

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011901977419A1

Publication Date

20130309

Applicant

PROBIOTICAL SPA

Title

CEPPI DI BATTERI LATTICI E/O BIFIDO BATTERI, OPZIONALMENTE
ADDIZIONATI DI N-ACETILCISTEINA E/O LISOZIMA MICROINCAPSULATO
GASTROPROTETTO, AVENTI ATTIVITA' DI INIBIZIONE/RIDUZIONE DELLA
CRESCITA DI DIFFERENTI BIOTIPI DI E.COLI, INCLUSO E.COLI O157:H7 E
DIFFERENTI BIOTIPI DI CLOSTRIDI, INCLUSO IL CLOSTRIDIUM DIFFICILE

150720

DESCRIZIONE dell'invenzione avente per titolo:

Ceppi di batteri lattici e/o bifido batteri, opzionalmente addizionati di N-acetilcisteina e/o lisozima microincapsulato gastroprotetto, aventi attività di inibizione/riduzione della crescita di differenti biotipi di E.coli, incluso E.coli O157:H7 e differenti biotipi di clostridi, incluso il Clostridium difficile.

A nome: PROBIOTICAL SpA

Di nazionalità: Italiana

Con domicilio in: Novara, Via Mattei, 3

Inventore designato: Giovanni MOGNA

La presente invenzione si riferisce a ceppi di batteri lattici e bifidobatteri aventi attività di inibizione/riduzione della crescita di differenti biotipi di *E. coli*, incluso *E. coli* O157:H7 e di differenti specie batteriche appartenenti alla famiglia delle Clostridiaceae (bastoncelli Gram positivi, anaerobi) responsabili di fenomeni putrefattivi e di gravi infezioni intestinali (*Clostridium difficile*).

Inoltre, la presente invenzione si riferisce a una composizione farmaceutica o alimentare o un integratore o un dispositivo medico comprendente almeno uno dei detti ceppi di batteri lattici e bifidobatteri,

opzionalmente in combinazione con acetilcisteina e/o lisozima.

E' noto che *Escherichia coli* - abbreviato *E. coli* - è la specie più nota del genere *Escherichia*: al suo interno si distinguono almeno 171 sierotipi caratterizzati da diverse combinazioni degli antigeni O, H, K, F. È una delle specie principali di batteri che vivono nella parte inferiore dell'intestino di animali a sangue caldo (uccelli e mammiferi, incluso l'uomo), e che sono necessari per la digestione corretta del cibo. La sua presenza nei corpi idrici segnala la presenza di condizioni di fecalizzazione (è il principale indicatore di contaminazione fecale, insieme agli enterococchi).

Il genere *Escherichia*, insieme altri generi quali ad esempio *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Serratia*, vengono raggruppati assieme sotto il nome di coliformi. Tecnicamente il "gruppo dei coliformi" comprende batteri aerobi e anaerobi non sporigeni.

Anche se rappresenta un comune abitante dell'intestino e ha un ruolo fondamentale nel processo digestivo, ci sono situazioni in cui *E. coli* può provocare malattie nell'uomo e negli animali. Alcuni ceppi di *E. coli* sono l'agente eziologico di malattie intestinali e extra-intestinali come infezioni del tratto urinario, meningite, peritonite, setticemia e polmonite. Alcuni ceppi di *E. coli* sono tossigenici, producono cioè

tossine che possono essere causa tra l'altro di diarrea. La dissenteria da *E. coli* è una comune tossinfezione alimentare, poiché viene contratta principalmente da alimenti contaminati. La contaminazione può avvenire da carni infette non adeguatamente cotte, da latte non pastorizzato e formaggi derivati, e da altri alimenti contaminati da feci. *E. coli* produce quattro tipi di tossine che si distinguono, per la diversa sensibilità al trattamento termico, in termolabile e termostabile, e per l'azione tossigena (tossine Shiga e tossine emolitiche, HlyA).

La tossina termolabile, denominata LT, è molto simile nella struttura e nelle funzioni alla tossina del colera. Essa contiene una subunità 'A' e cinque subunità 'B' in un'olotossina. Le subunità B contribuiscono all'aderenza e all'entrata della tossina nelle cellule intestinali dell'ospite, dove la subunità A stimola le cellule a rilasciare acqua, provocando diarrea.

Un "ceppo" di *E. coli* è un gruppo con caratteristiche particolari in grado di renderlo riconoscibile da altri ceppi di *E. coli*, analogamente a come si riescono a distinguere animali appartenenti a razze diverse. Diversi ceppi di *E. coli* vivono in differenti specie animali, così è possibile stabilire se il materiale

fecale nelle acque proviene, ad esempio, da uomini o da uccelli.

