dos especies más representativas, ya que 10 y 9 individuos, respectivamente, de un total de 10 individuos fueron positivos en comparación con 1 y 0 en el nivel inicial (d₀). En el cepillado duodenal, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* estaban presentes en 9 y 10 sujetos, respectivamente, de un total de 10 sujetos en comparación con 2 y 0 en el nivel inicial (d₀).

6.3 Recuento de los grupos microbianos específicos en las muestras fecales.

Los resultados en *Enterococcus* totales, coliformes totales, *Escherichia coli*, levaduras y mohos en las muestras fecales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Cuantificación de los grupos microbianos específicos en muestras fecales en d₀ (todos los grupos) y d₁₀ (grupo B). Los resultados se expresan como log₁₀ de UFC/gramos de heces (valor ± EEM).

a) comparación entre los cuatro grupos en d₀

Parámetros considerados	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	p (A frente a B)	p (A frente a C)	p (A frente a D)	p (C frente a D)
	log ₁₀ UFC/g	log ₁₀ UFC/g	log ₁₀ UFC/g	log ₁₀ UFC/g				
d ₀								
<i>Enterococcus spp</i>	7,68±0,17	7,80±0,25	7,38±0,27	6,39±0,17	0,5185	0,1062	0,0021	0,0479
Coliformes totales	9,59±0,17	9,55±0,16	9,39±0,27	8,75±0,14	0,8019	0,2946	0,0147	0,0338
<i>Escherichia coli</i>	9,52±0,17	9,44±0,18	9,33±0,28	8,72±0,14	0,6818	0,3550	0,0227	0,0444
Levaduras	6,07±0,17	5,95±0,14	5,30±0,26	2,22±0,19	0,5733	0,0486	0,0223	0,0051
Mohos	5,60±0,14	5,64±0,14	4,83±0,24	1,90±0,17	0,8106	0,0078	0,0027	0,0187

b) porcentaje de coliformes totales que consisten en *Escherichia coli* en d₀ en los cuatro grupos y en d₁₀ en el grupo B

Tiempo	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
	%	%	%	%
d ₀				
<i>Escherichia coli</i>	83,87	77,43	86,51	92,63
d ₁₀				
<i>Escherichia coli</i>	/	91,12	/	/

c) comparación entre el nivel inicial (d₀) y d₁₀ en el grupo B.

Tiempo	Grupo B	
	Log ₁₀ UFC/g	p§
d ₀		
<i>Enterococcus spp</i>	7,80 ± 0,25	**
Coliformes totales	9,55 ± 0,16	**
<i>Escherichia coli</i>	9,44 ± 0,18	**
Levaduras	5,95 ± 0,14	**
Mohos	5,64 ± 0,14	**
d ₁₀		
<i>Enterococcus spp</i>	6,99 ± 0,23	0,0155
Coliformes totales	8,01 ± 0,24	0,0064
<i>Escherichia coli</i>	7,97 ± 0,23	0,0105
Levaduras	3,56 ± 0,18	0,0066
Mohos	4,30 ± 0,15	0,0053

5 ** Referencia de comparación a tiempo cero d₀

§ Comparación entre d₀ y d₁₀ en el grupo B

Resultados

10 El estudio confirmó un crecimiento bacteriano significativo en el tracto gastrointestinal superior en sujetos que habían estado tomando PPI durante más de 12 meses consecutivos (p = 0,0011 y p = 0,0137 para bacterias totales en el jugo gástrico y en el material de cepillado duodenal, respectivamente, en el grupo A frente al grupo D que representa la población general; se encontraron resultados estadísticos similares de la comparación entre el grupo B y el grupo D de la misma manera). La comparación entre los grupos A y C (sujetos tratados con PPI durante un período de 3 a 12 meses) demostró significación estadística en 3 de 4 parámetros. De esta manera, la duración del tratamiento con PPI es un factor que puede determinar el grado de proliferación bacteriana en el tracto gastrointestinal superior. Los individuos tratados a corto plazo parecen ser más similares a la población general que a sujetos que se habían sometido a tratamiento a largo plazo con PPI.

