



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 880**

51 Int. Cl.:
A61K 35/74 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 1/10 (2006.01)
A61P 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08703370 .0**
96 Fecha de presentación : **17.01.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2110133**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.2009**

54 Título: **Agente profiláctico y/o terapéutico para dispepsia funcional.**

30 Prioridad: **17.01.2007 JP 2007-7628**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2011

73 Titular/es: **MEIJI Co., Ltd.**
2-10, Shinsuna 1-chome,
Koto-ku, Tokyo 136-8908, JP

72 Inventor/es: **Uchida, Masayuki;**
Yamato, Shigeru;
Ariga, Hajime;
Uehara, Hirotsugu;
Amano, Tomofumi;
Morikubo, Keiko y
Yoshida, Kaori

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 367 880 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

Agente profiláctico y/o terapéutico para dispepsia funcional

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a agentes para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales, a un alimento para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales y a los usos de los productos de fermentación producidos por bacterias del ácido propiónico en la producción de los mismos.

Antecedentes de la técnica

10 Los trastornos gastrointestinales funcionales (FGID) son un grupo de trastornos gastrointestinales que no incluyen enfermedades orgánicas (cáncer de colon, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, disentería amebiana y otras). Los FGID se producen por anomalías de las funciones gastrointestinales, tales como funciones motoras y sensoriales, y desarrollan diversos síntomas tales como dolor abdominal, náuseas, vómitos, sensación de hinchazón y problemas de defecación, tales como estreñimiento y diarrea, dependiendo de la zona afectada.

15 Los FGID incluyen un total de 25 enfermedades: seis enfermedades esofágicas, tres enfermedades gastroduodenales, cinco enfermedades intestinales, dos tipos de dolor abdominal, dos enfermedades del tracto biliar, tres enfermedades rectales/anales y cuatro del área pediátrica. De éstas, por ejemplo, las enfermedades cuyo principal síntoma es el estreñimiento son las dos enfermedades siguientes, cuando se excluye el área pediátrica: síndrome del intestino irritable (IBS) (de tipo estreñimiento) y estreñimiento funcional (FC).

Los FGID no afectan al pronóstico vital. Sin embargo, los FGID reducen la calidad de vida (QOL) y aumentan los gastos médicos, y por tanto tienen un efecto significativamente desfavorable en la sociedad.

20 En las últimas décadas, se han realizado avances significativos en el estudio de las enfermedades orgánicas, e incluso a los tumores malignos ya no se les denomina enfermedades incurables. Por otro lado, todavía están en desarrollo estudios sobre las anomalías funcionales del tracto gastrointestinal. Se prevé que la prevalencia de los FGID aumentará adicionalmente en el siglo XXI en lo que se denomina la sociedad de alto estrés. Por tanto, son objetivos importantes para el futuro el esclarecimiento de la patogénesis de los FGID y el desarrollo de terapias novedosas.

25 Las anomalías funcionales del tracto digestivo inferior producen el síndrome del intestino irritable (IBS), que se incluye entre los FGID, y se sabe que su patofisiología son anomalías en la motilidad de los intestinos, principalmente del colon. Los síntomas observados incluyen dolor abdominal, molestia abdominal (caracterizada porque se alivia con la defecación), anomalías en la defecación (diarrea, estreñimiento y combinación de diarrea y estreñimiento), forma de deposición anómala (inclusión de mucosidad y dureza anómala) y sensación de hinchazón abdominal. El tiempo de tránsito intestinal se acorta en el de tipo diarrea, mientras que se prolonga el tiempo en el de tipo estreñimiento. Aunque difieren el área y el patrón contráctil, se observa un estado de motilidad intestinal potenciado en ambos tipos. Se notifica que, en comparación con los individuos sanos, los pacientes con IBS muestran respuestas anómalas al estrés, a estímulos tales como la dieta y a los agentes colinérgicos. También se sabe que el umbral de percepción para la distensión con balón ileocecal o rectal es más bajo (documento no de patente 1).

30 Los agentes convencionalmente conocidos para mejorar los síntomas del estreñimiento incluyen los que hinchan la deposición con agua para mejorar la propiedad de la deposición e inducir al deseo de defecar (laxantes incrementadores de masa) y los que estimulan directamente el movimiento intestinal, en particular, la fuerza contráctil intestinal (laxantes estimulantes). Los laxantes estimulantes tienen un efecto de defecación fuerte; sin embargo, no son adecuados para usos durante un periodo prolongado, debido a que su uso continuado da como resultado la tolerancia. Además, los métodos conocidos para tratar el IBS incluyen métodos que usan agentes anticolinérgicos para disminuir los espasmos intestinales anómalos, métodos que usan fibras dietéticas o similares para ayudar al movimiento del contenido mediante el efecto de ajustar el contenido en agua de la deposición y mediante un efecto gelificante, y métodos que usan agentes antiansiedad para aliviar los síntomas del estrés. Sin embargo, muchos de los agentes anticolinérgicos están designados como agentes peligrosos (por ejemplo, Trancolon). Además, las preparaciones de policarbofilo cálcico que ajustan el contenido en agua a través del efecto gelificante están contraindicadas en pacientes con una enfermedad abdominal aguda, hipercalcemia, insuficiencia renal, nefrolitiasis y otras. Por tanto, se espera el desarrollo de agentes preventivos o terapéuticos novedosos altamente seguros para trastornos gastrointestinales funcionales.

35 Se conocen los productos de fermentación por *Propionibacterium freudenreichii* como productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico, y se ha notificado que son eficaces en la proliferación de diversas bifidobacterias, en la mejora de enfermedades intestinales inflamatorias y otras (documento de patente 1). Además, se ha encontrado también que el ácido 1,4-dihidroxi-2-napftoico (DHNA), un componente de los productos de fermentación de las bacterias del ácido propiónico, tiene el efecto de estimular la proliferación bifidobacteriana (documento de patente 2), el efecto de prevenir y tratar enfermedades óseas metabólicas (documento de patente 3), y el efecto de aliviar los

síntomas de la molestia abdominal de la intolerancia a la leche tras la ingestión de leche (documento de patente 4).

[Documento de patente 1] documento de publicación internacional WO 2005/099725.

[Documento de patente 2] publicación denominada *Kokai* de solicitud de patente japonesa n.º (JP-A) H08-98677 (solicitud de patente japonesa publicada, sin examinar).

5 [Documento de patente 3] documento de publicación internacional WO 01/28547.

[Documento de patente 4] documento de publicación internacional WO 03/016544.

[Documento no de patente 1] "Saishin Naikagaku Taikei, Progress 8, Shoukakan Shikkan (Latest Internal Medicine Outline, Progress 8, Gastrointestinal Diseases)", Eds., Imura H. *et al.*, págs. 51, 1997, Nakayama Shoten.

Descripción de la invención

10 [Problemas que van a resolverse mediante la invención]

Un objetivo de la presente invención es proporcionar agentes altamente seguros para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales.

[Medios para resolver los problemas]

15 Los presentes inventores realizaron estudios dedicados, y como resultado, descubrieron que los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico tienen un efecto preventivo/terapéutico sobre los trastornos gastrointestinales funcionales en estudios *in vitro* y en estudios que usan pacientes con síndrome del intestino irritable, y completaron la presente invención.

20 Específicamente, se descubrió en los estudios *in vitro* que los productos tienen un efecto de aumentar la frecuencia de contracción intestinal, sin cambiar la fuerza contráctil intestinal, de una manera específica del colon distal. Además, se descubrieron los efectos de mejorar el estado de defecación, el estado abdominal general y la QOL relacionada con la salud en pacientes con síndrome del intestino irritable. Además, es posible ingerir una gran cantidad de producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico. Por tanto, se espera que los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico tengan un efecto preventivo/terapéutico en los trastornos gastrointestinales funcionales de manera segura.

25 Por tanto, la presente invención comprende lo siguiente:

[1] un agente para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, que comprende como principio activo un producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico y/o un producto procesado del mismo;

[2] el agente según [1] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, en el que la bacteria del ácido propiónico es una bacteria que pertenece al género *Propionibacterium*;

30 [3] el agente según [2] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, en el que la bacteria que pertenece al género *Propionibacterium* es *Propionibacterium freudenreichii*;

[4] el agente según [3] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, en el que *Propionibacterium freudenreichii* es *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115);

35 [5] el agente según una cualquiera de [1] a [4] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, en el que el producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico es un producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico;

[6] el agente según una cualquiera de [1] a [5] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, en el que el trastorno gastrointestinal funcional es uno o una combinación de una pluralidad del grupo que consiste en síndrome del intestino irritable y estreñimiento funcional;

40 [7] un alimento para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, que comprende un agente según una cualquiera de [1] a [6] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional;

[8] uso de un producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico en la fabricación de un agente según una cualquiera de [1] a [6] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional;

45 [9] uso de un producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico en la fabricación del alimento según [7] para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional; y

[10] un método para prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, que comprende administrar un producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico y/o un producto procesado del mismo.

[Efectos de la invención]

Los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales permiten la prevención y/o el tratamiento seguros de trastornos gastrointestinales funcionales, especialmente del síndrome del intestino irritable, el estreñimiento espástico y el estreñimiento funcional.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra gráficos representativos obtenidos cuando se midió el efecto del producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico en el músculo liso intestinal. Se muestra un ejemplo de los gráficos medidos observados cuando se añadió el producto de fermentación del suero de la leche por propionibacterias al colon distal en el ejemplo 1.

10 La figura 2 es un cuestionario sobre estados de defecación. Esto se usó en el ejemplo 4.

La figura 3 es un cuestionario sobre estados abdominales generales. Esto se usó en el ejemplo 4.

