

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902065552A1

Publication Date

20140104

Applicant

NEUPHARMA SRL

Title

COMPOSIZIONI DIETETICHE E/O FARMACEUTICHE COMPRENDENTI
CEPPI DI LACTOBACILLUS E BIFIDOBACTERIUM CAPACI DI DEGRADARE
GLI OSSALATI E DI INDURRE UNA RISPOSTA IMMUNITARIA DI TIPO
ANTI-INFIAMMATORIO

9839 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

FM/mc **“COMPOSIZIONI DIETETICHE E/O FARMACEUTICHE
COMPRENDENTI CEPPI DI *LACTOBACILLUS* E
BIFIDOBACTERIUM CAPACI DI DEGRADARE GLI OSSALATI E DI
INDURRE UNA RISPOSTA IMMUNITARIA DI TIPO
ANTI-INFIAMMATORIO”**

a nome : **NEUPHARMA s.r.l.**

con sede in: Roma

* * *

RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione ha per oggetto composizioni dietetiche o farmaceutiche comprendenti uno o più probiotici in grado di degradare gli ossalati e dotati di attività immunomodulante pro Th2 e/o produttori di citochine anti-infiammatorie.

STATO DELL'ARTE

La fibrosi cistica (FC) è una malattia genetica autosomica recessiva diffusa nella popolazione caucasica, con un'incidenza di circa 1/ 4.000 nati vivi.

La FC è causata da una mutazione del gene CFTCR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), presente sul cromosoma 7, che codifica una proteina di 1480 aminoacidi, situata sulla membrana cellulare delle cellule epiteliali, la cui funzione è quella di trasportare il cloro attraverso le membrane cellulari a livello della membrana apicale delle cellule epiteliali delle vie aeree, del pancreas, dell'intestino, delle ghiandole sudoripare, delle ghiandole salivari e dei vasi deferenti.

Lo squilibrio ionico determina un maggior riassorbimento di sodio e acqua e di conseguenza un muco denso e vischioso, povero di acqua e con una concentrazione molto alta di sale (4-5 volte la normalità). Nel pancreas le secrezioni possono dar luogo a infiammazioni, con formazioni di cisti circondate da tessuto fibrotico, fenomeno da cui deriva il nome di “fibrosi cistica”.

Negli organi interessati, le secrezioni mucose, essendo anormalmente viscosi e poco scorrevoli, determinano un'ostruzione dei dotti principali, provocando l'insorgenza di gran parte delle manifestazioni cliniche tipiche della malattia, come la comparsa di infezioni polmonari ricorrenti, insufficienza pancreatica, steatorrea, stati di malnutrizione, cirrosi epatica, ostruzione intestinale e infertilità maschile.

Sono note oltre 1000 differenti mutazioni suddivise in 6 classi. Di norma alla classe più bassa corrisponde un più alto rischio di sviluppare complicanze più severe.

L'aspetto più grave della FC è la malattia polmonare. Il muco dei pazienti FC è molto denso, difficilmente espettorabile e tende pertanto a ristagnare nelle vie aeree dando luogo a quadri di ostruzione bronchiale e infezioni batteriche che diventano croniche con una progressiva compromissione della funzione polmonare.

Il pancreas è colpito nell'80% dei casi con un ristagno dei succhi pancreatici nei dotti e formazione di cisti. Con il passare del tempo, il pancreas secerne una minor quantità di insulina portando a una forma di diabete insulino-dipendente.

Altre complicanze della fibrosi cistica sono uno stato infiammatorio

cronico e infezioni delle alte vie aeree. Le secrezioni che possono ristagnare nel naso e nei seni paranasali possono essere causa di rinite e pansinusite cronica.

La terapia della fibrosi cistica, pur essendo ancora limitata alla riduzione delle varie complicanze, ha consentito un significativo aumento della aspettativa di vita. Oltre la metà della popolazione raggiunge la maggiore età ed un bambino che nasce oggi con la FC ha buone possibilità di superare 50 anni.

L'aumento della sopravvivenza ha però fatto emergere ulteriori complicanze, sino a pochi anni fa estremamente limitate, quali ad esempio diabete, osteoporosi, nefrocalcinosi e insufficienza renale.

I pazienti affetti da FC necessitano spesso di trattamenti antibiotici prolungati per contrastare le infezioni croniche delle vie aeree a cui sono particolarmente esposti. Allo scopo, si impiegano soprattutto antibiotici notoriamente responsabili di effetti tossici sui reni, in particolare gli amino glicosidi, principalmente tobramicina e colimicina.

Tali effetti sono solitamente reversibili con l'interruzione del trattamento antibiotico, ma un uso prolungato può determinare effetti irreversibili, con riduzione del numero dei nefroni funzionanti.

