



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101997900578382
Data Deposito	27/02/1997
Data Pubblicazione	27/08/1998

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	N		

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

CEPPI DI LATTOBACILLI UTILI NEL TRATTAMENTO DI DISFUNZIONI DEL SISTEMA GASTROINTESTINALE

Domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo:

"Nuovi ceppi di Lattobacilli utili nel trattamento di disfunzioni del sistema gastrointestinale"

a nome: PROGE FARM S.r.L.

con sede in NOVARA

inventore designato: Gabriele PEDRAGLIO

Depositata il con il N.

27 FEB. 1997

MI 97A 0426

1. Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda nuovi batteri lattici utili per il trattamento di turbe dell'apparato gastroenterico, più in particolare nuovi ceppi di *Lactobacillus Paracasei* e di *Lactobacillus Salivarius*, il loro procedimento di preparazione, le composizioni farmaceutiche, gli integratori dietetici e i prodotti alimentari (ad esempio latte, yogurt o altri prodotti caseari) che li contengono.

I batteri lattici sono molti diffusi in natura. Molte specie si ritrovano in frutta e verdura, nei prodotti caseari (latte fermentati, formaggi e yogurt), mentre solo alcuni ceppi si ritrovano nel tratto gastrointestinale ed urogenitale di mammiferi ed insetti.

L'attività benefica dei lattobacilli sulle affezioni gastrointestinali è nota sin dall'antichità, e per molto tempo essi sono stati ingeriti con latte e con i prodotti caseari.

2. Stato della tecnica

Nella maggior parte dei casi, i Lattobacilli noti somministrati con la dieta o in altra forma non sono in grado di superare l'ambiente acido gastrico, e/o di resistere ai succhi biliari, giungendo vivi e vitali nel sito d'azione intestinale, sviluppandosi in colonie abbastanza numerose da produrre effetti terapeutici significativi in tempi brevi.

Il trattamento delle turbe gastroenteriche così effettuato richiede in genere tempi prolungati di somministrazione, e nei casi più gravi ed ostinati, si rivela spesso scarsamente efficace.

Il brevetto US 5.032.399 descrive un particolare ceppo di *Lactobacillus acidophilus* isolato dalla normale flora intestinale, indicato come *Lactobacillus GG*, e successivamente riclassificato come *Lactobacillus casei subs. rhamnosus*, di cui riporta i benefici effetti nel trattamento di turbe gastrointestinali, la stabilità agli acidi ed ai succhi biliari, la capacità di aderire alle cellule della mucosa intestinale umana, la capacità di produrre acido lattico, e la capacità di forte crescita *in vitro*.

Recentemente, la Richiedente ha posto in commercio con il nome "Enterobacilli Proge Farm" un integratore dietetico contenente Lattobacilli isolati da flora intestinale, che trova indicazione nel trattamento delle turbe del sistema gastroenterico. Tale integratore dietetico, analogamente ad altri prodotti contenenti Lattobacilli presenti sul mercato, richiede la conservazione a

basse temperature, in particolare in frigorifero (a +4°C).

3. Problema Tecnico

Vari ceppi di Lattobacilli isolati da *habitat* intestinale se utilizzati dopo selezione su scala di laboratorio, si comportano da buoni colonizzatori sia *in vitro* che *in vivo*, esplicando la loro attività in breve tempo e con risultati soddisfacenti.

Tuttavia, per essere resi adatti alla commercializzazione su larga scala e all'utilizzo da parte dei consumatori, tali ceppi batterici debbono essere sottoposti a trattamenti tecnologici (quali liofilizzazione, miscelazione con eccipienti, ripartizione nelle diverse unità posologiche e formulazione come preparazioni farmaceutiche od integratori dietetici) che spesso influiscono negativamente sui ceppi, facendo loro perdere facilmente le peculiari proprietà probiotiche e la capacità originale di colonizzazione.

Un altro problema tecnico è rappresentato dalla scarsa stabilità alla conservazione dei ceppi di Lattobacilli presenti in commercio, che debbono essere per lo più conservati in frigorifero, e comunque perdono facilmente gran parte della loro attività.