15 La figura 4 muestra el resultado del cuestionario SF-36 del ejemplo 4. Para las puntuaciones de cada área, se muestra la comparación de antes y después de la ingestión de "principio activo" en la fila superior, y se muestra la comparación de antes y después de la ingestión de "placebo" en la fila inferior como razón de números de caso (se observó mejora en la puntuación: "Mejóro" (sombreado); no se observó cambio: "Sin cambio" (cuadrado abierto)); se observó empeoramiento: "Empeoró" (cuadrado cerrado)).

La figura 5 muestra el resultado del cuestionario SF-36 del ejemplo 4. Se determinó el cambio de las puntuaciones antes y después de la ingestión para cada área, y se calculó la diferencia entre antes y después de la ingestión para el "placebo" (cuadrado abierto) y el "principio activo" (cuadrado cerrado).*: $p < 0,05$ (prueba de la t de Student)

20 Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento se describirá la presente invención más específicamente, pero no debe interpretarse que se limita a las realizaciones preferidas descritas más adelante. Puede realizarse cualquier cambio dentro del alcance de la presente invención.

25 El producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico, que es un principio activo de los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales, puede producirse según métodos de producción conocidos, tales como los descritos en el documento de publicación internacional n.º WO 03/016544. En el presente documento, el "producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico" se refiere al cultivo *per se* obtenido a través de la fermentación por una bacteria del ácido propiónico. Los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales comprenden productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico así como productos procesados de los mismos, por ejemplo, filtrados de cultivo y sobrenadantes de cultivo obtenidos mediante la eliminación de la bacteria del cultivo mencionado anteriormente (producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico) mediante filtración/centrifugación, separación por membrana, u otros; concentrados obtenidos mediante la concentración del filtrado de cultivo/sobrenadante del cultivo mencionado anteriormente, producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico, u otros usando un evaporador o similares; pastas; diluciones y materiales secos (liofilizado, secado por calor, secado a presión reducida, u otros); y productos de tratamiento bactericida o productos para su esterilización. En la presente invención, puede usarse una o una combinación de varias de las etapas de tratamiento mencionadas anteriormente, tales como el tratamiento de eliminación de bacterias tal como filtración, centrifugación y separación por membrana, precipitación, concentración, formación de pasta, dilución, secado, tratamiento bactericida y esterilización, para preparar los productos procesados.

45 Los medios usados para producir productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico en general contienen fuentes de nutrientes que permiten el crecimiento de microorganismos. Es posible añadir, como fuente de nutrientes, suero de la leche, caseína, leche desnatada, concentrado de proteína del suero de la leche (WPC), aislados de proteína del suero de la leche (WPI), extracto de levadura, extracto de soja, peptona tal como tripticasa, glucosa, azúcares tales como lactosa, y minerales tales como minerales del suero de la leche, o alimento que los contienen de manera abundante. Alternativamente, pueden añadirse productos de los mismos tratados con enzimas. En particular, se usan preferiblemente el suero de la leche o productos de digestión enzimática del mismo; sin embargo, las fuentes de nutrientes no se limitan a estos ejemplos. En la presente invención, los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico preparados usando, como fuente de nutrientes, suero de la leche o materiales derivados del suero de la leche tales como WPC y WPI se denominan a continuación en el presente documento "productos de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico".

50 Las enzimas que se usan para digerir enzimáticamente las fuentes de nutrientes descritas anteriormente incluyen una o una combinación de varias proteasas y peptidasas. Las proteasas y peptidasas que van a usarse no están limitadas particularmente; ejemplos de proteasas de calidad alimenticia incluyen proteasas de tipo endo, proteasas de tipo exo, conjugados enzimáticos de peptidasa de tipo exo/proteasa de tipo endo, y conjugados enzimáticos de

5 proteasa/peptidasa. Las proteasas de tipo endo incluyen, por ejemplo, quimosina (EC 3.4.23.4; Maxiren, derivada de la levadura modificada *Kluyveromyces lactis*; GIST-BROCADES N.V.), AlcalaseR (derivada de *Bacillus licheniformis*; Novo), Esperase (derivada de *B. lentus*; Novo), NeutraseR (derivada de *B. subtilis*; Novo), Protamex (derivada de bacteria; Novo), y PTN6.0S (tripsina pancreática porcina; Novo). Los conjugados enzimáticos de peptidasa de tipo
 10 exo/proteasa de tipo endo incluyen, por ejemplo, Flavourzyme (derivada de *Aspergillus oryzae*; Novo). Además, las proteasas de tipo endo incluyen, por ejemplo, tripsina (n.º CAS 9002-07-7, EC 3.4.21.4; derivada de páncreas bovino; n.º de producto T8802, SIGMA), pepsina (n.º CAS 9001-75-6, EC 3.4.4.1; derivada de mucosa gástrica porcina; SIGMA), quimiotripsina (Novo y Boehringer), proteasa N "Amano" G (derivada de *Bacillus subtilis*; AMANO ENZYME), Biopraxe (derivada de *Bacillus subtilis*; Nagase & Co. Ltd.), y papaína W-40 (AMANO ENZYME). Las
 15 proteasas de tipo exo incluyen carboxipeptidasa pancreática y aminopeptidasa del borde de cepillo del intestino delgado. Además, los conjugados enzimáticos de proteasa/peptidasa que puede usarse incluyen, por ejemplo, proteasa A "Amano" G (derivada de *Aspergillus oryzae*; AMANO ENZYME) y Umamizyme G (peptidasa y proteasa, derivada de *Aspergillus oryzae*; AMANO ENZYME). El origen de la enzima no se limita a los descritos anteriormente, y las enzimas pueden derivarse de cualquier animal, planta o microorganismo. Sin embargo, se prefieren las derivadas de *Aspergillus oryzae*. Estas enzimas no se refieren a las limitadas por sus nombres comerciales, orígenes, fabricantes, y similares. Puede usarse un tipo de enzima o una combinación de dos tipos o más para llevar a cabo la presente invención. Ejemplos preferidos incluyen proteasa A "Amano" G (derivada de *Aspergillus oryzae*; AMANO ENZYME); sin embargo, la enzima no se limita a este ejemplo. Cuando las enzimas descritas anteriormente se usan en combinación, cada reacción enzimática puede realizarse de manera separada o simultánea.

20 Cuando se digieren enzimáticamente las fuentes de nutrientes mencionadas anteriormente, se dispersa y disuelve la fuente de nutrientes que es el material de partida en agua o agua tibia, y se añaden las enzimas al mismo. El pH al inicio de la digestión enzimática, el tiempo de digestión enzimática y la temperatura de la reacción enzimática no están limitados de manera particular siempre que pueda obtenerse el producto de la presente invención. Por
 25 ejemplo, el pH al inicio de la digestión enzimática puede ser de 3,0 a 7,5, preferiblemente de 4,5 a 7,0, y más preferiblemente de 6,0 a 7,0. El tiempo de digestión enzimática puede ser de 0,5 a 300 horas, preferiblemente de 1 a 20 horas, y más preferiblemente de 1 a 5 horas. La temperatura de la reacción enzimática puede ser de 20°C a 57°C, preferiblemente de 30°C a 52°C, y más preferiblemente de 40°C a 52°C.

30 Sin limitación, un ejemplo preferido para preparar un medio para producir un producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico es el siguiente método: se disuelven suero de la leche en polvo (10% p/p) y proteasa Amano A "Amano" G (0,07% p/p; AMANO ENZYME) en agua; tras dos horas de digestión enzimática a 47°C (pH 6,6), se inactiva la enzima calentando a 85°C durante 10 minutos; entonces, se añaden al mismo extracto de levadura de cerveza (0,10% p/p; ASAHI BREWERIES) y sulfato de amonio (0,27 % p/p), y se ajusta el pH a 6,7; y se lleva a cabo la esterilización a 121°C durante siete minutos.

35 Las bacterias del ácido propiónico que se usan para producir productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico incluyen las del género *Propionibacterium*, *Propionicimonas*, *Propioniferax*, *Propionimicrobium*, y *Propionivibrio*. Las bacterias preferidas son las que pertenecen al género *Propionibacterium*, pero no se limitan al mismo. Las bacterias del género *Propionibacterium* incluyen, por ejemplo, bacterias para el queso, tal como *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium acidipropionici* y *Propionibacterium jensenii*; *Propionibacterium avidum*; *Propionibacterium acnes*; *Propionibacterium lymphophilum*; *Propionibacterium granulosam*; *Propionibacterium arabinosum*; *Propionibacterium cyclohexanicum*; *Propionibacterium innocuum*; *Propionibacterium intermediu*; *Propionibacterium pentosaceum*; *Propionibacterium peterssonii*; *Propionibacterium propionicum*; y *Propionibacterium zeae*. Entre ellas, se prefiere *Propionibacterium freudenreichii* (denominada también a continuación en el presente documento *P. freudenreichii*), se prefieren más preferiblemente
 40 *Propionibacterium freudenreichii* IFO 12424 y *Propionibacterium freudenreichii* ATCC 6207; en particular, se prefiere a *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115).

Los presentes inventores han depositado la cepa *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), institución administrativa independiente. La información que especifica el depósito es tal como sigue:

50 (1) Nombre de la institución depositaria: International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), institución administrativa independiente.

(2) Dirección: Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566

(3) Número de acceso: FERM BP-8115

(4) Referencia de identificación: ET-3

(5) Fecha de depósito original: 9 de agosto de 2001

55 (6) Fecha de transferencia al depósito según el tratado de Budapest: 11 de julio de 2002

La *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 descrita anteriormente se aisló de queso Emmental. Es un bacilo corto

Gram positivo, y es negativo en su capacidad para reducir nitratos, negativo en su capacidad para producir indoles, negativo en su capacidad para producir sulfuro de hidrógeno, y positivo en su capacidad para fermentar lactosa. También tiene la capacidad de producir DHNA.