Al grave rischio di insufficienza renale, si aggiungono anche i rischi di nefrocalcinosi e di litiasi urinaria da ossalato di calcio: ben il 92% dei pazienti FC hanno nefrocalcinosi della midollare renale, mentre l'urolitiasi si fa sempre più frequente man mano che aumenta l'aspettativa di vita (3,5% contro lo 0,2% della popolazione in generale).

Di recente l'iperossaluria è stata ritenuta la causa prima di litiasi renale,

problematiche renali e cardiomiopatia.

L'ossalato non viene degradato nell'organismo da enzimi ma dal microbioma intestinale che è capace di eliminare la maggior parte dell'ossalato ingerito. La parte residua, per la maggior parte salificata in forma insolubile, viene escreta con le feci.

Nei soggetti sani il ruolo fondamentale nella degradazione degli ossalati è svolto dalla microflora intestinale, in particolare da un microrganismo specifico, l'*Oxalobacter formigenes* presente nell'intestino dei vertebrati, in grado di utilizzare gli ossalati della dieta. Generalmente l'*Oxalobacter formigenes* riesce a colonizzare l'intestino nei primi mesi di vita o al massimo nella prima infanzia, realizzando con l'ospite una relazione simbiotica da cui dipende l'assorbimento intestinale dell'acido ossalico e conseguentemente la sua concentrazione nel plasma ed in tutti gli altri tessuti.

Oltre all'*Oxalobacter formigenes* esistono altri generi microbici (*Eubacterium*, *Enterococcus* e *Providencia*) che, pur con rendimenti solitamente inferiori, sono in grado di degradare l'acido ossalico.

Generalmente, a differenza dell'*Oxalobacter*, la cui crescita dipende completamente dalla presenza di ossalato e per tale motivo viene definito "specialista", le altre specie sono da considerarsi "generaliste" perché in grado di fermentare, oltre all'ossalato, molti altri substrati.

È stato riscontrato che tutti i soggetti affetti da iperossaluria enterica, steatorrea, sindrome del colon irritabile e morbo di Crohn mostrano basse attività di degradazione dell'ossalato, così come è stato valutato che la concentrazione di batteri degradanti gli ossalati in pazienti affetti da calcio-ossalato urolitiasi è di 3 LOG inferiore rispetto a quella di individui

sani.

Nei malati di FC il malfunzionamento del pancreas determina steatorrea con un eccesso di acidi grassi nel lume intestinale. Ad essi si lega in modo preferenziale il calcio che viene così ad essere deficitario per la salificazione dell'acido ossalico. La mancata formazione di ossalato di calcio, insolubile e quindi eliminabile attraverso le feci, fa aumentare la concentrazione di ossalato libero ed assorbibile, aggravando lo stato di iperossaluria.

Negli stessi soggetti l'elevato e pressoché continuato utilizzo di antibiotici, così come alterazioni gastrointestinali legate alla malattia di base, impediscono all'*Oxalobacter formigenes* di colonizzare. Ciò porta ad iperossaluria enterica ed a un incremento nell'assorbimento dell'ossalato, con conseguente aumento del rischio di iperossaluria urinaria e delle sue complicazioni a carico dell'apparato urinario e delle problematiche prologistiche correlate.

Un altro fattore di rischio che affligge i pazienti FC è costituito, come detto sopra, dalle infezioni polmonari croniche sostenute da aggregazioni composite di microrganismi in grado di secernere una matrice adesiva che forma un vero e proprio biofilm costituito da polimeri complessi, quasi sempre di natura polisaccaridica, difficili da aggredire e dissolvere, che formano una vera e propria barriera impenetrabile agli antibiotici ed ai farmaci.

Nei malati di FC non è tanto l'infezione in quanto tale ad arrecare i danni peggiori, quanto l'eccessiva risposta infiammatoria all'attacco dei batteri.

Sembra ormai accertato che lo stato infiammatorio indotto

dall'infezione polmonare peggiori enormemente a seguito di un effetto diretto sulle cellule epiteliali bronchiali della CFTR mutata, fenomeno che determina un incremento nella secrezione di citochine, specialmente la chemochina IL-8 inducente il reclutamento di neutrofili.

Il coinvolgimento diretto della CFTR mutata sull'aumento di produzione di citochine da parte di cellule epiteliali bronchiali è stato dimostrato negli ultimi anni scoprendo che, in risposta a *Pseudomonas aeruginosa*, linee bronchiali FC esprimono livelli più elevati di IL-8 rispetto a linee esprimenti CFTR normale. Ne deriva uno stato flogistico cronico che porta progressivamente alla distruzione del tessuto polmonare, fino all'insufficienza respiratoria irreversibile.