4. Sommario

Ora la Richiedente ha inaspettatamente trovato un procedimento che permette di selezionare su scala industriale ceppi di Lattobacilli estremamente vitali e resistenti ai trattamenti tecnologici, utili per il trattamento terapeutico, profilattico,

o comunque probiotico di disfunzioni del sistema gastrointestinale nell'uomo, comprendente l'incubazione in un mezzo nutriente di una miscela contenente una molteplicità di ceppi di Lattobacilli, precedentemente liofilizzata e quindi reidratata, e la selezione delle colonie batteriche che proliferano per prime, sviluppandosi non oltre le prime 12 ore, preferibilmente entro circa 10 ore di incubazione in tale mezzo nutriente ad una temperatura da circa 30°C a circa 40°C, preferibilmente a 37°C.

Il passaggio di incubazione delle miscele di ceppi liofilizzati è tipicamente effettuata su piastra, in un terreno nutriente addizionato di agar, preferibilmente su un terreno MRS (de MAN Rogosa Sharpe broth) agarizzato.

La formazione delle colonie è convenientemente evidenziata al microscopio ottico, osservando in particolare il retro della piastra.

La miscela da sottoporre a liofilizzazione proviene dalla normale flora batterica intestinale di un soggetto umano sano, ed è tipicamente ottenuta da campioni biologici contenenti una molteplicità di specie batteriche (ad esempio mucosa intestinale, feci), isolati da *habitat* intestinale umano o dal relativo contenuto, mediante tecniche convenzionali.

Prima di essere sottoposti al procedimento secondo la presente invenzione, tali campioni sono in genere sottoposti ad opportuni pretrattamenti secondo metodi convenzionali (ad esempio

pretrattamenti fisici, quali omogeneizzazione, e/o diluizione in apposito diluente, ad esempio acqua).

Il presente procedimento comprende ed inoltre ad uno o più passaggi di pre-selezione mediante incubazione in un noto terreno nutritivo selettivo per Lattobacilli, in condizioni di incubazione note per lo sviluppo di Lattobacilli, da cui si ottengono miscele batteriche fortemente arricchite in Lattobacilli.

Tale passaggio di pre-selezione viene preferibilmente effettuato prima della liofilizzazione, sul campione biologico preferibilmente pretrattato come sopra descritto, ottenendo miscele batteriche che vengono quindi sottoposte a liofilizzazione ed agli altri passaggi di selezione secondo la presente invenzione, ed è tipicamente condotto in un mezzo liquido, ad esempio un mezzo MRS liquido eventualmente addizionato di altri nutrienti o sostanze utili, come più avanti specificato.

Costituiscono inoltre oggetto della presente invenzione i ceppi di Lattobacilli e le colture batteriche selezionate attraverso il presente procedimento, i preparati o formulazioni contenenti i presenti Lattobacilli in associazione ad un veicolo farmaceuticamente o comunque fisiologicamente accettabile, quali composizioni terapeutiche e/o profilattiche, integratori dietetici, presidi medico-chirurgici, prodotti alimentari.

5. Descrizione dettagliata

Il presente procedimento consente di selezionare ceppi di Lattobacilli altamente vitali, idonei ad essere formulati su scala industriale come preparazioni farmaceutiche o integratori dietetici, che si sono rivelati estremamente efficaci e vantaggiosi nel trattamento di varie disfunzioni del sistema gastrointestinale.

Secondo una forma di realizzazione particolare della presente invenzione, le miscele di ceppi batterici da sottoporre al presente procedimento provengono da campioni di feci umane.

Secondo una forma di realizzazione tipica della presente invenzione, miscele contenenti una molteplicità di Lattobacilli appartenenti alla microflora intestinale umana sono liofilizzate, reidratate, incubate in un mezzo nutriente, ed i ceppi selezionati dopo incubazione come sopra descritto sono ulteriormente sottoposti ad uno o più dei seguenti passaggi di selezione, preferibilmente a tutti, in un qualsivoglia ordine:

- a) incubazione in un mezzo nutriente contenente bile, in concentrazione di almeno lo 0,1% peso/volume, e selezione dei ceppi che proliferano in tale mezzo;
- b) incubazione in un mezzo nutriente acido, avente pH inferiore o uguale a 5,5 (più preferibilmente inferiore a 3,5), e selezione dei ceppi che proliferano in tale mezzo;
- c) incubazione in un mezzo nutriente contenente cellule della mucosa intestinale del soggetto da trattare, in particolare dell'uomo, e selezione dei batteri capaci di aderire alle cellule

ad una velocità media corrispondente alla adesione di almeno 50 batteri per ogni cellula intestinale in un tempo di incubazione fino a 5 minuti;

d) incubazione dei ceppi in un mezzo nutriente e selezione dei batteri che producono almeno 3.5 mEq di acido lattico per 10^{10} UFC (Unità Formanti Colonia) a 37°C in un periodo di 24 ore;

e) incubazione dei ceppi in un mezzo nutriente, e selezione dei ceppi batterici che si riproducono con un tempo di generazione a 37°C di meno di un'ora, più preferibilmente di circa 45 minuti.