5 Las cepas bacterianas cuyo nombre de cepa bacteriana se marca con "ATCC" son cepas convencionales obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo, mientras que las que tienen el nombre de cepa bacteriana marcado con "IFO" son cepas convencionales obtenidas del Institute for Fermentation.

10 A continuación se cultivan estas bacterias del ácido propiónico usando los medios descritos anteriormente. Pueden usarse métodos de cultivo aerobios o anaerobios conocidos como método de cultivo; sin embargo, se prefieren los métodos de cultivo aerobios o anaerobios que usan medios líquidos. El pH al inicio de la fermentación y el tiempo y la temperatura de fermentación no están particularmente limitados siempre que puedan obtenerse los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales. Sin embargo, el pH al inicio de la fermentación puede ser de 3,0 a 7,5, preferiblemente de 5,0 a 7,5, y más preferiblemente de 5,5 a 7,0. El tiempo para la fermentación puede ser de 0,5 a 200 horas, preferiblemente de 50 a 100 horas, y más preferiblemente de 60 a 99 horas. La temperatura de fermentación puede ser de 20°C a 50°C, preferiblemente de 25°C a 45°C, y más preferiblemente de 30°C a 40°C. Por tanto, los medios de cultivo obtenidos pueden usarse inmediatamente tras el cultivo. Sin embargo, los medios de cultivo se usan preferiblemente tras el enfriamiento (de 3°C a 20°C, preferiblemente aproximadamente 10°C) y el almacenamiento durante aproximadamente de dos a cuatro semanas. Sin limitación, un ejemplo de un método preferido es el siguiente método: se ajusta el pH de un medio de cultivo a 6,8, y entonces se esteriliza el medio a 121°C durante siete minutos; se inocula este medio del 0,01 al 2,5% con un medio de cultivo de activación de *P. freudenreichii* ET-3 (cepa FERM BP-8115); se lleva a cabo el cultivo anaerobio a de 32°C a 37°C durante de 72 a 99 horas bajo atmósfera de nitrógeno; y se usa la disolución del cultivo obtenido como producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico.

25 Por ejemplo, en el caso de que se prepare un medio de cultivo mediante digestión de una disolución acuosa del suero de la leche aproximadamente al 10% p/p con proteasa A "Amano" G (a de 40°C a 52°C y pH de 6,0 a 7,0 durante de 1 a 5 horas) y adición de extracto de levadura de cerveza y sulfato de amonio, y de que se produzca un producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico mediante inoculación a del 0,01 al 2,5% de una disolución de cultivo de activación del *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 mencionado anteriormente y cultivo anaerobio bajo atmósfera de nitrógeno a de 32°C a 37°C durante de 72 a 99 horas, la concentración bacteriana de *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 es aproximadamente de 0,5 a 50 x ufc/ml; el contenido en DHNA es aproximadamente de 5 a 500 µg/ml; y el contenido en sólidos es aproximadamente del 5 al 15% p/p.

30 Además, puede obtenerse el agente de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales como el producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico mencionado anteriormente o un producto procesado del mismo tal cual, o como una fracción soluble o insoluble tras la dilución con un disolvente. Los disolventes incluyen agua y disolventes usados comúnmente, por ejemplo, alcoholes, hidrocarburos, ácidos orgánicos, bases orgánicas, ácidos inorgánicos, bases inorgánicas y fluidos supercríticos, que pueden usarse solos o en combinación de una pluralidad.

35 Por tanto, los agentes para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales así obtenidos pueden usarse tal cual. Alternativamente, pueden usarse como disolución obtenida después de concentrar o diluir esta disolución mediante métodos conocidos según se requiera. Además, pueden usarse tras convertir esta disolución concentrada en material seco mediante métodos conocidos.

40 Los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales son útiles como composiciones eficaces en la prevención y/o tratamiento de trastornos gastrointestinales funcionales. Esto se ha confirmado mediante el método Magnus que usa músculos lisos intestinales de rata así como mediante estudios clínicos realizados en pacientes con IBS.

45 El síndrome del intestino irritable (IBS) se produce por anomalías funcionales del tracto digestivo inferior. Se sabe que la patofisiología del IBS son anomalías en la motilidad del intestino, principalmente, del colon. Los síntomas observados incluyen dolor abdominal, molestia abdominal (caracterizada porque se alivia con la defecación), anomalías en la defecación (diarrea, estreñimiento y combinación de diarrea y estreñimiento), forma de deposición anómala (inclusión de mucosidad y dureza anómala) y sensación de hinchazón abdominal. El tiempo de tránsito intestinal se acorta en el de tipo diarrea, mientras que se prolonga el tiempo en el de tipo estreñimiento. Aunque difieren el área y el patrón contráctil, se observa un estado de motilidad intestinal potenciado en ambos casos. Se dice que, en comparación con los individuos sanos, los pacientes con IBS muestran respuestas anómalas al estrés, a estímulos tales como la dieta y a los agentes colinérgicos. También se dice que se produce una reducción en el umbral de percepción para los estímulos con balón ileocecal o rectal ("Saishin Naikagaku Taikai, Progress 8, Shoukakan Shikkan (Latest Internal Medicine Outline, Progress 8, Gastrointestinal Diseases)", Eds., Imura H. *et al.*, págs. 51, 1997, Nakayama Shoten).

El colon es un órgano que asume funciones tales como la absorción del contenido en agua y electrolitos del contenido, mantenimiento de las bacterias entéricas y defecación. Con el fin de mantener estas funciones, es importante mover el contenido del intestino delgado a una velocidad apropiada. Por ejemplo, cuando el peristaltismo

del colon superior se potencia en el IBS, la absorción de contenido del contenido en agua y otros se vuelve insuficiente, y como resultado, se manifiestan síntomas de diarrea. Alternativamente, cuando el movimiento intestinal se vuelve irregular, resulta afectada la propulsión del contenido, manifestándose entonces los síntomas de estreñimiento.

5 Los siguientes tres tipos y otros existen como estreñimiento funcional:

1. Estreñimiento habitual (estreñimiento rectal): estreñimiento que se produce, por ejemplo, en personas que salen por la mañana sin tiempo para defecar y que se produce por una disminución en la función de la sensación del deseo de defecar (sensibilidad rectal) debido a la continua resistencia del impulso de defecar.

10 2. Estreñimiento atónico: estreñimiento que se produce a menudo en mujeres de mediana edad o ancianas y que se produce por un debilitamiento del movimiento de colon. Puesto que se retrasa el paso del contenido del intestino, se aumenta la absorción del contenido en agua.

3. Estreñimiento espástico: estreñimiento en el que se producen espasmos colónicos debido al estrés, la parte espástica se estrecha de manera que la deposición no puede pasar suavemente en el colon, la absorción del contenido en agua se vuelve excesiva, dando como resultado deposiciones duras como las heces de conejo.

15 Agentes laxantes convencionales conocidos apropiados para los estreñimientos habitual y atónico incluyen los que expanden la deposición con humedad para mejorar la propiedad de la deposición e inducir un deseo de defecar (laxantes incrementadores de masa: preparaciones de fibra dietética, laxantes salinos, laxantes de azúcar, etc.) y los que estimulan directamente el movimiento intestinal, en particular, la fuerza contráctil intestinal (laxante estimulante: ruibarbo, senósidos, picosulfato de sodio, etc.). Los laxantes estimulantes tienen un efecto de defecación fuerte; sin embargo, no son adecuados para usos durante periodo prolongado, debido a que su uso continuado da como resultado la tolerancia. Mientras, el alivio del estrés es eficaz para el estreñimiento espástico. En estos casos, aunque se ingieran los agentes laxantes mencionados anteriormente, debido a que la deposición en la salida se ha endurecido, a menudo puede que sólo conduzcan a dolor abdominal.

25 En el síndrome del intestino irritable de tipo estreñimiento, no existe anomalía orgánica, y puesto que se muestra alta sensibilidad de manera aberrante al estrés o similar, se observa un aumento en la tensión y una disminución en el peristaltismo en todo el colon y se produce el estreñimiento espástico (Mizutani, M. y Nakayama, S., "Daicho no Undousei to Haibenkinou oyobi Benpi no Byotaiseiri, Rinshouseiri series 6, Cho (Colon motility, defecation functions, and pathophysiology of constipation, Clinical Physiology series 6, Intestine", Eds., Asakura H. *et al.*, págs. 180-184, Nankodo, Tokio, 1990). Por consiguiente, se piensa que el mantenimiento constante del movimiento peristáltico colónico normal es importante para el alivio del estreñimiento.

30 Los métodos conocidos de manera convencional para tratar el síndrome del intestino irritable (de tipo estreñimiento y de tipo diarrea) incluyen métodos en los que se alivian los espasmos intestinales anómalos mediante agentes anticolinérgicos (extracto de Scopolia, bromuro de mepenzolato y otros) y métodos en los que se ayuda al movimiento del contenido mediante el efecto del ajuste del contenido en agua y el efecto gelificante de las fibras dietéticas (policarbofilo cálcico, etc.) u otros. Además, el maleato de trimebutina que se usa como agente terapéutico para el síndrome del intestino irritable actúa de manera directa sobre los músculos lisos del tracto digestivo y modula la enterocinesis actuando de manera supresora en un estado de motilidad aumentada del tracto digestivo y actuando de una manera potenciadora en un estado de motilidad disminuida.

35 Mientras, las pruebas *in vitro* que se describen más adelante han revelado que los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico de la presente invención aumentan la frecuencia de contracción del colon distal sin aumentar la fuerza contráctil. Además, los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico de la presente invención mostraron un efecto de mejora en los síntomas de los pacientes (estado de defecación y estado abdominal general) y la QOL relacionada con la salud en las pruebas usando pacientes con síndrome del intestino irritable de tipo estreñimiento que se describe más adelante. Por tanto, pueden considerarse como materiales adecuados para el síndrome del intestino irritable de tipo estreñimiento que incluye al estreñimiento espástico.