A questo stato infiammatorio nell'apparato respiratorio si aggiungono infiammazioni in molti altri tessuti ed organi, particolarmente a livello enterico dove, a causa di continui e pesanti trattamenti farmacologici, si verifica una riduzione dello spessore del muco che fa aumentare la permeabilità della mucosa e causa la perdita di tolleranza nei confronti di microrganismi commensali non patogeni che possono raggiungere gli strati epiteliali sottostanti e perpetuare lo stato di infiammazione.

La frequente concomitanza di diarrea o di costipazione complica ulteriormente un quadro generale già fortemente compromesso da insufficienza pancreatica, infezioni nelle vie aeree, osteoporosi, diabete e nefrolitiasi.

Esiste, pertanto, la necessità di diminuire e/o prevenire uno stato di iperossaluria enterica, da cui dipende in gran parte anche quella plasmatica ed urinaria, e di alleviare lo stato flogistico che caratterizza sia l'epitelio

intestinale che quello polmonare, ripristinando nel contempo la funzione di barriera della mucosa intestinale.

In riferimento alla riduzione dell'iperossaluria, già oltre dieci anni fa Campieri ha dimostrato che la somministrazione di ceppi appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* è in grado di ridurre l'escrezione urinaria di ossalato in soggetti con urolitiasi ed iperossaluria, lasciando pertanto supporre che tali ceppi siano capaci di degradare gli ossalati.

Successivamente Federici nel 2004 ha condotto uno studio su 12 ceppi di bifidobatteri evidenziando grande variabilità della capacità ossalato-degradativa: un ceppo di *Bifidobacterium lactis* (DSM 10140) è risultato in grado degradare circa il 60% dell'ossalato aggiunto al terreno colturale dopo 5 giorni di incubazione.

Turroni nel 2007 ha valutato l'attività di degradazione degli ossalati di 60 ceppi appartenenti a 12 specie di lattobacilli, evidenziando anche in questo caso che la capacità degradativa è altamente variabile, particolarmente significativa nelle specie *Lactobacillus acidophilus* e *gasseri*, almeno in riferimento ai ceppi studiati.

I ceppi più attivi oggi noti sono *Lactobacillus acidophilus* NCFM e il *Bifidobacterium lactis* DSM 10140 che vanno considerati ossalato-degradanti "generalisti" dal momento che traggono la loro fonte energetica primaria dai carboidrati.

Per quanto riguarda l'utilizzo di ceppi probiotici per il controllo dell'infiammazione, Salminen e successivamente Hemmi avevano evidenziato che la somministrazione di ceppi appartenenti a specie dei generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* è in grado di contrastare i processi di

infiammazione rinforzo della barriera intestinale, degradazione di antigeni enterici e controllo della produzione di citochine pro- e anti-infiammatorie.

Studi in vitro (Pessi, 1999) hanno evidenziato come componenti non definiti di lattobacilli possano avere effetti antiproliferativi su cellule T ed effetti soppressivi sulla secrezione di citochine.

Jijon e Rachmilewitz nel 2004 hanno verificato che alcuni ceppi di lattobacilli e bifidobatteri sono capaci di determinare inibizione della secrezione di IL-8 da parte delle cellule epiteliali, attenuazione della produzione di IFN- γ , inibizione della produzione di TNF- α , e miglioramento nello score istologico dell'infiammazione in topi knockout per IL-10.

Mediante l'impiego di modelli animali è stato dimostrato che la somministrazione di vari ceppi di *Lactobacillus* è in grado di determinare un incremento nella porzione di cellule T CD25+ (subset delle cellule CD4+ con un ruolo fondamentale nell'omeostasi intestinale) ed una riduzione nella reattività delle cellule T.

Il team di Guarino alcuni anni fa ha sperimentato in bambini con Fibrosi Cistica e infezione cronica da *Pseudomonas aeruginosa* la capacità di *Lactobacillus rhamnosus* LGG di modificare la microflora intestinale e controllare le infezioni respiratorie.

Mercenier, in uno studio condotto su animali, ha osservato un significativo miglioramento dello stato flogistico somministrando un ceppo di *Lactobacillus plantarum* in grado di produrre acido lipoteicoico.

Crescenti evidenze emergono sulle capacità di alcuni ceppi probiotici di stimolare le difese naturali dell'organismo e recentemente sono stati pubblicati risultati interessanti (Gleeson 2011) sul potenziale ruolo dei

probiotici negli atleti o in altre popolazioni sottoposte a stress psico-fisico, evidenziando che l'assunzione di alcuni ceppi probiotici aiuta a prevenire l'incidenza e la gravità di infezioni alle alte vie respiratorie.