Nuovi ceppi di *E. coli* sorgono continuamente dal processo biologico naturale della mutazione, e alcuni di questi ceppi hanno caratteristiche che possono essere nocive per un animale ospite. Sebbene nella maggior parte degli umani adulti un ceppo patogeno non provocherebbe probabilmente altro che diarrea, e potrebbe non dare alcun sintomo, in bambini piccoli o in persone malate o debilitate da malattie recenti, o in persone sotto particolari cure, un nuovo ceppo potrebbe provocare malattie serie e persino la morte. Un esempio di ceppo particolarmente virulento di *E. coli* è *E.coli* O157:H7.

I ceppi di *E. coli* enteroemorragico sono i principali responsabili di malattia nei paesi industrializzati. Il sierotipo principalmente responsabile di queste malattie è *E. coli* O157:H7.

L'*E. coli* O157: H7 o *Escherichia coli* enteroemorragico o EHEC è un ceppo entero-emorragico del batterio *Escherichia coli* che è causa di malattie a trasmissione alimentare. L'infezione porta spesso a diarrea emorragica e, occasionalmente, a insufficienza renale, la sindrome emolitica uremica (UES), soprattutto nei giovani, nei bambini e negli anziani.

La trasmissione avviene attraverso la via oro-fecale, e la maggior parte dei casi di malattia sono associati all'assunzione alimentare di cibi crudi o poco cotti, contaminati dalla terra o da acque contaminate, o al consumo di verdure inquinate da queste acque.

Nei ruminanti esso vive da commensale nell'intestino, ma non provoca patologia per la scarsità dei recettori verso la tossina prodotta dal batterio.

In riferimento al genere *Clostridium* è noto che molti alimenti contengono tali batteri responsabili dei processi di degradazione degli stessi e che, se ingeriti con la dieta raggiungono l'intestino, sono in grado di modificare la composizione della microflora instaurando fenomeni putrefattivi.

Gli alimenti generalmente responsabili di tali tossinfezioni alimentari sono le carni fresche contaminate in particolare da *Clostridium perfringens*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans*, ecc.) in grado di idrolizzare gli zuccheri formando sostanze maleodoranti come indolo, ammoniaca, mercaptani.

Il pesce, viceversa, può essere attaccato da un'altra specie di *Clostridium*, *C. botulinum* che può svilupparsi e produrre una tossina anche a basse temperature (4°C). Tra i Clostridi più pericolosi per l'uomo figura il *Clostridium difficile* in grado di produrre enterotossine

responsabili di casi di diarrea emorragica, colite pseudomembranosa con gravi complicazioni come la perforazione, setticemia e morte. Il batterio forma spore resistenti al calore e viene trasmesso da persona a persona attraverso la via oro-fecale.

Generalmente la patogenesi da *C. difficile* è associata all'uso di antibiotici che provocano marcato squilibrio della microflora intestinale facendo prevalere le specie putrefacenti a scapito di quelle ad attività fermentativa.

Il *C. difficile* è onnipresente, in particolare in ambiente ospedaliero, ed è in grado di colonizzare l'intestino di una piccola percentuale di individui sani (circa il 5%). L'uso di antibiotici è associato al suo sviluppo eccessivo e alle sue gravi manifestazioni patologiche dovute alla resistenza alla maggior parte degli antibiotici. Le spore ingerite, superata la barriera gastrica, si insediano nel colon dove germinano ed evolvono nella forma vegetativa, che per moltiplicazione binaria genera una popolazione numerosa responsabile delle molteplici forme patologiche particolarmente grave negli anziani.

Si stima che attualmente questo organismo infetti oltre il 30% dei soggetti ricoverati negli ospedali degli Stati Uniti.

I batteri probiotici (lattobacilli e bifidobatteri) sono microorganismi che conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite e per questo sono comunemente consumati da un gruppo sempre piu' ampio di persone che scelgono prodotti alimentari, prodotti fermentati del latte, yogurt e integratori contenenti batteri probiotici.

Pertanto rimane la necessita' di poter disporre di batteri probiotici in grado di colonizzare l'intestino e di apportare effetti benefici all'ospite. In particolare, rimane la necessita' di poter disporre di batteri probiotici in grado di prevalere sulle specie patogene con conseguenti benefici salutistici. Ancora piu' in particolare rimane la necessita' di poter disporre di batteri probiotici in grado di prevenire e/o curare infezioni e/o patologie connesse ai batteri patogeni.

A seguito di un'intensa attivita' di ricerca, la Richiedente ha sorprendentemente trovato che selezionati batteri sono in grado di dare un'adeguata risposta alle sopra citate necessita'.