40 Entre los trastornos que muestran como síntoma diarrea, el más frecuente es el síndrome del intestino irritable y resulta de enfriamiento en el abdomen o ingesta excesiva de bebidas en el verano, una serie de preocupaciones o estrés, y similares. Particularmente en una sociedad de alto estrés tal como la sociedad actual, es una enfermedad que padecen muchas personas. Un posible mecanismo de la misma incluye secreción potenciada de agua/electrolitos, absorción alterada del contenido en agua del intestino, anomalías en la motilidad intestinal y otras. De manera característica, el peso corporal no se altera debido a que se mantienen la digestión y la absorción de nutrientes. Anomalías en la motilidad intestinal incluyen las que resultan de la motilidad intestinal potenciada y las que resultan de la motilidad intestinal disminuida.

45 Con respecto al intestino delgado, el retraso del paso del contenido del intestino delgado da como resultado la proliferación de bacterias en el intestino delgado y la inducción de desconjugación del ácido biliar, lo que conduce a absorción alterada de agua o lípidos, de modo que puede producirse diarrea.

Por otro lado, con respecto al colon, Munakata *et al.* desarrollaron un método de intubación de colon retrógrada endoscópica. Usando este método, insertaron dos tubos de Teflon™ en dos sitios, el colon ascendente y el colon sigmoideo, introdujeron microchips y obtuvieron curvas de presión intracolónica para observar los movimientos colónicos (Munakata A., Kawakami K., *et al.*, "Kaichobu Chubu Ryuchihou no Kouan to Oyo (Devisal and application of ileal tube indwelling method)", *Gastroenterol. Endosc.*, 21, 448-457 (1979)). En pacientes con síndrome del intestino irritable de tipo diarrea, la presión interior en reposo es inferior en el colon sigmoideo en el lado distal que en el colon ascendente en el lado proximal, y el gradiente de presión intestinal se vuelve inferior hacia el lado anal; por tanto, el contenido intestinal se empuja fácilmente fuera al recto y más allá. Este fenómeno no mejora siquiera mediante la administración de Prostigmine, un agente anticolinérgico (Kawakami K., "Kabinsei Choshokogun: Jiristushinkei no Kiso to Rinshou (Irritable Bowel Syndrome: Basic and Clinical Aspects of Autonomic Nerves)" Eds., Goto Y. *et al.*, págs. 276-303, *Iyaku Journal (Medicine and Drug Journal) Co., Ltd.*, Osaka/ Tokio, 1982). Por tanto, se espera que aumentar la presión interna del colon sigmoideo resulte eficaz para tratar o prevenir el síndrome del intestino irritable de tipo diarrea.

Además, estudios sobre la presión interna del colon sigmoideo sugieren que las funciones motoras reducidas están implicadas en la diarrea (The Merck Manual 17ª Ed., Edición Japonesa, Sección 3, Gastrointestinal diseases, Functional Bowel Disorders, Irritable Bowel Syndrome (IBS), <http://merckmanual.banyu.co.jp/cgi-bin/disphhtml.cgi?url=03/s032.html> (15 de enero de 2008), página de inicio de BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.). Un posible método eficaz para aumentar una presión interna reducida del colon sigmoideo, es aumentar la frecuencia de contracción del colon sigmoideo. Los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico de la presente invención tienen la actividad de aumentar la frecuencia de contracción del colon distal. Esto indica que los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico de la presente invención tienen un efecto potenciador de la motilidad en el colon sigmoideo con función disminuida y aumento de la presión interna, de modo que aumente la presión del colon proximal de una manera retrograda y que mejore el gradiente de presión. Por tanto, se considera que los productos de fermentación por bacterias del ácido propiónico de la presente invención también son eficaces para el síndrome del intestino irritable de tipo diarrea.

Por tanto, no es sólo la supresión de motilidad intestinal potenciada lo que da como resultado la supresión de la diarrea, sino que el mantenimiento de un gradiente de presión apropiado puede ser también un factor importante.

Los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales aumentaron la frecuencia de contracción de los músculos lisos intestinales del colon distal sin aumentar su fuerza contráctil en las pruebas *in vitro* que se describen más adelante. No se observó la actividad de aumentar la frecuencia de contracción con el medio antes de la inoculación de las bacterias del ácido propiónico. Por tanto, se demostró que la fermentación por bacterias del ácido propiónico es importante. Mientras, se llevaron a cabo las mismas pruebas con el colon proximal y colon medio; sin embargo, no hubo influencia tanto sobre la fuerza contráctil como sobre la frecuencia de contracción de los músculos lisos intestinales. Basándose en este descubrimiento, se espera que los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales tengan un efecto de movimiento del contenido colónico al ano mientras que se mantiene de manera suficiente la absorción del contenido en agua en el colon proximal y el colon medio, eliminando el contenido del colon distal, y aumentando la presión interna incluso en pequeño grado en comparación con el colon proximal y el colon medio. En otras palabras, se cree que son también materiales útiles frente el síndrome del intestino irritable de tipo diarrea.

Los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales pueden usarse como composiciones eficaces para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales aplicables a trastornos gastrointestinales funcionales, en particular, síndrome del intestino irritable (de tipo estreñimiento, de tipo diarrea, y de tipo combinación), estreñimiento espástico, estreñimiento funcional y similares. Además, los agentes para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales pueden prepararse eficazmente, con pocas etapas. Por tanto, existe la ventaja de que los agentes para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales, que son superiores en seguridad y que pueden añadirse al alimento y a las bebidas, así como a productos farmacéuticos, pueden proporcionarse fácilmente.

La cantidad de un agente de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales que se mezcla dando lugar a un producto farmacéutico, alimento o bebida no está limitada particularmente, puesto que varía dependiendo de la forma, la forma farmacéutica, el síntoma, el peso corporal, el uso y otros. Sin embargo, los agentes pueden mezclarse, por ejemplo, en un contenido del 0,001 al 100% (p/p), preferiblemente del 0,01 al 100% (p/p), y más preferiblemente del 0,1 al 100% (p/p) cuando se convierten en peso seco del producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico.

La dosis diaria de un producto farmacéutico o alimento o bebida de un agente de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales no está limitada particularmente, puesto que la dosis varía dependiendo de la edad, el síntoma, el peso corporal, el uso y otros. Sin embargo, pueden ingerirse, por ejemplo, a de 0,1 a 10000 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 1 a 400 mg/kg de peso corporal, y más preferiblemente de 5 a 40 mg/kg de peso corporal cuando se convierten en el peso seco de producto de fermentación por bacterias del ácido propiónico.

Además, pueden usarse en combinación con productos farmacéuticos o alimentos conocidos de manera convencional o alimentos que tienen un efecto de prevención y/o tratamiento de trastornos gastrointestinales funcionales. Específicamente, los ejemplos incluyen, sin limitación, agentes anticolinérgicos y alimento que contiene fibras dietéticas.

5 Los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales pueden usarse tanto en la forma farmacéutica como en la forma de alimento o bebida. Por ejemplo, se espera que diversos tipos de inflamación se traten y/o prevengan mediante la administración directa como producto farmacéutico, o mediante la ingestión directa como alimento de uso especial tal como alimento para uso específico para la salud, alimento con función nutritiva o aporte complementario. Además, independientemente de la forma tal como líquido, 10 pasta, sólido y polvo, pueden añadirse a diversos tipos de alimento (leche, bebidas, leche fermentada, yogurt, queso, pan, panecillos, galletas saladas, masas de pizza, fórmulas de leche en polvo, dieta hídrica, alimento para personas enfermas, alimento nutricional, alimento congelado, alimento procesado, otro alimento disponible comercialmente, y similares), y puede ingerirse.

15 Pueden usarse agua, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, bases orgánicas, zumos de fruta, condimentos y otros como componente principal para el alimento que comprende un agente de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales. Las proteínas incluyen, por ejemplo, proteínas de plantas y animales tales como leche entera, leche desnatada, leche 20 parcialmente desnatada, caseína, suero de la leche en polvo, proteínas del suero de la leche, concentrados de proteínas del suero de la leche, aislados de proteínas del suero de la leche, α -caseína, β -caseína, κ -caseína, β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, lactoferrina, proteínas de soja, proteínas de huevo de gallina y proteínas de carne y productos de digestión de los mismos; y diversos componentes derivados de la leche tales como mantequilla, minerales del suero de la leche, nata, suero de la leche, nitrógeno no proteico, ácido siálico, fosfolípidos y lactosa. Pueden incluir péptidos y aminoácidos tales como fosfopéptidos de caseína, arginina y lisina. Los hidratos de 25 carbono incluyen, por ejemplo, azúcares, almidones procesados (dextrina, almidón soluble, almidón británico, almidón oxidado, éster de almidón, éter de almidón y similares) y fibras dietéticas. Los lípidos incluyen, por ejemplo, aceites animales tales como manteca, aceites de pescado, así como aceites separados, aceites hidrogenados y aceites transesterificados de los mismos y aceites vegetales tales como aceite de palma, aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de colza y aceite de coco, así como aceites separados, aceites hidrogenados y aceites transesterificados de los mismos. Las vitaminas incluyen, por ejemplo, vitamina A, carotenos, grupo de la vitamina B, 30 vitamina C, grupo de la vitamina D, vitamina E, grupo de la vitamina K, vitamina P, vitamina Q, niacina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, inositol, colina y ácido fólico. Los minerales incluyen, por ejemplo, calcio, potasio, magnesio, sodio, cobre, hierro, manganeso, zinc y selenio. Los ácidos orgánicos incluyen, por ejemplo, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, y ácido eritórbico. Pueden usarse dos o más de estos elementos en combinación, y pueden usarse también productos sintéticos y/o alimentos que los comprenden de 35 manera abundante. La forma de alimento puede ser forma sólida o líquida. Alternativamente, puede estar en forma de gel o similar.