La capacità delle specie appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* di produrre acidi grassi a catena corta crea condizioni ottimali di pH fecale, inibendo lo sviluppo dei microrganismi putrefacenti e favorendo quelli saccarolitici, con produzione di butirrato ad azione trofica per gli enterociti, determinante quindi nella prevenzione e diminuzione dell'infiammazione.

La ricerca attualmente ipotizza (Gordon 2011) che alterazioni del microbioma siano alla base di patologie infiammatorie croniche, allergie, diabete, obesità e tante altre forme più o meno patologiche e che i probiotici non agiscano alterando la composizione del microbioma intestinale, quanto piuttosto inducendo modificazioni nell'espressione genica delle specie batteriche già presenti.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda composizioni dietetiche o farmaceutiche comprendenti uno o più probiotici in grado di degradare gli ossalati e dotati di attività immunomodulante pro Th2 e/o produttori di citochine anti-infiammatorie.

Tali proprietà possono coesistere in un singolo probiotico oppure, più comunemente, le composizioni conterranno almeno un probiotico degradante gli ossalati e almeno un probiotico dotato di attività immunomodulante pro Th2 e/o produttore di citochine anti-infiammatorie.

Probiotici preferiti secondo l'invenzione appartengono ai generi

Lactobacillus e Bifidobacterium.

Più in particolare, i probiotici contenuti nelle formulazioni dell'invenzione presentano le seguenti proprietà:

A. Capacità di degradare l'acido ossalico per ridurre l'iperossaluria enterica, diminuire l'assorbimento intestinale di ossalato e migliorare lo stato di iperossaluria plasmatica ed urinaria causa di calcoli ed insufficienza renale;

B. Capacità di migliorare il quadro flogistico correlato all'iperossaluria enterica, incluse le alterazioni della permeabilità della membrana intestinale, grazie al ripristino di una microflora funzionalmente corretta in grado di esercitare una funzione trofica sulla mucosa e ripristinare l'effetto barriera;

C. Capacità di stimolare il sistema il sistema immunitario intestinale (GALT) ed indirettamente quello legato all'apparato respiratorio a produrre citochine con attività anti-infiammatoria, in particolare le citochine IL-4 e IL-10, spostando il rapporto Th1/Th2 verso un quadro Th2.

Oltre a tali proprietà, i probiotici impiegabili secondo l'invenzione sono preferibilmente scelti fra ceppi antibiotico-resistenti (ad esclusione dei ceppi in cui l'antibiotico-resistenza è codificata in elementi genici mobili, cioè facilmente trasmissibili, per evitare di trasferire questa caratteristica alle specie patogene) e capaci di resistere al succo gastrico, alla secrezione pancreatico ed ai sali biliari, caratteristiche che consentono di poter sopravvivere al transito gastro-duodenale e giungere in buono stato di vitalità a livello intestinale.

La selezione di ceppi adatti può essere effettuata con metodi

convenzionali e sono preferibilmente isolati da microbiota di individui sani così da garantire la sicurezza per l'uso come probiotici per l'uomo.

Per valutare la capacità di degradazione dell'acido ossalico sono state condotte prove di crescita dei ceppi che avevano superato le prove preliminari di selezione (antibiotico- resistenza e resistenza ai fluidi gastrici, biliari e pancreatici) in un mezzo colturale (MRS brodo +1% cys-HCl) contenente, oltre alla normale fonte di carbonio (glucosio 10 g/l), anche ammonio ossalato ad una concentrazione pari a 5 mM, quantità media di assunzione giornaliera di acido ossalico. Dopo inoculo di una coltura fresca del ceppo al 2% si incubava in anaerobiosi a 37°C per 24 ore.

Come riferimento positivo di microrganismo capace di degradare l'acido ossalico è stato usato l'*Oxalobacter formigenes* DSM 4420, mentre come riferimento negativo l'*Escherichia coli* ATCC 11105. Entrambi sono stati incubati nelle stesse condizioni operative usate per gli altri ceppi.

Al termine del periodo di incubazione, le brodoculture sono state centrifugate ed i surnatanti, dopo filtrazione e purificazione in colonnine SPE (Solid Phase Extraction), sono stati analizzati per HPLC, calcolando la differenza tra la concentrazione (5 mM) di ossalato presente nel mezzo colturale al tempo zero (prima della fermentazione) e la concentrazione residua dopo crescita del microorganismo.

È stata considerata pari al 100% la capacità del ceppo di degradare tutto l'acido ossalico presente nel mezzo colturale (5 mM), performance ottenuta, come da attese, dall'*Oxalobacter formigenes* DSM 4420 che, essendo uno "specialista", utilizza esclusivamente l'acido ossalico come fonte

di energia.

I ceppi di lattobacilli e bifidobatteri degradanti gli ossalati sono invece dei “generalisti”, utilizzando come fonte energetica dapprima i carboidrati e solo in un secondo tempo anche l’acido ossalico.