La Richiedente ha, inoltre, sorprendentemente trovato che utilizzando la N-acetilcisteina, avente la caratteristica di sciogliere i biofilm batterici normalmente prodotti dai germi patogeni a loro difesa, è

molto più efficace l'azione batteriocinica dei ceppi probiotici selezionati.

Inoltre ha anche sorprendentemente trovato che utilizzando una particolare tecnica di microincapsulazione in matrice lipidica, preferibilmente di natura vegetale, che conferisce una gastroprotezione al lisozima, quest'ultimo è in grado di passare indenne attraverso il tratto gastroduodenale, attivarsi a livello di colon ed estrinsecare la sua azione litica nei confronti delle spore di tutte le specie di clostridi. Come conseguenza di tale attività idrolitica sulle spore di *Clostridium* genere ed in particolare *C. difficile*, nel momento della loro germinazione, non si verifica la formazione di cellule vegetative responsabili dell'aumento della popolazione patogena e della formazione delle tossine.

L'azione combinata dei ceppi probiotici ad attività fermentativa e ad effetto barriera nei confronti delle specie putrefacenti, compreso i clostridi, con quella diretta del lisozima che impedisce di fatto la germinazione delle spore di clostridi, costituisce anche nei confronti di questo pericoloso gruppo di patogeni una straordinaria ed innovativa strategia.

La combinazione complessiva (batteri probiotici produttori di batteriocine + N-acetilcisteina che

scioglie i biofilm batterici + lisozima microincapsulato che blocca la germinazione delle spore) costituisce un innovativo strumento in grado di contrastare un gran numero di ceppi patogeni contro i quali fino ad oggi non c'era una strategia efficace di contrasto.

Forma oggetto della presente invenzione una selezione di ceppi di batteri lattici e bifidobatteri che sono in grado di produrre batteriocine e/o metaboliti e/o acqua ossigenata per uso nel trattamento preventivo e/o curativo di infezioni e/o patologie connesse a vari patogeni compreso *E. coli*, ed in particolare *E. coli* O157:H7 e/o germi putrefattivi appartenenti alla famiglia delle Clostridiaceae, *Clostridium difficile* compreso, anche in combinazione con acetilcisteina e/o lisozima microincapsulato gastroprotetto in matrice lipidica. In una realizzazione preferita, la matrice lipidica è di origine vegetale avente un punto di fusione compreso da 30 a 80°C.

Forma un altro oggetto della presente invenzione una composizione farmaceutica o alimentare o un integratore o un dispositivo medico comprendente almeno uno dei detti ceppi di batteri per uso nel trattamento preventivo e/o curativo di infezioni e/o patologie connesse a patogeni *E. coli*, incluso *E. coli* O157:H7 e/o

germi putrefattivi appartenenti alla famiglia delle Clostridiaceae, incluso *Clostridium difficile*.

Forma un altro oggetto ancora della presente invenzione una composizione farmaceutica o alimentare o un integratore o un dispositivo medico comprendente almeno uno dei detti ceppi di batteri in combinazione con N-acetilcisteina.

Forma un altro oggetto ancora della presente invenzione una composizione farmaceutica o alimentare o un integratore o un dispositivo medico comprendente almeno uno dei detti ceppi di batteri in combinazione con il lisozima. In una realizzazione preferita, il lisozima è microincapsulato.

Forma un altro oggetto ancora della presente invenzione una composizione farmaceutica o alimentare o un integratore o un dispositivo medico comprendente almeno uno dei detti ceppi di batteri in combinazione con N-acetilcisteina e con lisozima. In una realizzazione preferita, il lisozima è microincapsulato con una matrice lipidica. In una realizzazione preferita, la matrice lipidica è di origine vegetale avente un punto di fusione compreso da 30 a 80°C.

Altre realizzazioni preferite della presente invenzione sono descritte nel prosieguo della descrizione e saranno rivendicate nelle unite rivendicazioni dipendenti.

Elenco delle Tabelle e Figure

La Tabella 1 riporta una lista di 14 ceppi di lattobacilli, 4 ceppi di bifidobatteri e 2 ceppi di streptococchi che sono stati testati contro 4 biotipi di *E coli*.

Le Tabelle 2-5 riportano i ceppi che producono batteriocine e/o metaboliti e/o acqua ossigenata e che sono in grado di contrastare, inibire o ridurre la crescita di batteri patogeni appartenenti alla specie *E. coli*, incluso *E. coli* O157:H7.

La Figura 1 mostra la tecnica utilizzata per testare i ceppi oggetto della presente invenzione.

La Figura 2 mostra gli aloni di inibizione formati dai ceppi di Tabella 4, contro *E. coli* (ATCC 8739 ATCC 10536 ATCC 35218 ATCC 25922) e sierotipo O157:H7 (CQ 9485).