20 Un aspecto interesante se refiere al mayor porcentaje de *Lactobacillus* totales en el jugo gástrico de sujetos tratados a corto plazo (el 34,91%, 5,01 log₁₀ UFC/ml en el grupo C) en comparación con sujetos tratados a largo plazo (3,06%, 6,99 log₁₀ UFC/ml en el grupo A; 3,51%, 7,15 log₁₀ UFC/ml en el grupo B). Esta mayor concentración, sin embargo, no refleja los resultados del cepillado duodenal (1,58%, 4,00 log₁₀ UFC/ml en el grupo C).

25 La administración de las 4 cepas de bacterias enumeradas anteriormente, es decir, *L. rhamnosus* LR06, *L. pentosus* LPS01, *L. plantarum* LP01 y *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LDD01, incluyendo 60 mg de NAC durante 10 días, fue suficiente para cambiar significativamente el crecimiento bacteriano típico en los sujetos tratados con PPI durante más de 12 meses, a fin de restaurar una barrera protectora contra posibles patógenos de origen dietético (p = 0,0023 y p = 0,0256 para el total de bacterias en el jugo gástrico y el material de cepillado duodenal, respectivamente, en el grupo B en d₁₀ comparado con d₀, tabla 4c).

30 Otro resultado interesante fue el porcentaje de bacterias totales representadas por lactobacilos en los diversos grupos. En sujetos de control que no estaban tomando PPI, las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* representan aproximadamente el 14% del total de la microflora gástrica, mientras que en pacientes tratados con PPI durante más de 12 meses, los lactobacilos representan sólo aproximadamente el 3% de las bacterias totales, lo que

sugiere por tanto que la gran mayoría de los microorganismos gástricos estaban compuestos por otros grupos microbianos potencialmente perjudiciales. Al final del período de suplementación con probióticos (d_{10}) en el grupo B, los lactobacilos constituían el 98% de las bacterias totales en el jugo gástrico, y se registró un aumento en su concentración en comparación con el tiempo cero, aunque no es estadísticamente significativo ($p = 0,074$). La falta de significación estadística podría explicarse a la luz de la significativa reducción paralela en las bacterias gástricas totales ($7,71 \log_{10}$ UFC/ml en comparación con $8,60 \log_{10}$ UFC/ml, $p = 0,0023$). Por otro lado, el porcentaje de *Lactobacillus* en el material de cepillado duodenal fue significativamente mayor en d_{10} en comparación con el nivel inicial ($p = 0,0355$).

Los resultados del ensayo de PCR específico de especie, además, confirmaron la capacidad de los probióticos administrados junto con NAC para colonizar efectivamente la luz gástrica y la mucosa duodenal en los sujetos tratados con PPI durante más de 12 meses consecutivos (tablas 5a y 5b). Este aspecto puede ayudar a inhibir y reemplazar las bacterias patógenas posiblemente perjudiciales o incluso las que están comúnmente presentes en sujetos tratados a largo plazo con PPI. Este dato es más significativo si se considera que todas las gastroscopias se ejecutaron al menos 12 horas después de la última vez que se habían tomado probióticos, lo que demuestra la capacidad de estas bacterias beneficiosas para persistir significativamente en el estómago y en la superficie de la mucosa duodenal. Se usó NAC por sus efectos mecánicos contra biopelículas bacterianas, para prevenir una posible nueva formación de biopelículas en sujetos sometidos a un tratamiento a largo plazo con PPI.