I risultati dei singoli ceppi sono espressi in percentuale da cui è possibile risalire alla quantità di acido ossalico degradata nelle 24 ore. Ad esempio, il risultato di 70% indica che il ceppo ha metabolizzato una quantità di ossalato pari a circa 3,5 mM, cioè il 70% di 5 mM.

I ceppi con il più alto grado di degradazione dell’ossalato sono risultati *Lactobacillus plantarum* PBS67 (70,0%), *Bifidobacterium longum* PBS 108 (64,0%), *Lactobacillus acidophilus* LA14 (59,2%), *Bifidobacterium breve* PBS 077 (48,0%), *Bifidobacterium longum* PBS 078 (40,8%).

Alcuni ceppi non hanno evidenziato alcuna capacità di metabolizzare gli ossalati, mentre il risultato degli altri è stato compreso tra il 20 ed il 30%.

Le proprietà immunomodulanti dei ceppi sono state valutate stimolando con le colture batteriche cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) di donatori adulti sani.

Le PBMC ed i ceppi sono stati co-incubati in atmosfera modificata con il 5% di CO₂ a 37°C per uno e cinque giorni, utilizzando come controllo positivo di 1 giorno: lipopolisaccaride (LPS) da *Escherichia coli*; come controllo positivo di 5 giorni: fitoemoagglutinina (PHA-P); come controllo negativo: PBMC senza aggiunta di alcuna stimolazione. I rapporti quantitativi tra PBMC e cellule batteriche sono stati determinati con tecnica citofluorimetrica.

Dopo uno e cinque giorni di co-incubazione i campioni sono stati

centrifugati ed i surnatanti sottoposti al dosaggio delle citochine mediante saggio ELISA.

In particolare sono state valutate le citochine IL-12p70 and IFN- γ , le principali ad azione Th1 e le citochine IL-4 and IL-10 che rappresentano quelle più importanti di tipo Th2, ad azione essenzialmente anti-infiammatoria.

I ceppi testati hanno mostrato una differente abilità di modulare le PBMC: la produzione di IL-4 è risultata significativamente elevata per la stimolazione di *L. plantarum* PBS067, *B. breve* PBS077 and *B. longum* PBS108.

Tutti i ceppi testati hanno indotto un significativo aumento dell'interleuchina IL-10, mentre solamente *B. breve* PBS077 non ha stimolato la secrezione di IFN- γ .

La valutazione del rapporto Th1/Th2 indica che mentre il ceppo *B. longum* PBS 108 sposta il rapporto a favore di Th1, *L. plantarum* PBS 067, *B. breve* PBS 077 e *B. longum* PBS 078 portano ad un decremento del numeratore, a favore di una risposta Th2.

I risultati ottenuti sono riassunti nella seguente Tabella:

Ceppo	Attività biologiche, elencate in ordine di importanza	
<i>Lactobacillus plantarum</i> PBS 067	1	Degradazione ossalati
	2	Attività anti-infiammatoria
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14	1	Degradazione ossalati
	2	Attività immunomodulante neutra
<i>Bifidobacterium breve</i> PBS 077	1	Attività anti-infiammatoria
	2	Degradazione ossalati
<i>Bifidobacterium longum</i> PBS 078	1	Attività anti-infiammatoria
<i>Bifidobacterium longum</i> PBS 108	1	Degradazione ossalati
	2	Attività pro-infiammatoria

Le formulazioni comprendenti i probiotici sopra menzionati o altri selezionati con le stesse metodiche sono in grado di contrastare sia l'assorbimento degli ossalati che il quadro flogistico correlato, incluse le alterazioni della permeabilità della membrana intestinale e possono pertanto essere di aiuto a soggetti affetti da:

- a) iperossaluria enterica, per eccessivo introito di ossalato con la dieta, per dismetabolismo della microflora intestinale incapace di degradare l'acido ossalico ingerito, ovvero da steatorrea e malassorbimento intestinale;
- b) iperossaluria plasmatica ed urinaria e quindi a rischio di urolitiasi e nefrocalcinosi;
- c) fibrosi cistica.

È critica la valutazione degli effetti sul sistema immunitario di ceppi da somministrare a soggetti con iperossaluria. Infatti, ceppi capaci di metabolizzare gli ossalati, ma in grado di stimolare da parte di elementi del sistema immunitario citochine a prevalentemente azione pro-infiammatoria, quali IL-12p70 ed IFN- γ , potrebbero peggiorare un quadro flogistico già fortemente compromesso.

Poiché l'assorbimento dell'ossalato libero avviene sia nel colon che nel tenue, è opportuno utilizzare specie batteriche in grado di colonizzare tutti i segmenti intestinali per ottenere una diminuzione di concentrazione e quindi di assorbimento lungo tutto l'intestino.