40 Cuando se usan como productos farmacéuticos o aportes complementarios, los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales pueden administrarse en diversas formas. Ejemplos de las formas incluyen administración oral usando comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabes y otros. Estas diversas preparaciones pueden formularse siguiendo métodos convencionales usando, como agente principal, adyuvantes conocidos que pueden usarse comúnmente en el campo técnico de la formulación farmacéutica, tales como excipientes, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, agentes de corrección del olor, agentes solubilizante, 45 agentes de suspensión y agentes de recubrimiento. Además, pueden contener también una cantidad apropiada de calcio. Además, pueden añadirse cantidades apropiadas de vitaminas, minerales, ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, péptidos y similares.

Todas las referencias de la técnica anterior citadas en el presente documento se incorporan como referencia en esta descripción.

Ejemplos

50 A continuación en el presente documento se describirá de manera específica la presente invención con referencia a los ejemplos, pero no debe interpretarse que se limita a los mismos.

[Ejemplo 1] Preparación del producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico

Preparación del medio de cultivo

55 Se disolvieron suero de la leche en polvo (10% p/p) y proteasa A "Amano" G (0,07% p/p, AMANO ENZYME) en agua y se llevó a cabo la digestión enzimática a 47°C (pH 6,6) durante dos horas. Entonces, se inactivó la enzima calentando a 85°C durante diez minutos. Después, se añadió extracto de levadura de cerveza (0,10% p/p; ASAHI BREWERIES) y sulfato de amonio (0,27% p/p), se ajustó el pH a 6,7, entonces se esterilizó la disolución a 121°C durante siete minutos.

Cultivo de bacterias del ácido propiónico

5 Se inoculó el medio preparado al 2% con una disolución de cultivo de activación de *P. freudenreichii* ET-3 (cepa FERM BP-8115) y se cultivó de manera anaerobia bajo una atmósfera de nitrógeno a 37°C durante 72 horas para obtener un producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico de suero de la leche (contenido en DHNA, 0,01% p/p). Se usó el mismo medio que se describió anteriormente para la disolución del cultivo de activación.

[Ejemplo 2] Efecto del producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico en músculos lisos intestinales

Preparación de muestras de colon

10 Se criaron y habituaron ratas macho de tipo SD de seis semanas de edad durante una semana, luego se sacrificaron para extirpar el colon. Entonces, se aisló aproximadamente 1 cm del músculo longitudinal del colon del colon distal (una parte aproximadamente 2 a 3 cm del lado del apéndice desde el ano), y se cortó en dirección de capa longitudinal con un ancho de 3 mm (a continuación en el presente documento, esto se denomina la muestra de colon). Se colgó cada muestra de colon con tensión de reposo de 1 g en un tubo Magnus lleno con tampón de Krebs
15 en las condiciones descritas a continuación, y se hizo pasar por el mismo un gas mixto de 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono. Entonces, se equilibraron las muestras de colon durante aproximadamente una hora mientras se cambiaba el tampón de Krebs cada 15 minutos.

Composición del tampón de Krebs:

20 Se añadió agua destilada a 6,92 g de NaCl, 0,35 g de KCl, 0,29 g de MgSO₄·7H₂O, 0,16 g de KH₂PO₄, 2,1 g de glucosa, 0,28 g de CaCl₂ y 2,1 g de NaHCO₃ para obtener 1 l.

Temperatura del tampón de Krebs en el tubo Magnus: 32°C.

Volumen del tampón de Krebs introducido en el tubo Magnus: 10 ml.

Preparación de las sustancias de prueba

25 Se esterilizó el producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico preparada en el ejemplo 1 mediante radiación γ . Se añadió agua destilada al producto liofilizado para preparar una disolución acuosa al 10% p/v (conversión del producto liofilizado) de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico. Además, se añadió agua destilada al producto liofilizado del medio antes de la inoculación de la bacteria del ácido propiónico preparada en el ejemplo 1 (a continuación en el presente documento denominada también "producto no fermentado") para preparar una disolución acuosa al 10% p/v de producto no fermentado
30 (conversión del producto liofilizado). Estas disoluciones acuosas de las sustancias de prueba se usaron en la prueba de evaluación descrita a continuación. Mientras, se usó agua destilada como control.

Prueba de evaluación de productos de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico

35 Tras cambiar el tampón de Krebs, se añadieron 10 μ l, 30 μ l y 100 μ l de una disolución acuosa de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico, una disolución acuosa de producto no fermentado o agua destilada a cada uno de los tubos Magnus (a concentraciones finales del 0,01, 0,03 y 0,10% p/v) y se llevaron a cabo la medición de la tensión y la observación de las condiciones del músculo durante 15 minutos. Se registraron gráficos de medición de la tensión usando una registradora ajustada de tal manera que se provoca un desplazamiento de 5 cm por la tensión de 1 g en los gráficos de medición. Se usaron los gráficos de medición resultantes para observar picos de tensión asociados con la contracción del músculo. Se calculó la frecuencia de
40 contracción (veces/minuto) a partir del número de picos (veces) que aparecieron por unidad de tiempo (minuto), se calculó la fuerza contráctil (g) a partir de la altura del pico (cm), y se usaron los valores numéricos para la evaluación.

Resultados

La frecuencia de contracción y fuerza contráctil determinadas de cada parte del colon se muestran en la Tabla 1.

45 Tabla 1

COLÓN DISTAL media \pm DE	SUSTANCIA AÑADIDA	CANTIDAD DE DISOLUCIÓN ACUOSA DE SUSTANCIA DE PRUEBA AÑADIDA (μ L)	FUERZA CONTRÁCTIL (G)	FRECUENCIA DE CONTRACCIÓN (VECES/MINUTO)
--------------------------------	----------------------	--	--------------------------	--

	AGUA DESTILADA n=4	0	0,48±0,15	1,17±0,53
		10	0,48±0,14	1,13±0,63
		30	0,49±0,11	0,75±0,48
		100	0,48±0,08	0,79±0,25
	PRODUCTO NO FERMENTADO n=4	0	0,40±0,14	0,75±0,29
		10	0,34±0,10	0,88±0,16
		30	0,39±0,11	0,88±0,16
		100	0,46±0,20	0,75±0,35
	PRODUCTO DE FERMENTACIÓN DE BACTERIAS DEL ÁCIDO PROPIÓNICO	0	0,46±0,14	0,88±0,32
		10	0,38±0,10	1,29±0,34
		30	0,44±0,22	1,75±1,83 +
		100	0,48±0,14	1,83±0,14 ++, *
*: p<0,05 frente a antes de añadir de la disolución acuosa de sustancia de prueba (0) (prueba t para datos pareados)				
+, ++: p<0,05, 0,01 frente a producto no fermentado (prueba de la t de Student)				

En esta Tabla, * indica que hay una diferencia significativa de p<0,05 (prueba t para datos pareados) frente a antes de la adición de la sustancia de prueba a la muestra de colon (es decir, el volumen de disolución acuosa de sustancia de prueba añadida es 0 µl). + y ++ indican que hay una diferencia significativa de p<0,05 y p<0,01 (prueba de la t de Student) frente al producto no fermentado, respectivamente.

La frecuencia de contracción del colon distal aumentó mediante la adición de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico de una manera dependiente de la dosis. Cuando se añadieron 100 µl de la disolución acuosa de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico, la frecuencia de contracción mostró un valor significativamente más alto (p<0,05, prueba t para datos pareados) en comparación con antes de la adición. Incluso cuando se comparó con el producto no fermentado, la frecuencia de contracción aumentó significativamente con la adición de 30 µl o 100 µl de la disolución acuosa de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico, con p<0,05 y p<0,01 (prueba de la t de Student), respectivamente. Por el contrario, con el producto no fermentado no inoculado con una bacteria del ácido propiónico, no se observó efecto de aumento de la frecuencia de contracción en comparación con agua destilada o antes de la adición.

La fuerza contráctil no se alteró mediante la adición de cualquiera de las sustancia de prueba. En otras palabras, el producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico no tiene efecto de aumento de la fuerza contráctil ni un efecto de supresión de fuerza contráctil. Por tanto, se encontró que el producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico tenía un efecto de aumento de la frecuencia de contracción, pero no tenía ningún efecto de aumento en la fuerza contráctil.

[Ejemplo 3] Efecto de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico en músculos lisos intestinales en diversas áreas

Preparación de las muestras de colon

Se criaron y habituaron ratas macho de tipo SD de seis semanas de edad durante una semana, luego se sacrificaron para extirpar el colon. Entonces, se aisló aproximadamente 1 cm del músculo longitudinal del colon del colon distal (una parte de aproximadamente 1 cm hasta el lado del ano desde el lado del apéndice), del colon medio (la parte media en vista del colon completo) y el colon distal (una parte de aproximadamente 2 a 3 cm del lado del apéndice desde el ano) y se cortó en dos trozos en dirección de capa longitudinal (a continuación en el presente documento, esto también se denomina la muestra de colon). Se colgó cada muestra de colon con tensión de reposo de 1 g en un tubo Magnus lleno con tampón de Krebs en las condiciones descritas a continuación, y se hizo pasar por el mismo un gas mixto de 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono. Entonces, se equilibraron las muestras de colon durante aproximadamente una hora mientras se cambiaba el tampón de Krebs cada 15 minutos.

Composición de tampón de Krebs:

Se añadió agua destilada a 6,92 g de NaCl, 0,35 g de KCl, 0,29 g de MgSO₄·7H₂O, 0,16 g de KH₂PO₄, 2,1 g de glucosa, 0,28 g de CaCl₂ y 2,1 g de NaHCO₃ para obtener 1 l.

Temperatura del tampón de Krebs en el tubo Magnus: 32°C.