I passaggi di selezione sopra indicati come da a) ad e) sono tipicamente effettuati nelle condizioni operative descritte nel brevetto US 5.032.399 e nel corrispondente brevetto europeo EP 199.535, il cui contenuto è qui incorporato per riferimento, con la differenza che si sottopongono ai passaggi da a) a d) miscele di microorganismi ottenute da una selezione preventiva derivante da raccolta dei microorganismi in grado di proliferare in un mezzo nutriente incubato con ceppi precedentemente liofilizzati e reidratati.

Il presente procedimento comprende in particolare i seguenti passaggi:

1) incubazione di una miscela di microorganismi contenente una molteplicità di Lattobacilli in un terreno selettivo per Lattobacilli, e raccolta delle cellule batteriche così sviluppatesi;

2) liofilizzazione delle cellule batteriche ottenute dal

passaggio precedente, preferibilmente in presenza di uno o più additivi per liofilizzazione;

3) reidratazione della miscela liofilizzata ottenuta dal passaggio precedente;

4) incubazione della miscela liofilizzata e reidratata così ottenuta in un mezzo nutriente, preferibilmente in un terreno selettivo per Lattobacilli, e raccolta delle cellule sviluppatesi non oltre le prime 12 ore, preferibilmente entro circa 10 ore di incubazione a 37°C in tale mezzo nutriente.

Le colture di Lattobacilli isolati secondo il presente procedimento possono essere occasionalmente contaminate da tracce di ceppi batterici appartenenti ad altre specie, sempre provenienti da microflora intestinale, senza con ciò uscire dagli scopi della presente invenzione.

Il terreno selettivo per Lattobacilli è ad esempio un brodo di coltura MRS (de Man - Rogosa - Sharpe broth, Oxoid), commercializzato ad esempio dalla DIFCO e descritto ad esempio in J. Applied Bacteriol. (1960), 23, 130, avente la composizione riportata nei sopra citati brevetti USP 5.032.399 ed EP-B-199.535, oppure altro terreno selettivo noto allo scopo, eventualmente addizionato di altri nutrienti o di altre sostanze. Si può utilizzare esempio un mezzo MRS addizionato di sali biliari (ad esempio in concentrazione dello 0,5% peso/volume sul totale del brodo).

L'incubazione in un terreno selettivo per Lattobacilli secondo il

passaggio 1) è tipicamente effettuata in un mezzo liquido.

L' incubazione dei ceppi batterici liofilizzati e reidratati, quale il suddetto passaggio 4) è tipicamente effettuato su piastre addizionate di agar, preferibilmente in un terreno selettivo per Lattobacilli, anche se alternativamente può essere effettuato in un altro mezzo nutriente comunemente noto per il loro sviluppo.

I suddetti passaggi di incubazione dei Lattobacilli sono tipicamente effettuati ad una temperatura compresa fra 30°C e 40°C, preferibilmente a 37°C, preferibilmente in atmosfera moderatamente anaerobica.

La liofilizzazione è preferibilmente effettuata in presenza di additivi noti come protettivi della liofilizzazione, ad esempio di latte scremato in polvere (in quantità ad esempio di circa il 10-12% in peso rispetto ai Lattobacilli da liofilizzare), saccarosio, glicerolo, o comunque operando con tecniche di liofilizzazione alternative e convenzionali.

Il presente procedimento consente di selezionare Lattobacilli, quali i ceppi depositati all'Institut Pasteur come più avanti riportato, dotati di elevata resistenza ai trattamenti tecnologici, in particolare di elevata vitalità ed elevata stabilità alla conservazione a temperature di circa +15°C/+20°C, ed inoltre, di una o più delle seguenti caratteristiche vantaggiose e sorprendenti: capacità di produrre acido lattico in forma di stereoisomero L-(+) sostanzialmente puro, o comunque

in quantità fortemente prevalente sull'isomero D(-), resistenza a vari antibiotici, in particolare insensibilità a tetracicline, associata a sensibilità ad altri antibiotici, in particolare rifampicina ed eritromicina.