È noto che le specie batteriche appartenenti al genere *Lactobacillus* tendono a colonizzare prevalentemente il piccolo intestino, mentre le specie appartenenti al genere *Bifidobacterium* preferiscono le condizioni del grande intestino. L'utilizzo di una miscela di ceppi appartenenti ad entrambi i generi

(*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) è in grado di esercitare effetti positivi nei diversi segmenti intestinali.

Preferibilmente, per garantire una più rapida ed efficace colonizzazione, vengono utilizzati più ceppi di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* aventi caratteristiche complementari sia nella catabolizzazione degli ossalati che nella stimolazione di una risposta immunitaria di tipo Th2, con induzione alla secrezione di citochine anti-infiammatorie.

Le composizioni dell'invenzione sono particolarmente utili per il trattamento di pazienti affetti da FC allo scopo di prevenire e/o curare i rischi connessi all'iperassorbimento di acido ossalico (urolitiasi e nefrocalcinosi) e controllare lo stato flogistico intestinale e polmonare.

Oltre ai benefici sopra descritti, i preparati dell'invenzione migliorano la funzionalità intestinale e ripristinano l'effetto barriera della mucosa intestinale, contribuendo anche attraverso questo meccanismo a ridurre la possibilità di nuove infezioni che aggraverebbero uno stato infiammatorio già fortemente compromesso. Secondo l'invenzione possono essere vantaggiosamente utilizzati ceppi capaci di degradare gli ossalati e con attività immunomodulante pro Th2 e ceppi in grado di indurre la produzione di interleuchina IL-4 e IL-10 appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, da soli o in miscela tra loro.

Nei formulati vanno esclusi categoricamente i ceppi ad attività pro-infiammatoria (es. *Bifidobacterium longum* PBS 108), così come quelli ad impatto immunomodulante sconosciuto.

Sono viceversa ammessi ceppi che non inducono sostanziali

cambiamenti nel rapporto Th1/Th2.

I ceppi, in forma liofilizzata concentrata, possono essere presenti in quantità variabili da 10^6 a 10^{11} UFC/dose, preferibilmente tra 10^8 e 10^{10} UFC/dose ed ancora più preferibilmente tra $1 \cdot 10^9$ e $1 \cdot 10^{10}$ UFC/dose, come titolo complessivo dei vari ceppi.

A tutte le formulazioni possono essere aggiunte fibre prebiotiche, in ragione da 0,5 a 6 g, preferibilmente da 1 a 4 g ed ancor più preferibilmente 2 g in funzione della fibra utilizzata e del numero di dosi giornaliere consigliate. Le fibre prebiotiche, costituite da sostanze alimentari non digeribili, sono aggiunte per promuovere la crescita non solo dei ceppi somministrati, ma anche lo sviluppo e l'attività dei gruppi microbici funzionalmente positivi già presenti nell'intestino.

Le fibre possono essere costituite da Frutto-oligosaccaridi, Galatto-oligosaccaridi, Inulina, Xilo-oligosaccaridi, Gomma di Guar parzialmente idrolizzata, altre gomme, ecc.

Preferibilmente, i formulati destinati ai malati di FC contengono inoltre Piridossina (Vitamina B6) in ragione del 50-100% della RDA, magnesio e potassio citrato, in ragione a 10-20 mEq. pari a circa 1-2 g di citrati ed eventuali altri componenti attivi.

I probiotici potranno esser formulati in capsule di gelatina dura, bustine di granulato o polvere da sciogliere in acqua, flaconcini di polvere da ricostituire o in altre forme convenzionali di somministrazione, utilizzando tecniche ed eccipienti convenzionali. Oltre alle forme farmaceutiche convenzionali, potranno essere utilizzate composizioni dietetiche/alimentari, quali yogurth o simili.

Si riportano di seguito esempi di combinazioni dei ceppi selezionabili secondo i metodi sopra descritti.

Esempio 1

Combinazione di un ceppo a forte attività OX-degradante con un ceppo a forte attività anti-infiammatoria

- *Lactobacillus plantarum* PBS 067
- *Bifidobacterium longum* PBS 078.

Esempio 2

Miscele di ceppi ad attività OX-degradante ed anti-infiammatoria

- *Lactobacillus plantarum* PBS 067
- *Bifidobacterium longum* PBS 078
- *Lactobacillus acidophilus* LA 14
- *Bifidobacterium breve* PBS 077.