5 Volumen del tampón de Krebs introducido en el tubo Magnus: 10 ml.

Preparación de las sustancias de prueba

10 Se esterilizó el producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico preparada en el ejemplo 1 mediante radiación γ . Se añadió agua destilada al producto liofilizado para preparar una disolución acuosa al 10% p/v (conversión a partir del producto liofilizado) de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico. Esto se usó como disolución acuosa de la sustancia de prueba en la prueba de evaluación descrita a continuación. Mientras, se usó el agua destilada como control.

Pruebas de evaluación de producto de fermentación del suero de la leche por bacterias del ácido propiónico

15 Tras cambiar el tampón de Krebs, se añadieron 10 μ l, 30 μ l y 100 μ l de una disolución acuosa de producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico o agua destilada a cada uno de los tubos de Magnus (a concentraciones finales del 0,01, 0,03 y 0,10% p/v) y se llevaron a cabo la medición de la tensión y la observación de condiciones del músculo durante 15 minutos. Se registraron gráficos de medición de tensión usando una registradora ajustada de tal manera que se produce un desplazamiento de 5 cm por la tensión de 1 g en los gráficos de medición. Se usaron los gráficos de medición resultantes para observar picos de tensión asociados con la contracción del músculo. Se calculó la frecuencia de la contracción (veces/minuto) a partir del número de picos (veces) que aparecieron por unidad de tiempo (minuto), se calculó la fuerza contráctil (g) a partir de la altura del pico (cm), y se usaron los valores numéricos para la evaluación. La figura 1 muestra gráficos de medición representativos obtenidos con la adición de producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico.

Resultados

La frecuencia de contracción determinada y la fuerza contráctil de cada parte del colon se muestran en la Tabla 2.

25 Tabla 2

COLON PROXIMAL media \pm DE	Sustancia añadida	Cantidad de disolución acuosa de sustancia de prueba añadida (μ l)	Fuerza contráctil (g)	Frecuencia de contracción (veces/minuto)
	Agua destilada n=6	0	1,25 \pm 0,43	0,47 \pm 0,13
		10	1,32 \pm 0,43	0,50 \pm 0,11
		30	1,42 \pm 0,48	0,47 \pm 0,07
		100	1,48 \pm 0,40	0,53 \pm 0,16
	Producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico n=6	0	1,24 \pm 0,40	0,53 \pm 0,13
		10	1,28 \pm 0,30	0,58 \pm 0,14
		30	1,38 \pm 0,39	0,56 \pm 0,09
		100	1,39 \pm 0,46	0,58 \pm 0,14
COLON MEDIO media \pm DE	Sustancia añadida	Cantidad de disolución acuosa de sustancia de prueba añadida (μ l)	Fuerza contráctil (g)	Frecuencia de contracción (veces/minuto)
	Agua destilada n=6	0	0,72 \pm 0,21	0,56 \pm 0,09
		10	0,68 \pm 0,21	0,58 \pm 0,17
		30	0,60 \pm 0,14	0,61 \pm 0,14
		100	0,74 \pm 0,14	0,53 \pm 0,07

	Producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico n=6	0	0,70 ± 0,11	0,50 ± 0,21
		10	0,68 ± 0,14	0,53 ± 0,19
		30	0,69 ± 0,13	0,53 ± 0,19
		100	0,72 ± 0,13	0,58 ± 0,14
COLON DISTAL media±DE	Sustancia añadida	Cantidad de disolución acuosa de sustancia de prueba añadida (µl)		Frecuencia de contracción (veces/minuto)
		Agua destilada		
	n=4	0	0,83 ± 0,41	0,67 ± 0,14
		10	0,80 ± 0,34	0,75 ± 0,29
		30	0,96 ± 0,66	0,75 ± 0,10
		100	0,92 ± 0,55	0,79 ± 0,16
	Producto de fermentación por una bacteria del ácido propiónico n=7	0	0,83 ± 0,28	0,74 ± 0,43
		10	0,80 ± 0,24	0,90 ± 0,38
		30	0,87 ± 0,25	1,24 ± 0,27 **
		100	1,02 ± 0,38	1,31 ± 0,22 **

En esta Tabla, ** indica que hay una diferencia significativa de $p < 0,01$ para la muestra de colon frente a un mismo volumen de agua destilada (prueba de la t de Student).

5 La frecuencia de contracción del colon distal aumentó mediante la adición de producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico de una manera dependiente de la dosis, mientras las frecuencias de contracción del colon proximal y del colon medio no mostraron ningún cambio incluso cuando se añadió el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico. Cuando se añadieron 30 µl o 100 µl de la disolución acuosa de producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico, la frecuencia de contracción mostró un valor significativamente superior ($p < 0,01$, prueba de la t de Student) en comparación con cuando se añadió un mismo volumen de agua destilada.

10 No se observó ningún cambio para la fuerza contráctil mediante la adición de producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria propiónica en cualquier parte del colon. En otras palabras, el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico no tiene ni un efecto de aumento de la fuerza contráctil ni un efecto de supresión de fuerza contráctil. Por tanto, se encontró que el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico tiene actividad de aumento de la frecuencia de contracción de una manera específica del colon distal, pero no tiene ninguna actividad de aumento en la fuerza contráctil en ninguna parte.

15 [Ejemplo 4] Eficacia del producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico en pacientes con síndrome del intestino irritable de tipo estreñimiento

Método

20 Se realizó una prueba cruzada con doble ciego en 12 pacientes con síndrome del intestino irritable de tipo estreñimiento (tres hombres y nueve mujeres, con edades de 27 a 77). Se sometió el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico producido mediante el método descrito en el ejemplo 1 a esterilización térmica, y se secó. Se administraron por vía oral comprimidos que contenían 0,2 g del mismo por cada tres comprimidos ("principio activo") a seis individuos seleccionados al azar de los sujetos descritos anteriormente, tres veces al día y tres comprimidos por ingestión, es decir un total de nueve comprimidos al día, durante cuatro semanas (28 días). A los otros seis individuos se les administraron por vía oral comprimidos que contenían producto liofilizado a partir de suero de la leche en polvo reconstituido sin fermentar en lugar del producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico ("placebo"), a tres comprimidos al día durante cuatro semanas (28 días) [periodo de ingestión temprano]. Se interrumpió la ingestión de los comprimidos descrita anteriormente durante las cuatro semanas siguientes (28 días) para los doce sujetos [periodo de interrupción de ingestión]. Entonces, durante las cuatro semanas siguientes (28 días), se administraron por vía oral a los sujetos tres

comprimidos por ingestión, tres veces al día, es decir un total de nueve comprimidos al día. Aquí, a quienes se les administró previamente “ principio activo” se les administró “placebo”, y a quienes se les administró previamente “placebo” se les administró “principio activo” [periodo de ingestión tardío].

Métodos de evaluación

5 (1) Cuestionario sobre síntomas

Se pidió que se cumplimentara un cuestionario sobre síntomas todos los días durante el periodo de ingestión de comprimidos. La figura 2 muestra el cuestionario que se cumplimentó todos los días. Los puntos preguntados se refieren a estados de defecación. Los puntos específicos preguntados fueron: frecuencia de defecación, propiedad de la deposición, intensidad del dolor abdominal, sensación de evacuación incompleta y grado de esfuerzo en el momento de la defecación y el estado abdominal. La propiedad de deposición se clasificó usando puntuaciones basadas en los dibujos y descripción mostrados en la figura 2. Mientras tanto, la intensidad de dolor abdominal (presencia de dolor abdominal), el nivel de hinchazón abdominal (tener sensación de hinchazón abdominal), la sensación de evacuación incompleta y el grado de esfuerzo en el momento de defecación (tener sensación de evacuación incompleta, requerir esfuerzo en el momento de la defecación), y estado abdominal (puntuación abdominal total del día) se clasificaron usando una escala analógica visual. Los resultados de las escalas analógicas visuales se obtuvieron midiendo la longitud desde “ninguno” o “muy mal” en un extremo de la escala hasta la marca escrita por el sujeto, y calculando el valor obtenido dividiendo esta longitud entre la longitud de escala total. Después de recoger los cuestionarios, se anotaron los valores numéricos para los periodos de ingestión desde el día 1 hasta el día 28 y desde el día 15 hasta el día 28 según “placebo” y “principio activo”. Se calcularon la media, desviación estándar y valor de P (placebo frente a principio. activo, prueba de la t de Student) para cada punto.

Además, se pidió cumplimentar el cuestionario mostrado en la figura 3 el último día del periodo de ingestión temprano y el último día del periodo de ingestión tardío. Aquí, los puntos preguntados se refieren al estado abdominal general. Los puntos específicos preguntados fueron: estado abdominal en comparación con antes del periodo de ingestión (grado de mejora general) y estado abdominal en comparación con el periodo de ingestión previo con el otro comprimido (comparación entre los periodos temprano y tardío). En estas evaluaciones, se seleccionó uno de los mostrados en la figura 3. El grado de mejora general incluye evaluación en cinco niveles: “mejoró considerablemente (muy eficaz)”, “mejoró (eficaz)”, “sin cambios (sin alteración)”, “empeoró” y “empeoró considerablemente”. Después de recoger los cuestionarios, se determinó el número de respuestas para cada nivel según “placebo” y “principio activo”. Entonces, se calculó como tasa eficaz (%) la proporción de encuestados que contestaron “muy eficaz” o “eficaz”. Se llevó a cabo un análisis estadístico mediante la prueba de chi-cuadrado acumulativa. Mientras tanto, la comparación entre los periodos temprano y tardío (comparación antes y después) incluyó una evaluación de tres niveles: “mejor en el periodo temprano”, “sin cambios” y “mejor en el periodo tardío”. Después de recoger los cuestionarios, se determinó el número de respuestas para cada nivel según “placebo” y “principio activo”.