La Richiedente ha condotto un'intensa attivita' di ricerca e screening partendo da un gruppo molto vasto di ceppi di batteri. Al termine di questa attivita', la Richiedente ha trovato e selezionato un gruppo di ceppi di batteri appartenenti a una specie scelta dal gruppo

comprendente o, alternativamente, consistente di *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus* e *Bifidobacterium breve*. I ceppi selezionati sono in grado di produrre batteriocine e/o metaboliti e/o acqua ossigenata, sostanze queste che sono in grado di contrastare, inibire o ridurre i batteri patogeni in modo efficace. Questi ceppi trovano valida applicazione e uso nel trattamento preventivo e/o curativo di infezioni e/o patologie connesse a batteri patogeni gram-negativi.

I batteri patogeni sono scelti dal gruppo comprendente i coliformi e clostridi. I coliformi sono un gruppo di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. In particolare, i coliformi sono batteri a forma di bastoncino, gram-negativi, asporigeni, aerobi ed anaerobi facoltativi, che fermentano il lattosio, con produzione di gas ed acidi, a 35-37 °C in 48 ore e possiedono l'enzima beta-galattosidasi. Sono organismi ubiquitari, alcuni sono presenti nel materiale fecale, e sono quindi utilizzati come indicatori di inquinamento sia delle acque sia degli alimenti, altri sono di origine acquatica o tellurica. Il gruppo comprende oltre 50 generi, tra cui

Citrobacter, *Enterobacter*, preferibilmente *Enterobacter cloacae*, *Escherichia*, preferibilmente *E. coli*, *Hafnia*, *Klebsiella*, preferibilmente *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia* e *Yersinia*. Altri patogeni sempre d'interesse nel contesto della presente invenzione appartengono alla famiglia delle Clostridiaceae, con particolare riferimento al *C. difficile*. Attività antagonista viene esercitata anche contro specie scelte dal gruppo comprendente *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejunii* e *Helicobacter pylori*.

Forma oggetto della presente invenzione una composizione farmaceutica o alimentare o un integratore o un dispositivo medico comprendente almeno un ceppo di batteri appartenente a una specie scelta dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium breve* che è in grado di produrre batteriocine e/o metaboliti e/o acqua ossigenata per uso nel trattamento preventivo e/o curativo di infezioni e/o patologie connesse a patogeni quali *E. coli* e *C. difficile*. Il ceppo prescelto e/o le varie combinazioni possibili dei sopracitati ceppi (vedi anche Tabelle 1-5, sotto riportate) per detto scopo può

o possono essere utilizzato/i da solo/i o in combinazione con N-acetilcisteina o in combinazione con lisozima microincapsulato o in combinazione con N-acetilcisteina e lisozima microincapsulato.

In una realizzazione preferita, il patogeno *E. coli* e' scelto tra *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O104:H4.

La Tabella 1 riporta una lista di 14 ceppi di lattobacilli, 4 ceppi di bifidobatteri e 2 ceppi di streptococchi che sono stati testati contro 4 biotipi di *E coli*. I valori sono espressi come alone di inibizione (mm) .

Tabella 1

Species	Ceppo	Deposito N°	Attivita' antimicrobica contro <i>E. coli</i>			
			ATCC 8739	ATCC 10536	ATCC 35218	ATCC 25922
<i>B. animalis subsp.</i>	BS01	LMG P-21384	+	+	-	-
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604	++	++	+	+
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706	++	++	+	+
<i>B. longum</i>	BL05	DSM 23234	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i>	LPC00	LMG P-21380	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i>	LPC08	DSM 21718	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605	++	++	++	+++
<i>L. rhamnosus</i>	LGG	ATCC 53103	-	+	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981	++	++	+	+
<i>L. fermentum</i>	LF10	DSM 19187	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021	++	++	++	+
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020	+	++	+	+
<i>L. plantarum</i>	LP03	LMG P-21022	++	+++	-	+
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023	++	+++	-	+

<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980	++	++	+++	+++
<i>L. delbr. subsp.</i>	LDD01	DSM 22106	++	+++	++	+++
<i>L. reuteri</i>	LRE01	DSM 23877	+	+	-	-
<i>L. reuteri</i>	LRE03	DSM 23879	+	+	-	-
<i>S. thermophilus</i>	YO2	DSM 16590	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i>	YO3	DSM 16591	-	-	-	-

I batteri testati in Tabella 1, presi singolarmente o in combinazione tra loro, trovano valida applicazione nel contesto della presente invenzione.

In una realizzazione preferita, i ceppi di batteri sono scelti dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di (Tabella 2).