Esempio 3

Miscele di ceppi ad attività OX-degradante ed anti-infiammatoria contenente una carica minima di 2MLD per ceppo

<i>Lactobacillus plantarum</i> PBS 067	2MLD
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14	2MLD
<i>Bifidobacterium breve</i> PBS 077	2MLD
<i>Bifidobacterium longum</i> PBS 078	2 MLD
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	2MLD

Bibliografia

Campieri C, Campieri M, Bertuzzi V, Swennen E, Matteuzzi D, Stefoni S, Pirovano F, Centi C, Ulisse S, Famularo G, De Simone C.

Reduction of oxaluria after an oral course of lactic acid bacteria at high concentration *Kidney Int.* 2001 Sep;60 (3):1097-105.

Federici F, Vitali B, Gotti R, Pasca MR, Gobbi S, Peck AB, Brigidi P
Characterization and heterologous expression of the oxalyl coenzyme A decarboxylase gene from *Bifidobacterium lactis* *Appl Environ Microbiol* 2004 Sep; 70 (9):5066-73.

Turroni S, Vitali B, Bendazzoli C, Candela M, Gotti R, Federici F, Pirovano F, Brigidi P. Oxalate consumption by lactobacilli: evaluation of oxalyl-CoA decarboxylase and formyl-CoA transferase activity in *Lactobacillus acidophilus* *J Appl Microbiol.* 2007 Nov;103(5):1600-9.

Salminen S, Bouley C, Bouton-Ruault MC, Cummings J, Franck A et al. Functional food science in gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80, S147-S171. (1998b).

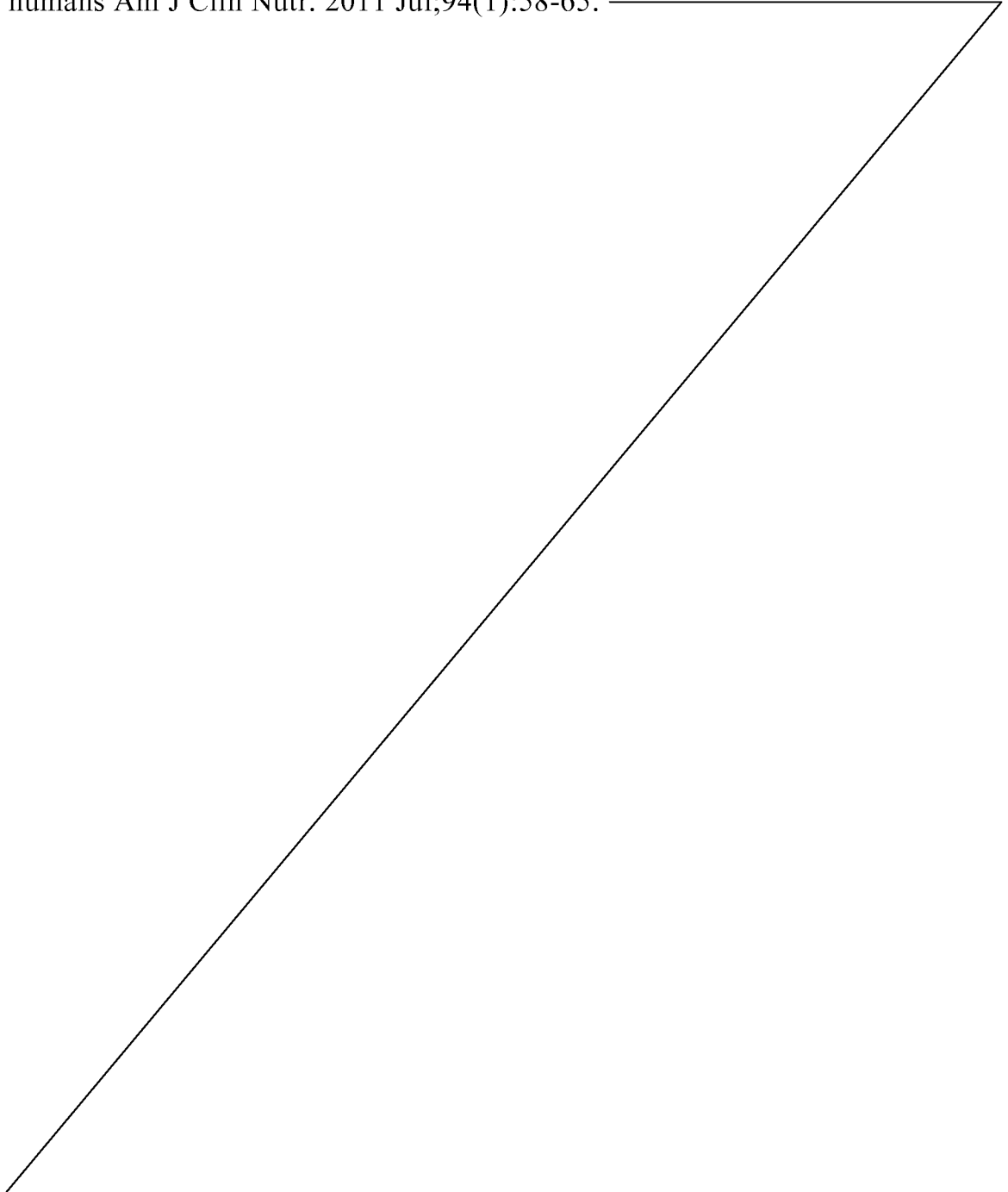
Pessi T, Sutas Y, Saxelin M, Kallioinen H, Isolauri E Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 65, 4725-4728 (1999).

Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004;126:1358-1373. 50.

Bruzzese E, Raia V, Spagnuolo MI, Volpicelli M, De Marco G, Maiuri L, **Guarino A** Effect of *Lactobacillus GG* supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: a pilot study. Clin Nutr. 2007

Jun;26(3):322-8. Epub 2007 Mar 13.

Gleeson M, Bishop NC, Oliveira M, Tauler P Daily probiotics (*Lactobacillus casei* Shirota) reduction of infection incidences in athletes *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2011 Feb;21(1):55-64 Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, Krakoff J Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans *Am J Clin Nutr.* 2011 Jul;94(1):58-65.



RIVENDICAZIONI

1. Composizioni dietetiche o farmaceutiche comprendenti uno o più probiotici in grado di degradare gli ossalati e dotati di attività immunomodulante pro Th2 e/o produttori di citochine anti-infiammatorie.
2. Composizioni secondo la rivendicazione 1 comprendenti almeno un probiotico degradante gli ossalati e almeno un probiotico dotato di attività immunomodulante pro Th2 e/o produttore di citochine anti-infiammatorie.
3. Composizioni secondo la rivendicazione 1 o 2 in cui i probiotici appartengono ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.
4. Composizioni secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui le citochine anti-infiammatorie comprendono IL-4 e IL-10.
5. Composizioni secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 4 comprendenti inoltre fibre ad azione prebiotica.
6. Composizioni secondo una o più delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui i probiotici sono scelti fra *Lactobacillus plantarum* PBS 067, *Bifidobacterium longum* PBS 07, *Lactobacillus acidophilus* LA 14, *Bifidobacterium breve* PBS 077.
7. Composizioni secondo la rivendicazione 6 in cui il probiotico degradante gli ossalati è *Lactobacillus plantarum* PBS 067 e il probiotico immunomodulante/anti-infiammatorio è *Bifidobacterium longum* PBS 078.
8. Composizioni delle rivendicazioni 1-7 per il trattamento e/o la prevenzione dell'iperossaluria e della infiammazione.
9. Composizioni secondo la rivendicazione 8 per il trattamento e/o la prevenzione dell'iperossaluria e della infiammazione in pazienti affetti da fibrosi cistica.

10. Composizioni della rivendicazione 7 in bustine da sciogliere in acqua.
11. Composizioni della rivendicazione 7 in flaconcini di polvere da ricostituire.
12. Composizioni secondo la rivendicazione 7 in capsule di gelatina dura.

Milano, 4 luglio 2012

CLAIMS

1. Dietetic or pharmaceutical compositions comprising one or more probiotics capable of degrading oxalates and having immunomodulating activity pro Th2 and/or producing anti-inflammatory cytokines.
2. Compositions according to claim 1 comprising at least one oxalate-degrading probiotic and at least one probiotic having immunomodulating activity pro Th2 and/or producing anti-inflammatory cytokines.
3. Compositions according to claim 1 or 2 wherein the probiotics belong to the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.
4. Compositions according to one or more of claims 1 to 3 wherein the anti-inflammatory cytokines comprise IL-4 and IL-10.
5. Compositions according to one or more of claims 1 to 4 further comprising prebiotic fibres.
6. Compositions according to one or more of claims 1 to 5 wherein the probiotics are selected from *Lactobacillus plantarum* PBS 067, *Bifidobacterium longum* PBS 07, *Lactobacillus acidophilus* LA 14, *Bifidobacterium breve* PBS 077.
7. Compositions according to claim 6 wherein the oxalate-degrading probiotic is *Lactobacillus plantarum* PBS 067 and the immunomodulating/anti-inflammatory probiotic is *Bifidobacterium longum* PBS 078.
8. Compositions according to claims 1-7 for the treatment and/or prevention of hyperoxaluria and inflammation.
9. Compositions according to claim 8 for the treatment and/or prevention of hyperoxaluria and inflammation in patients affected by cystic fibrosis.

10. Compositions of claim 7 in sachets to be dissolved in water.
11. Compositions of claim 7 in vials containing powder to be reconstituted.
12. Compositions according to claim 7 in form of hard-gelatin capsules.