35 (2) Cuestionario SF-36

El cuestionario SF-36 (MOS Short-Form 36-Item Health Survey) se conoce como una escala exhaustiva que es científicamente fiable y relevante en la medición de QOL relacionada con la salud. Es sencillo, útil y está fácilmente disponible. Debido a una cantidad suficiente de datos ya acumulados, el cuestionario SF-36 es el más comúnmente usado en el mundo como cuestionario de medición del estado de la salud. Específicamente, usando 36 preguntas, se mide la QOL en las ocho áreas (subescalas) indicadas a continuación para evaluar exhaustivamente la QOL de todos los sujetos.

1) Función física [PF]

2) Rol físico [RP]

3) Dolor corporal [BP]

45 4) Percepción de salud general [GH]

5) Vitalidad [VT]

6) Función social [SF]

7) Rol emocional [RE]

8) Salud mental [MH]

50 Los presentes inventores realizaron la prueba según la descripción en “SF-36v2™ Manual, Japanese Edition”, Fukuhara, S. y Suzukamo Y., Kenko Iryo Hyokakenkyu Kikou (Institute for health outcomes and process evaluation research), 2004.

- Se pidió cumplimentar los cuestionarios SF-36 antes de los periodos de ingestión temprano y tardío y en el último día de los periodos de ingestión temprano y tardío. Entonces, se puntuaron las preguntas en las ocho áreas indicadas anteriormente mediante conversión en puntuaciones según la puntuación basada en valores estándar nacionales (puntuación basada en la norma, NBS). Estas puntuaciones se obtuvieron recalculando las puntuaciones de las ocho subescalas, mostradas en un intervalo de 0 a 100 puntos, de modo que el valor estándar nacional del público japonés entero es de 50 puntos y la desviación estándar es de 10 puntos. El valor estándar nacional se refiere a una puntuación de SF-36 promedio obtenida mediante una encuesta nacional en la que se lleva a cabo un muestreo de tal manera que la distribución es la misma que la distribución nacional en cuanto a sexo, edad, área geográfica, tamaño de ciudad, y similares.
- 10 Esta prueba determinó los números de casos con puntuaciones mejoradas, sin alteración o empeoradas cuando se compararon puntuaciones antes y después de cada uno de los periodos de ingestión. Además, se calculó el cambio en cada puntuación antes y después de cada periodo de ingestión para evaluar la influencia de la administración de "principio activo" o "placebo".

Resultados

- 15 (1) Los resultados obtenidos de los cuestionarios sobre síntomas se muestran en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3

RESULTADOS DE CUESTIONARIO SOBRE SINTOMAS										
PERIODO DE INGESTIÓN	DÍA 1 A 28					DÍA 15 A 28				
	placebo		principio activo		prueba de la t de Student	placebo		principio activo		prueba de la t de Student
	media	DE	media	DE	valor de p	media	DE	media	DE	valor de p
FRECUENCIA DE DEFECACIÓN (AL DÍA)	0,87	0,51	1,00	0,63	0,092#	0,82	0,48	1,09	0,88	0,082 #
CONSISTENCIA DE DEPOSICIÓN	3,58	0,88	3,43	1,03	0,284	3,58	0,94	3,59	1,20	0,486
DOLOR ABDOMINAL	2,61	1,71	2,46	1,98	0,280	2,64	1,70	2,33	2,07	0,108
SENSACIÓN DE HINCHAZÓN ABDOMINAL	5,63	1,64	4,80	2,15	0,104	5,64	1,98	4,72	2,18	0,089 #
SENSACIÓN DE EVACUACIÓN INCOMPLETA	4,97	2,09	4,27	2,17	0,033 *	5,15	2,29	4,08	2,33	0,008 **
PUNTUACIÓN GLOBAL	4,64	1,08	5,05	1,15	0,041 *	4,57	1,01	5,22	1,10	0,038 *

- Tal como se muestra en la Tabla 3, se determinaron la media (media), desviación estándar (DE), y valor de p (prueba de la t de Student) de cada uno de los valores de evaluación para los periodos de ingestión desde el día 1 hasta el día 28, y día 15 al día 28, y se compararon "placebo" y "principio activo". En la Tabla 3, # representa $p < 0,10$; * representa $p < 0,05$; y ** representa $p < 0,01$. Para el día 1 al día 28 de ingestión, "principio activo" mostró un efecto de mejora significativo sobre la sensación de evacuación incompleta y la puntuación abdominal global, con $p < 0,05$ en comparación con "placebo". Además, la frecuencia de defecación mostró una tendencia a la mejora ($p < 0,10$; prueba de la t de Student). Además, para el día 15 al día 28 de ingestión, "principio activo" mostró un efecto de mejora significativo sobre la sensación de evacuación incompleta y la puntuación abdominal global, con $p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente, en comparación con "placebo" (prueba de la t de Student). Además, la frecuencia de defecación y sensación de hinchazón abdominal mostraron una tendencia a la mejora ($p < 0,10$; prueba de la t de Student).

Tabla 4

GRADO DE MEJORA GENERAL (EN COMPARACIÓN CON EL PERIODO SIN INGESTIÓN)				
(n)	MUY EFICAZ	EFICAZ	SIN CAMBIOS	TASA EFICAZ
PLACEBO	1	3	8	25%
PRINCIPIO ACTIVO	0	8	4	67% #

: $p < 0,10$ mediante prueba de la chi-cuadrado acumulativa

COMPARACIÓN ANTES Y DESPUÉS

(n)	"PRINCIPIO ACTIVO" FUE BUENO	"PLACEBO" FUE BUENO	SIN CAMBIOS
	8	3	1

5 Tal como se muestra en la Tabla 4, con respecto el grado mejora general, las tasas eficaces fueron del 25% y el 67% con administraciones de "placebo" y "principio activo", respectivamente, y de los dos grupos, el grupo "principio activo" mostró una tendencia a la mejora ($p < 0,10$; prueba de la chi-cuadrado acumulativa).

10 Además, en ocho de los doce casos, la respuesta indicaba que la ingestión de "principio activo" fue mejor que la ingestión de "placebo". Hubo tres casos en los que las respuestas indicaban que "placebo" fue mejor. Un caso indicó que no había diferencia. Además, no hubo diferencia significativa entre los periodos de ingestión temprano y tardío.

(2) Los resultados del cuestionario SF-36 se muestran en las figuras 4 y 5.

15 La fila superior de la figura 4 muestra una comparación de las puntuaciones antes y después de la administración de "principio activo" como razón de número de casos, mientras que la fila inferior muestra una comparación de las puntuaciones antes y después de la administración de "placebo" como razón de número de casos. En el grupo de "principio activo", se observaron muchos casos con puntuaciones mejoradas globales en comparación con el grupo de "placebo", y en particular, se vieron muchos casos con dolor corporal y salud general mejorados.

20 La figura 5 muestra cambios en las puntuaciones antes y después de la administración. Específicamente, se restó la puntuación antes de la administración de la puntuación después de la administración para el "placebo" y "principio activo", y se evaluaron los valores calculados como cambios en las puntuaciones. Se encontró que las puntuaciones aumentaban de manera global con la administración de "principio activo", mientras que se encontraron puntos con disminución en el grupo de "placebo". La puntuación para dolor corporal [BP] aumentó significativamente en "principio activo" en comparación con "placebo" ($p < 0,05$; prueba de la t de Student). Por tanto, los resultados mostraban que los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales mejoran la función física. Además de esto, la ingestión de "principio activo" mostró una tendencia a la mejora de la vitalidad [VT] y la función social [SF] que empeoró con la ingestión de "placebo". Por tanto, los resultados mostraron que los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales mejoran la función mental. Estos resultados demostraron que, para los aspectos tanto de función física como mental, la QOL de pacientes con síndrome del intestino irritable mejoran con la ingestión de los agentes de la presente invención para prevenir y/o tratar trastornos gastrointestinales funcionales.

30 [Ejemplo 5] Efectos de propionato de sodio y acetato de sodio en producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico sobre músculos lisos intestinales

35 El producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico preparado en el ejemplo 1 y sometido a prueba en los ejemplos 2 y 3 contiene ácido propiónico y ácido acético a una concentración de 0,1 mol/l cada uno. Se realizaron experimentos según el ejemplo 2 para evaluar si estos ácidos orgánicos influyen sobre los resultados de la prueba.

Preparación de muestras de colon

40 Se criaron y habituaron ratas macho de tipo SD de siete semanas de edad durante una semana, luego se sacrificaron para extirpar el colon. Entonces, se aisló aproximadamente 1 cm del músculo longitudinal del colon del colon distal (una parte de aproximadamente 2 a 3 cm del lado del apéndice desde el ano), y se cortó en dos trozos en dirección de capa longitudinal (a continuación en el presente documento, esto también se denomina muestra de

colon). Se colgó cada muestra de colon con tensión de reposo de 1 g en un tubo Magnus lleno con tampón de Krebs en las condiciones descritas a continuación, y se hizo pasar por el mismo un gas mixto de 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono. Entonces, se equilibraron las muestras de colon durante aproximadamente una hora mientras se cambiaba el tampón de Krebs cada 15 minutos.

5 Composición de tampón de Krebs:

Se añadió agua destilada a 6,92 g de NaCl, 0,35 g de KCl, 0,29 g de MgSO₄·7H₂O, 0,16 g de KH₂PO₄, 2,1 g de glucosa, 0,28 g de CaCl₂ y 2,1 g de NaHCO₃ para obtener 1 l.

Temperatura del tampón de Krebs en el tubo Magnus: 32°C.

Volumen del tampón de Krebs introducido en el tubo Magnus: 10 ml.

10 Preparación de las sustancias de prueba

Se añadió agua destilada a propionato de sodio y acetato de sodio para preparar una disolución acuosa de propionato de sodio 0,1 mol/l y una disolución acuosa de acetato de sodio 0,1 mol/l, que corresponden a las concentraciones en el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico. Se usaron como disoluciones acuosas de sustancias de prueba en la prueba de evaluación descrita a continuación.