Los resultados de las muestras fecales demostraron, por un lado, un aumento significativo en todos los parámetros microbianos tomados en consideración en los individuos tratados con PPI durante un período de al menos 12 meses (comparación entre los grupos A y D): $p = 0,0021$, $p = 0,0147$, $p = 0,0227$, $p = 0,0223$ y $p = 0,0027$ para *Enterococcus* spp., coliformes totales, *E. coli*, levaduras y mohos, respectivamente). En cualquier caso, una administración a corto plazo de PPI, desde 3 hasta 12 meses, fue suficiente para inducir un aumento fecal significativo en los cinco parámetros, aunque la significación estadística fue menor (véanse los datos para el grupo C en comparación con D: $p = 0,0479$, $p = 0,0338$, $p = 0,0444$, $p = 0,0051$ y $p = 0,0187$, respectivamente) (tabla 6). Por otro lado, la comparación estadística entre los sujetos tratados con PPI a largo y corto plazo fue significativa sólo para las levaduras y los mohos ($p = 0,0486$ y $p = 0,0078$, respectivamente), lo que sugiere que para *Enterococcus* spp. y para las bacterias gramnegativas, tomar cantidades mínimas de PPI durante tres meses es suficiente para mediar en la mayoría del aumento observado después de 12 meses de tratamiento. Es muy probable que las levaduras y los mohos necesiten más tiempo para colonizar la flora intestinal después de la alteración de la barrera gástrica, ya que se registró un aumento adicional significativo en los sujetos a largo plazo en comparación con los sujetos a corto plazo (grupo A en comparación con el grupo C).

Los coliformes totales representan generalmente aproximadamente el 1% de la población total de bacterias fecales humanas en concentraciones de aproximadamente 10^9 bacterias por gramo (37). Otro resultado interesante es el porcentaje de coliformes totales constituido por *Escherichia coli*. De hecho, se sabe que esta bacteria representa la mayoría de la población total de coliformes en el intestino humano, que en general asciende al 93-94% (38). Las bacterias coliformes totales presentes en el intestino humano se componen de cuatro géneros de la familia de las *Enterobacteriaceae*, en particular *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, ascendiendo *Klebsiella* normalmente a aproximadamente el 1% y representando *Enterobacter/Citrobacter* spp. juntos aproximadamente el 6%. Los resultados para el grupo D confirmaron sustancialmente esta evidencia, ya que el 92,6% de los coliformes totales estaba constituido por *E. coli*. Sin embargo, en los sujetos que se habían sometido a un tratamiento a largo plazo con PPI, este porcentaje se redujo hasta el 83,9% (grupo A) y el 77,4% (grupo B), lo que sugiere un crecimiento excesivo anómalo de los géneros *Klebsiella* y/o *Enterobacter/Citrobacter* en el intestino como consecuencia de la destrucción de la barrera gástrica. Este aumento podría considerarse perjudicial ya que algunas especies como *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Enterobacter cloacae* podría ejercer una acción patógena significativa en el huésped, que oscila entre infecciones hospitalarias de la sangre (BSI) y apendicitis aguda y colitis hemorrágica asociada a antibióticos (AAHC).

Los *Enterococcus* spp. normalmente están presentes en heces humanas en concentraciones de desde 10^5 hasta 10^7 bacterias por gramo. Los datos obtenidos en la población de control confirmaron esta evidencia, ya que se contaron $6,39 \log_{10}$ UFC/ml en las muestras fecales. El tratamiento a largo plazo con PPI provocó un aumento significativo en este género microbiano en el intestino humano ($7,68 \log_{10}$ UFC/ml en el grupo A y $7,80 \log_{10}$ UFC/ml en el grupo B).

La cuestión más importante representada por *Enterococo* spp., en particular por *Enterococcus faecium*, es su resistencia intrínseca a los antibióticos, especialmente hacia penicilina y vancomicina. Los enterococos son la tercera causa más común de endocarditis infecciosa, y el efecto de la tolerancia a la penicilina sobre los resultados terapéuticos ha sido evidente desde finales de los años cuarenta. En cualquier caso, estudios epidemiológicos han demostrado que las cepas de *E. faecium* asociadas con infecciones nosocomiales, incluyendo endocarditis, son tipos de secuencias diferentes de las cepas comensales que colonizan el tracto gastrointestinal de seres humanos sanos, aunque no se puede excluir la posibilidad de que algunos biotipos perjudiciales puedan haber colonizado la flora bacteriana humana de los sujetos tratados con PPI.

Los análisis complejos de las heces en el tiempo inicial confirmaron el debilitamiento o incluso la interrupción completa del efecto de barrera gástrica, ya que la composición de la flora intestinal mostró que se modifica

profundamente en personas que toman PPI durante al menos tres meses. Bacterias gramnegativas, tales como coliformes totales y *Escherichia coli*, fueron significativamente más altos que en los controles, mientras que las levaduras y los mohos aumentaron en aproximadamente 4 log₁₀. Los enterococos fecales aumentaron en más de 1 log₁₀. También es interesante observar la correlación entre la duración de la toma de PPI y el tamaño de los aumentos fecales en los cinco grupos microbianos analizados, elegidos como evidencia de un posible dismicrobismo.