Tabella 2

Species	Ceppo	Deposito N°
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020
<i>L. plantarum</i>	LP03	LMG P-21022
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106
<i>L. reuteri</i>	LRE01	DSM 23877
<i>L. reuteri</i>	LRE03	DSM 23879

I ceppi di Tabella 2 sono in grado di produrre batteriocine e/o metaboliti e/o acqua ossigenata che sono in grado di contrastare, inibire o ridurre la crescita di batteri patogeni appartenenti alla specie *E. coli*, incluso *E. coli* O157:H7.

I ceppi di Tabella 2 sono stati singolarmente testati al fine di individuare la loro capacita' di antagonizzare (inibire la crescita o ridurre il numero di uno o più specie/generi microbici dannosi o patogeni), come riportato nelle quattro colonne di destra in Tabella 1.

Tutti i ceppi descritti e/o rivendicati nella presente domanda di brevetto sono stati depositati in accordo al Trattato di Budapest e sono messi a disposizione del pubblico su richiesta alla competente Autorità di Deposito.

In un'altra realizzazione preferita, i ceppi di batteri sono scelti dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di (Tabella 3).

Tabella 3

Species	Ceppo	Deposito N°
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981

<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020
<i>L. plantarum</i>	LP03	LMG P-21022
<i>L. plantarum</i>	LP04	LMG P-21023
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106

In un'ulteriore realizzazione preferita, i ceppi di batteri sono scelti dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente di (Tabella 4).

Tabella 4

Species	Ceppo	Deposito N°
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR04	DSM 16605
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. plantarum</i>	LP02	LMG P-21020
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106

La composizione della presente invenzione trova valida applicazione per uso nel trattamento preventivo e/o curativo di infezioni e/o patologie connesse ai patogeni *E. coli* e *H. pylori* e *Clostridium difficile*.

In una realizzazione preferita la composizione della presente invenzione comprende o, alternativamente, consiste di otto ceppi, come riportato in Tabella 4.

In un'altra realizzazione preferita la composizione della presente invenzione comprende o, alternativamente, consiste di uno sino a sei ceppi, preferibilmente di due sino a cinque ceppi, ancor piu' preferibilmente di tre o quattro ceppi scelti dal gruppo comprendente o, alternativamente, consistente dei ceppi riportati in Tabella 4.

In una realizzazione preferita la composizione comprende o, alternativamente, consiste dei sei ceppi, come riportato in Tabella 5.

Tabella 5

Species	Ceppo	Deposito N°
<i>B. breve</i>	BR03	DSM 16604
<i>B. breve</i>	B632	DSM 24706
<i>L. rhamnosus</i>	LR06	DSM 21981
<i>L. plantarum</i>	LP01	LMG P-21021
<i>L. pentosus</i>	LPS01	DSM 21980
<i>L. delbr. subsp. Delbrueckii</i>	LDD01	DSM 22106

Nella composizione della presente invenzione, la miscela di ceppi di batteri e' presente in una quantità compresa

da 0,5 a 20% in peso, rispetto al peso totale della composizione, preferibilmente da 2,5 a 10%.

In una realizzazione preferita, la composizione può inoltre comprendere almeno una fibra prebiotica e/o carboidrati ad azione bifidogena.

La fibra prebiotica che trova applicazione nella composizione della presente invenzione é una fibra che dev'essere utilizzata dai ceppi di batteri presenti nella composizione, ma non dai patogeni che si intendono antagonizzare.

Inoltre, la composizione può comprendere anche altri ingredienti e/o componenti attivi quali vitamine, minerali, peptidi bioattivi, sostanze ad attività antiossidante, ipocolesterolemizzante, ipoglicemizzante, antiinfiammatoria, anti edulcoranti in una quantità in peso generalmente compresa da 0,001% a 20% in peso, preferibilmente da 0,01% a 5%, comunque dipendente dal tipo di componente attivo e dalla sua eventuale dose giornaliera consigliata, rispetto al peso totale della composizione.

La composizione alimentare oggetto della presente invenzione, ad esempio una composizione simbiotica, oppure un integratore o una composizione farmaceutica o un dispositivo medico, viene preparata secondo le

tecniche e le apparecchiature note all'esperto del settore.

In una realizzazione preferita, la composizione contiene batteri in una concentrazione compresa da 1×10^6 a 1×10^{11} UFC/g di miscela, preferibilmente da 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/g di miscela.

In una realizzazione preferita, la composizione contiene batteri in una concentrazione compresa da 1×10^6 a 1×10^{11} UFC/dose, preferibilmente da 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/dose.

La dose può essere compresa da 0,2 a 10 g, ad esempio e' di 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g.

I batteri probiotici utilizzati nella presente invenzione possono essere in forma solida, in particolare sotto forma di polvere, polvere disidratata o liofilizzata.

Tutte le composizioni della presente invenzione sono preparate secondo le tecniche note all'esperto del settore e mediante l'impiego di apparecchiature note.