15 Mientras tanto, se usó agua destilada como control.

Prueba de evaluación para el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico

Tras cambiar el tampón de Krebs, se añadieron 10 µl, 30 µl y 100 µl de la disolución acuosa de propionato de sodio 0,1 M, disolución acuosa de acetato de sodio 0,1 M, o agua destilada a cada uno de los tubos Magnus. Se llevaron a cabo la medición de la tensión y la observación de las condiciones del músculo durante 15 minutos. Se registraron gráficos de medición de tensión usando una registradora ajustada de tal manera que se provoca un desplazamiento de 5 cm por la tensión de 1 g en los gráficos de medición. Se usaron los gráficos de medición resultantes para observar picos de tensión asociados con la contracción del músculo. Se calculó la frecuencia de contracción (veces/minuto) a partir del número de picos (veces) que apareció por unidad de tiempo (minuto), se calculó la fuerza contráctil (g) a partir de la altura del pico (cm), y se usaron valores numéricos para la evaluación. Con los resultados obtenidos, se evaluaron adicionalmente comparaciones entre los grupos para determinar diferencias significativas mediante la prueba de la t de Student.

Resultados

Los resultados de frecuencia de contracción y fuerza de contráctil se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

SUSTANCIA AÑADIDA	CANTIDAD DE DISOLUCIÓN ACUOSA DE SUSTANCIA DE PRUEBA AÑADIDA (µL)	FUERZA CONTRÁCTIL (G)	FRECUENCIA DE CONTRACCIÓN (VECES/MINUTO)
AGUA DESTILADA n=6	0	1,01±0,30	0,78±0,38
	10	0,96±0,19	0,81±0,36
	30	0,95±0,41	0,72±0,40
	100	1,00±0,21	0,72±0,27
PROPIONATO DE SODIO n=5	0	1,21±0,85	0,70±0,49
	10	1,15±0,72	0,47±0,14
	30	1,24±0,77	0,73±0,19
	100	1,20±0,68	0,73±0,38
ACETATO DE SODIO n=7	0	1,53±0,77	0,71±0,52
	10	1,33±0,44	0,79±0,52
	30	1,20±0,42	0,81±0,63
	100	1,14±0,43	0,98±0,67

5 No se observó ningún cambio después de la adición de cualquiera de las sustancias de prueba para la frecuencia de contracción. En otras palabras, el propionato de sodio y el acetato de sodio incluidos en el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico no tienen ni un efecto de aumento de la frecuencia de contracción ni un efecto de supresión de la frecuencia de contracción.

No se observó ningún cambio después de la adición de cualquiera de las sustancias de prueba para la fuerza contráctil. En otras palabras, el propionato de sodio y el acetato de sodio incluidos en el producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico no tienen ni un efecto de aumento de la fuerza contráctil ni un efecto de supresión de fuerza contráctil.

10 Aplicabilidad industrial

La presente invención tiene un efecto de prevención y/o tratamiento de trastornos gastrointestinales funcionales, y por tanto es aplicable como productos farmacéuticos o alimentos o bebidas que tienen las mismas funciones.

REIVINDICACIONES

1. Un agente para su uso en prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional, que comprende como principio activo un producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico y/o un producto procesado del mismo, en el que el trastorno gastrointestinal funcional se selecciona del grupo que consiste en síndrome del intestino irritable, estreñimiento funcional y una combinación de los mismos.
5
2. Agente según la reivindicación 1, en el que la bacteria del ácido propiónico es una bacteria que pertenece al género *Propionibacterium*.
3. Agente según la reivindicación 2, en el que la bacteria que pertenece al género *Propionibacterium* es *Propionibacterium freudenreichii*.
- 10 4. Agente según la reivindicación 3, en el que *Propionibacterium freudenreichii* es *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 (FERM BP-8115).
5. Agente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente se usa en forma de alimento.
- 15 6. Uso de un producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico en la fabricación de un agente para su uso en prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional seleccionado del grupo que consiste en síndrome del intestino irritable, estreñimiento funcional y una combinación de los mismos.
- 20 7. Un producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico y/o un producto procesado del mismo para su uso en prevenir y/o tratar un trastorno gastrointestinal funcional que se selecciona del grupo que consiste en síndrome del intestino irritable, estreñimiento funcional y una combinación de los mismos.
8. Agente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el síndrome del intestino irritable es el síndrome del intestino irritable de tipo diarrea o de tipo combinación.
- 25 9. Uso según la reivindicación 6, en el que el síndrome del intestino irritable es el síndrome del intestino irritable de tipo diarrea o de tipo combinación.
10. Producto de fermentación del suero de la leche por una bacteria del ácido propiónico y/o un producto procesado del mismo según la reivindicación 7, en el que el síndrome del intestino irritable es el síndrome del intestino irritable de tipo diarrea o de tipo combinación.

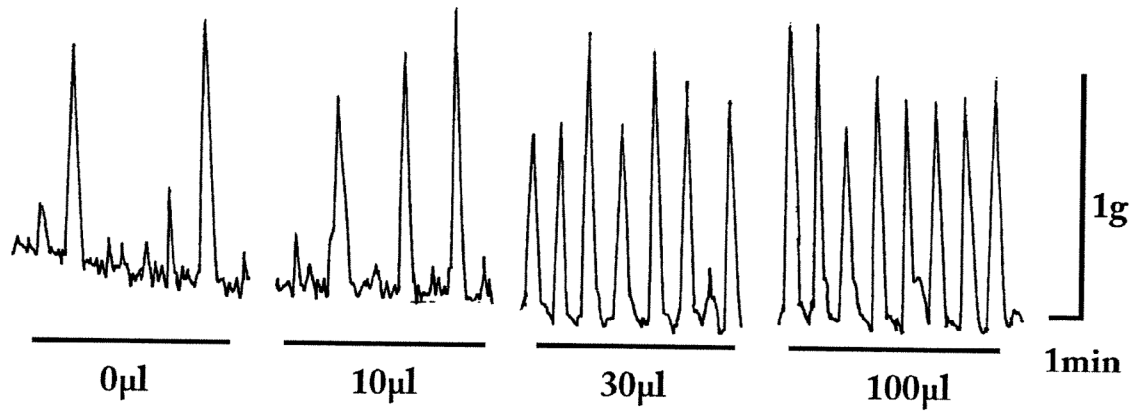


FIG. 1

RESUMEN DE LAS CUATRO SEMANAS

✱ GRADO DE MEJORA GENERAL:
EN COMPARACIÓN CON ANTES DE LA INGESTIÓN
(HACE 4 SEMANAS)

- MEJORÓ CONSIDRABLEMENTE
- MEJORÓ
- SIN CAMBIOS
- EMPEORÓ
- EMPEORÓ CONSIDRABLEMENTE

(POR FAVOR, ESCOJA UNA)

✱ COMPARACIÓN ENTRE PERIODOS TEMPRANO Y
TARDÍO: EN COMPARACIÓN CON EL COMPRIMIDO
DEL PERIODO TEMPRANO

- MEJOR EN EL PERIODO TEMPRANO
- SIN CAMBIOS
- MEJOR EN EL PERIODO TARDÍO

(POR FAVOR, ESCOJA UNA)

FIG. 3

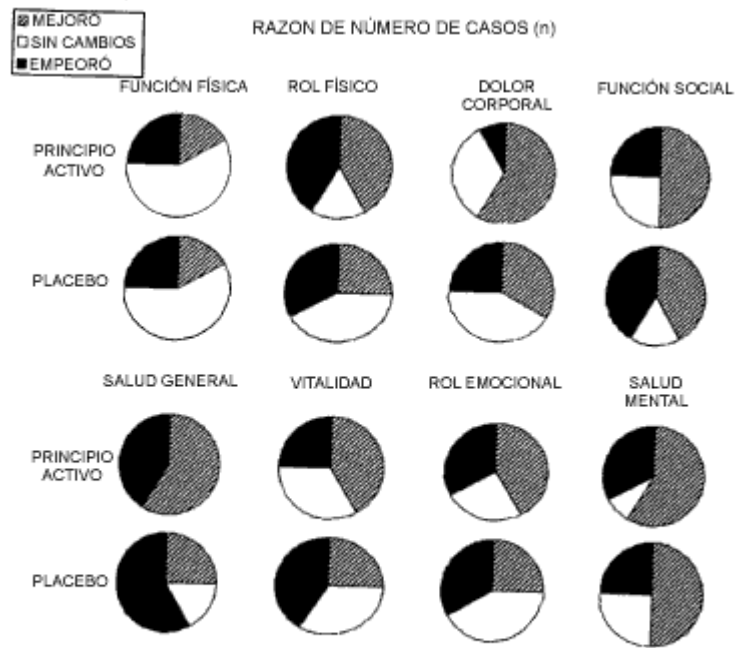


FIG. 4

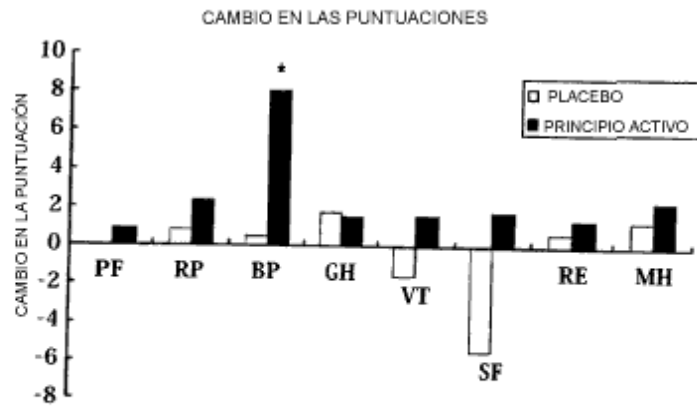


FIG. 5