Los cuatro probióticos estudiados en asociación con NAC pudieron reducir todos los parámetros fecales ($p = 0,0155$, $p = 0,0064$, $p = 0,0105$, $p = 0,0066$ y $p = 0,0053$ para *Enterococcus* spp., coliformes totales, *E. coli*, levaduras y mohos, respectivamente, en d₁₀ en comparación con el valor de referencia). En particular, la reducción de coliformes totales, *E. coli*, levaduras y mohos fue de más de un log₁₀ después de 10 días de suplementación con los probióticos. Al final de la suplementación con los probióticos en el grupo B, los coliformes totales y las concentraciones de *E. coli* fueron significativamente más bajas que los valores encontrados en la población general (grupo D) ($p = 0,0182$ y $p = 0,0229$, respectivamente), lo que confirma la considerable acción antagonista de las bacterias probióticas contra *Escherichia coli*.

En conclusión, la administración de una asociación de cepas específicas de *L. rhamnosus* LR06, *L. pentosus* LPS01, *L. plantarum* LP01 y *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LDD01, incluyendo también una cantidad eficaz de N-acetilcisteína, es capaz de reducir significativamente la proliferación bacteriana a nivel del estómago y el duodeno, reduciendo las bacterias gramnegativas, *Enterococcus* spp., levaduras y mohos en la flora intestinal después de 10 días de suplementación oral, reequilibrando rápidamente su composición y restaurando una barrera protectora contra las bacterias perjudiciales, especialmente a nivel del estómago.

Se usó N-acetilcisteína (NAC) debido a su capacidad para impedir mecánicamente la posible formación de una biopelícula bacteriana, y mostró por sí misma ser eficaz ya que la concentración de las diversas bacterias distintas de lactobacilos tanto en el jugo gástrico como en las muestras de cepillado del duodeno se redujo significativamente.

Todas las cepas probióticas usadas en este estudio han demostrado previamente una acción antagonista significativa *in vitro* en cepas específicas de *Escherichia coli*, entre ellas, el serotipo enterohemorrágico O157:H7 y, por tanto, podrían usarse para prevenir eficazmente las infecciones mediadas por estos microbios perjudiciales o patógenos.

A la luz de un uso realmente más generalizado de los PPI, la suplementación oral concomitante con probióticos y NAC tal como se usa en este estudio piloto representa una estrategia innovadora capaz de restaurar, al menos parcialmente, un efecto de barrera gástrica normal, reduciendo así la amenaza de infecciones gastrointestinales de origen dietético en gran parte de la población con acidez intragástrica reducida.

TABLA 3

	Voluntarios	<i>L. plantarum</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>L. delbr. subsp. delbrueckii</i>
PPI	2	+	-	-	-
	3	-	-	-	-
	10	-	-	-	-
PPI más probióticos	1	+	+	-	+
	5	+	+	-	+
	6	+	+	-	+
	7	+	+	-	+
	8	+	-	-	-
	9	+	+	-	+