In una realizzazione preferita, la composizione oggetto della presente invenzione comprende inoltre l'acetilcisteina (o N-acetilcisteina) che è un derivato N-acetilato dell'amminoacido cisteina e lisozima microincapsulato gastroprotetto in matrice lipidica, come sopra descritto.

La Richiedente ha trovato che l'uso di acetilcisteina in associazione a uno o piu' dei ceppi di batteri, descritti nelle Tabelle 1-5 o nelle varie realizzazioni preferite sopra citate, e' in grado di sciogliere il biofilm batterico prodotto dai batteri patogeni stessi e che viene usato dagli stessi patogeni come protezione. In pratica si e' visto che i batteri patogeni sono in grado di formare un rivestimento (biofilm) protettivo intorno alle cellule. Il biofilm rende le cellule dei patogeni piu' difficilmente attaccabili e maggiormente protette. L'acetilcisteina e' in grado di penetrare il biofilm delle cellule e di scioglierlo facilitando l'attacco delle cellule patogene mediante le batteriocine e/o i metaboliti e/o l'acqua ossigenata prodotta dai ceppi dei batteri oggetto della presente invenzione.

La quantita' di acetilcisteina presente nella composizione oggetto della presente invenzione da somministrare e' compresa da 10 a 1.000 mg/die, preferibilmente e' compresa da 200 a 600 mg/die. L'acetilcisteina, preferibilmente in forma solida, viene miscelata con i batteri probiotici, preferibilmente in forma solida o liofilizzata, mediante le tecniche e le apparecchiature note agli esperti del settore.

La quantità di lisozima microincapsulato presente nella composizione oggetto della presente invenzione da somministrare è compresa da 10 a 2.000 mg/die, preferibilmente è compresa da 400 a 1.000 mg/die. Il lisozima microincapsulato, preferibilmente in forma solida, viene miscelato con i batteri probiotici, preferibilmente in forma solida o liofilizzata, mediante le tecniche e le apparecchiature note agli esperti del settore.

La quantità di acetilcisteina e lisozima microincapsulato presenti nella composizione oggetto della presente invenzione da somministrare sono rispettivamente compresi da 10 a 1.000 mg/die, preferibilmente da 200 a 600 mg/die, mentre il lisozima microincapsulato è compreso da 10 a 2.000 mg/die, preferibilmente da 400 a 1.000 mg/die vengono miscelati con i batteri probiotici in forma solida, preferibilmente in forma solida o liofilizzata, mediante le tecniche e le apparecchiature note agli esperti del settore.

Parte sperimentale

L'attività antimicrobica di 14 ceppi di lattobacilli, 4 ceppi di bifidobatteri e 2 ceppi di streptococchi è stata testata contro 4 biotipi di *E coli*: ATCC 8739,

ATCC 10536, ATCC 35218 e ATCC 25922, quest'ultimi sono disponibili al pubblico. I valori sono stati espressi come alone di inibizione (mm). I dati sono riportati in Tabella 1.

Per determinare l'attività antimicrobica è stato adottato il protocollo riportato in Santini et al. (2010) *Characterization of probiotic strains: an application as feed additives in poultry against Campylobacter jejuni*. Int J Food Microbiol. 2010 Jul 31;141 Suppl 1:S98-108. Epub 2010 Apr 8.

I ceppi di batteri elencati in Tabella 1 sono stati coltivati in un brodo MRS a 37°C per 18 ore utilizzando un sistema per generare un'atmosfera anaerobica (GasPack System). I differenti biotipi di *E. coli* sono stati attivati in Tryptic Soy Broth (TBS) e incubati aerobicamente a 37°C per 18 ore. Prima degli esperimenti i ceppi sono stati subcoltivati almeno tre volte. Per lo spot agar test (test noto all'esperto del settore) è stata eseguita la seguente procedura. In pratica, 10 microlitri di una coltura dei sopra citati ceppi di lattobacilli cresciuti a 37°C overnight (brodo coltura + terreno) sono stati posti (spottati) sulla superficie di una piastra agarizzata (contenente il terreno TBS agarizzato). La piastra è stata incubata per 18 ore a 37°C per consentire lo sviluppo del ceppo (spot). I biotipi di *E. Coli* (0,1%) sono stati incubati in Tryptic

Soy soft agar e disposti sugli spot delle piastre di cui sopra. Le piastre, una volta che il top agar si è solidificato, sono state invertite e incubate in condizioni di aerobiosi a 37°C per 24 ore. Ciascun saggio è stato replicato due volte. Dopo 24 ore le piastre sono state analizzate visivamente per osservare e determinare le zone di inibizione. La presenza di una zona di inibizione intorno allo spot dei lattobacilli uguale o maggiore di 2 mm è stata considerata come un risultato positivo (vedi Figura 1 per un riassunto del metodo impiegato).