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica o dietética o suplemento o dispositivo médico, para su uso en el tratamiento de sujetos que están tomando un inhibidor de la bomba de protones para reducir o tratar la hiperacidez gástrica, que comprende las siguientes cepas:
 1. *Lactobacillus pentosus* LPS01 DSM 21980
 2. *Lactobacillus plantarum* LP01 LMG P-21021
 3. *Lactobacillus rhamnosus* LR06 DSM 21981
 4. *Lactobacillus delbrueckii* LDD 01 (DSMZ 20074) DSM 22106
 en asociación con N-acetilcisteína; siendo dichas cepas capaces de colonizar el estómago a un valor de pH comprendido entre 4,0 y 5,5 y de producir bacteriocinas y/o metabolitos y/o agua oxigenada.
2. Composición farmacéutica o dietética o suplemento o dispositivo médico para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición farmacéutica o dietética o suplemento o dispositivo médico comprende cada cepa de bacterias en una cantidad comprendida entre 1×10^9 y 10×10^9 UFC/cepa/dosis y N-acetilcisteína en una cantidad comprendida entre 10 y 200 mg.
3. Composición farmacéutica o dietética o suplemento o dispositivo médico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición farmacéutica o dietética o suplemento o dispositivo médico comprende además la cepa *Lactobacillus fermentum* LF 09 DSM 18298 y/o la cepa *Lactococcus lactis* NS 01 DSM 19072; o alternatively comprende además al menos una cepa elegida del grupo que consiste en:
 - a. *Lactobacillus reuteri* LRE 01 DSM 23877
 - b. *Lactobacillus reuteri* LRE 02 DSM 23878
 - c. *Lactobacillus reuteri* LRE 03 DSM 23879
 - d. *Lactobacillus reuteri* LRE 04 DSM 23880.
4. Composición farmacéutica o dietética o suplemento o dispositivo médico para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los sujetos están tomando un inhibidor de la bomba de protones para reducir o tratar la hiperacidez gástrica en el tratamiento de dispepsia, úlcera gastroduodenal, úlcera gástrica, úlcera péptica, úlcera duodenal, gastritis provocada por *Helicobacter pylori* y enfermedad de reflujo gastroesofágico.
5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que la composición comprende un inhibidor de la bomba de protones.
6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en la que las cepas de bacterias y el inhibidor de la bomba de protones están presentes juntos en una forma farmacéutica para uso oral.

FIGURA 1

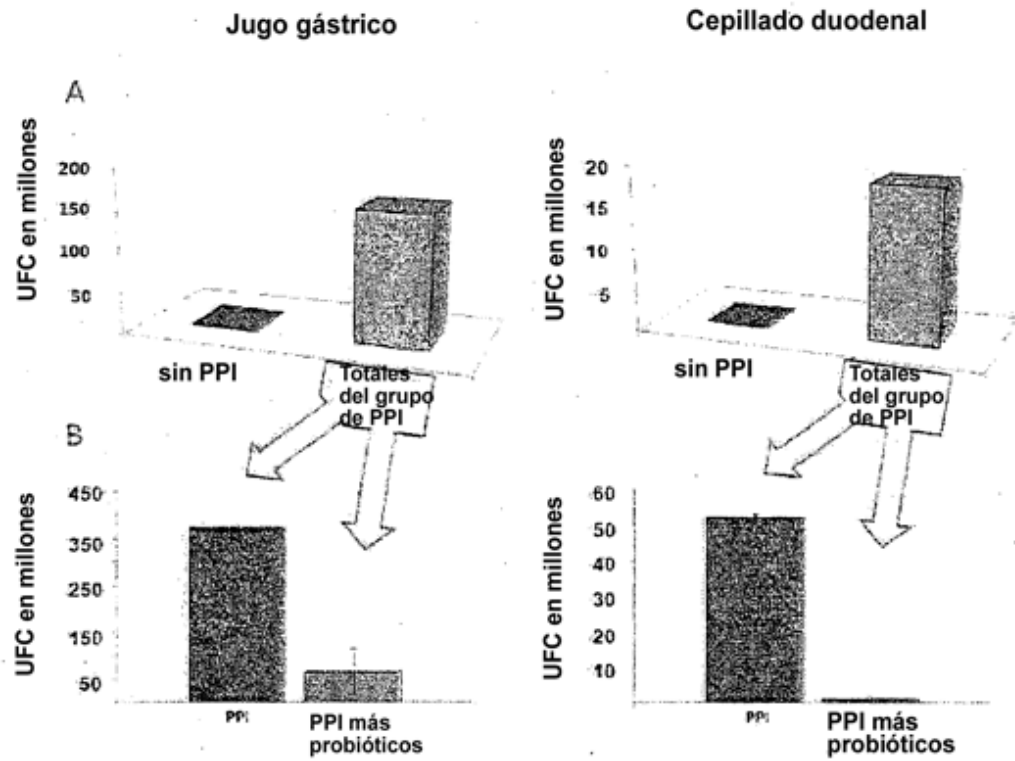


FIGURA 2