Per i bifidobatteri è stata utilizzata la stessa tecnica usata per i lattobacilli.

Tecnica del Top agar:

Ceppo E. coli strisciato su piastra petri agarizzata (terreno McConkei Agar) incubata in aerobiosi 24h.

Vengono prelevate 1 o 2 colonie e stemperate in 1ml di acqua sterile sino a raggiungere torbidità pari al valore di 0,5 della scala McFarland (scala nota riportata in tabelle di riferimento).

100 ul di tale sospensione sono inoculati in 50ml di terreno soft-agar (Laptg allo 0,7% agar) alla temperatura di circa 45°C così da tenerlo liquido.

3 ml di soft-agar sono versati sulla superficie delle piastre precedentemente preparate con i lattobacilli cresciuti.

Fare asciugare ed incubare a 37°C aerobiosi per 18-20h

Lettura risultati con misurazione alone di inibizione.

Risultati

A. Screening in vitro dei ceppi della presente invenzione contro i biotipi di *E.coli*.

L'attività di inibizione della crescita degli *E. coli* è stata determinata utilizzando le colture batteriche vive dei ceppi riportati in Tabella 1. Risultati positivi si sono ottenuti per tutti i ceppi riportati in Tabella 2. In particolare, si sono distinti i ceppi riportati in Tabelle 3-5 per il loro forte effetto di inibizione/riduzione della crescita di tutti i biotipi di *E. coli* testati.

B. Selezione dei ceppi della presente invenzione aventi un'attività di inibizione contro il tossinogenico *E. coli* O157:H7.

I ceppi riportati in Tabella 1 sono stati testati anche contro *E. coli* O157:H7. L'attività di inibizione della crescita degli *E. coli* O157:H7 è stata determinata utilizzando le colture batteriche vive dei ceppi riportati in Tabella 1.

Come mostrato in Figura 2, solo 5 ceppi testati hanno mostrato la capacità di inibire/ridurre la crescita dei biotipi di *E. coli* testati, incluso l'enteroemorragico *E. coli* O157:H7 (CQ9485). In Figura 2, i risultati sono espressi come deviazione standard (SD) degli aloni di inibizione calcolata su tre differenti saggi e considerando un cut off di 2 mm.

Dai dati sperimentale di cui sopra si evince che 6 lattobacilli e 2 bifidobatteri (Tabella 4) mostrano un'attività di inibizione/riduzione *in vitro* contro la crescita di quattro ceppi di *E. coli* (ATCC 8739 ATCC 10536 ATCC 35218 ATCC 25922) responsabili della produzione di una larga varietà di ammine biogene quali ad esempio mercaptano, istamina, cadaverina, putrescina e tiramina per decarbossilazione degli amminoacidi. Queste ammine biogene sono considerate responsabili di pericolosi fenomeni di intossicazione sistemica. Inoltre, la presenza di nitriti e nitrati può formare N-nitrosammine che mostrano una forte attività mutagenica che può causare alcuni tipi di cancro. Infine, i dati sperimentali di cui sopra mostrano che cinque ceppi dei batteri testati sono attivi contro il ceppo patogeno di *E. coli* O157:H7 (CQ9485) che è in grado di produrre una o più delle tossine Shiga che sono molto pericolose per la salute umana e che può portare anche alla morte.

Rivendicazioni

1. Una composizione farmaceutica o alimentare o un integratore o un dispositivo medico comprendente almeno un ceppo di batteri appartenente a una specie scelta dal gruppo comprendente: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium breve* che è in grado di produrre batteriocine e/o metaboliti e/o acqua ossigenata per uso nel trattamento preventivo e/o curativo di infezioni e/o patologie connesse a patogeni appartenenti alla specie *E. coli* e *Clostridium difficile*.

2. La composizione secondo la rivendicazione 1, in cui il patogeno *E. coli* è scelto tra *E. coli* O157:H7 e *E. coli* O104:H4.

3. La composizione secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il patogeno *E. coli* è scelto dal gruppo comprendente *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 35218 e *E. coli* ATCC 25922.

4. La composizione secondo la rivendicazione 1, in cui il ceppo di batteri è scelto dal gruppo comprendente:

- *B. breve* BR03 DSM 16604
- *B. breve* B632 DSM 24706
- *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605
- *L. rhamnosus* LR06 DSM 21981
- *L. plantarum* LP01 LMG P-21021
- *L. plantarum* LP02 LMG P-21020
- *L. plantarum* LP03 LMG P-21022
- *L. plantarum* LP04 LMG P-21023
- *L. pentosus* LPS01 DSM 21980
- *L. delbr. subsp. delbrueckii* LDD01 DSM 22106
- *L. reuteri* LRE01 DSM 23877
- *L. reuteri* LRE03 DSM 23879

5. La composizione secondo la rivendicazione 4, in cui i ceppi di batteri sono scelti dal gruppo comprendente:

- *B. breve* BR03 DSM 16604
- *B. breve* B632 DSM 24706
- *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605
- *L. rhamnosus* LR06 DSM 21981
- *L. plantarum* LP01 LMG P-21021
- *L. plantarum* LP02 LMG P-21020
- *L. pentosus* LPS01 DSM 21980
- *L. delbr. subsp. delbrueckii* LDD01 DSM 22106

6. La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui detta composizione comprende inoltre acetilcisteina.

7. La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui detta composizione comprende inoltre lisozima microincapsulato in una matrice lipidica, preferibilmente di origine naturale avente un punto di fusione compreso da 30 a 80°C.

8. La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui detta composizione comprende inoltre acetilcisteina e lisozima microincapsulato in una matrice lipidica, preferibilmente di origine naturale avente un punto di fusione compreso da 30 a 80°C.

9. La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui detta composizione comprende inoltre almeno una fibra prebiotica e/o carboidrati ad azione bifidogena.

150720

-1-

"Bacteri contro E. coli 0157"

OK 26/1/11

1/4 h

Claims

1. A pharmaceutical or food composition or a supplement or a medical device including at least one bacterial strain belonging to a species selected from the group comprising: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium breve* which is capable of producing bacteriocins and/or metabolites and/or hydrogen peroxide for use in the preventive and/or curative treatment of infections and/or pathologies connected to pathogens belonging to the species *E. coli* and *Clostridium difficile*. ✓
2. The composition according to claim 1, wherein the pathogen *E. coli* is selected between *E. coli* 0157:H7 and *E. Coli* 0104:H4. ✓
3. The composition according to claim 1 or 2, wherein the pathogen *E. coli* is selected from the group comprising *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* ATCC 10536, *E. coli* ATCC 35218 and *E. coli* ATCC 25922. ✓
4. The composition according to claim 1, wherein the bacterial strain is selected from the group comprising:
 - *B. breve* BR03 DSM 16604
 - *B. breve* B632 DSM 24706
 - *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605✓

- *L. rhamnosus* LR06 DSM 21981
- *L. plantarum* LP01 LMG P-21021
- *L. plantarum* LP02 LMG P-21020
- *L. plantarum* LP03 LMG P-21022
- *L. plantarum* LP04 LMG P-21023
- *L. pentosus* LPS01 DSM 21980
- *L. delbr. subsp. delbrueckii* LDD01 DSM 22106
- *L. reuteri* LRE01 DSM 23877
- *L. reuteri* LRE03 DSM 23879

5. The composition according to claim 4, wherein the bacterial strains are selected from the group comprising:

- *B. breve* BR03 DSM 16604
- *B. breve* B632 DSM 24706
- *L. rhamnosus* LR04 DSM 16605
- *L. rhamnosus* LR06 DSM 21981
- *L. plantarum* LP01 LMG P-21021
- *L. plantarum* LP02 LMG P-21020
- *L. pentosus* LPS01 DSM 21980
- *L. delbr. subsp. delbrueckii* LDD01 DSM 22106

6. The composition according to any one of claims 1-5, wherein said composition further comprises acetylcysteine.

7. The composition according to any one of claims 1-5, wherein said composition further comprises lysozyme

microencapsulated in a lipid matrix, preferably of natural origin and having a melting point comprised from 30 to 80°C.

8. The composition according to any one of claims 1-5, wherein said composition further comprises acetylcysteine and lysozyme microencapsulated in a lipid matrix, preferably of natural origin and having a melting point comprised from 30 to 80°C.

9. The composition according to any one of claims 1-8, wherein said composition further comprises at least one prebiotic fibre and/or carbohydrates with bifidogenic action.

1/1

Figura 1

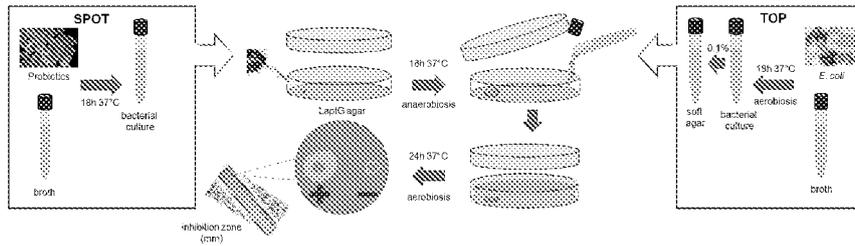


Figura 2