Secondo un'altra caratteristica vantaggiosa, i Lattobacilli ottenuti secondo il presente procedimento non sono in grado di trasmettere ad altri microorganismi, e quindi ai patogeni, la insensibilità alle tetracicline.

In particolare, i Lattobacilli secondo la presente invenzione sono inoltre dotati di :

- stabilità agli acidi;
- stabilità ai succhi biliari;
- capacità di aderire alle cellule della mucosa intestinale;
- capacità di forte crescita *in vitro*.

La capacità di produrre solo, o comunque in elevata prevalenza, acido L (+)-Lattico, cioè l'isomero L(+), che non viene metabolizzato dall'organismo, ed è in grado di permanere a lungo nel lume intestinale, esplicandovi i suoi effetti, è estremamente vantaggiosa, in quanto l'acido lattico prodotto dai batteri lattici è per lo meno in parte responsabile degli effetti benefici della colonizzazione del tratto gastrointestinale da parte dei Lattobacilli, opponendosi ai patogeni presumibilmente attraverso l'abbassamento del pH dell'*habitat* intestinale.

La sensibilità ad alcuni tipi di antibiotici riscontrata per i Lattobacilli secondo la presente invenzione è una proprietà

importante e vantaggiosa. E' infatti noto che fenomeni di "resistenza crociata" agli antibiotici possono verificarsi per migrazione di materiale plasmidico da un microorganismo ad un altro. Di conseguenza, la somministrazione di Lattobacilli resistenti a tutti gli antibiotici è potenzialmente dannosa per l'organismo, per il possibile selezionarsi di ceppi di patogeni resistenti a tutti gli antibiotici.

E' quindi importante che il Lattobacillo somministrato per il trattamento delle turbe del sistema gastrointestinale sia sensibile per lo meno a qualche antibiotico, in modo da poter disporre di armi terapeutiche appropriate nel caso in cui si instaurino i fenomeni di resistenza crociata sopra ricordati.

Diversamente dai Lattobacilli isolati con il presente procedimento, vari ceppi di Lattobacilli precedentemente noti, fra cui il Lattobacillo GG descritto da US 5.032.399, sono risultati insensibili a tutti gli antibiotici, e quindi svantaggiosi da questo punto di vista.

La selezione secondo il procedimento dell'invenzione può essere rifatta periodicamente in modo da poter isolare ed utilizzare ceppi a lisotipia diversa, mantenendo tuttavia caratteristiche probiotiche, quali:

- capacità di giungere integri al sito d'azione;
- capacità di insediamento a livello gastrointestinale;
- produzione di acido L(+)Lattico.

La possibilità di selezionare ceppi a lisotipia diversa consente

di garantire la produttività ed efficacia del procedimento fermentativo e/o una colonizzazione sicura nell'intestino anche in presenza di fagi, che sono in grado di fagocitare e distruggere i Lattobacilli sia nell'ambiente di fermentazione, che nel lume intestinale, compromettendo rispettivamente la produzione dei Lattobacilli, o il trattamento terapeutico o dietetico che li utilizza.

Inoltre, i ceppi di Lattobacilli ottenuti con il procedimento secondo la presente invenzione sono inaspettatamente dotati di una maggiore stabilità rispetto a quelli ottenuti con procedimenti precedentemente noti, potendo essere conservati per lunghi periodi a temperature superiori a 4°C , in particolare a circa $+15^{\circ}\text{C}/+20^{\circ}\text{C}$. Ad esempio, dopo circa 18-24 mesi a circa 22°C si riscontra un abbattimento di cellule vive solo di 1 unità logaritmica.

Questa proprietà consente di riscontrare nelle presenti preparazioni commerciali quantità di lattobacilli vivi pari a solo circa 1 logaritmo in meno di cellule per dose unitaria rispetto al numero di cellule vive messe al tempo zero, anche dopo mesi dalla messa in commercio, diversamente da quanto riscontrato con varie composizioni commerciali della tecnica anteriore, che vanno incontro ad un elevato abbattimento di cellule vive rispetto a quelle dichiarate al momento del confezionamento, e pertanto sono spesso poco efficaci dal punto di vista terapeutico.

Infatti, il trattamento con Lattobacilli secondo la presente invenzione consente di ottenere risultati positivi, quali la remissione pressochè totale della sintomatologia di episodi di diarrea anche gravi ed ostinati dovuti ad esempio a radioterapia tumorale, in tempi brevi, di circa 1-2 giorni, nettamente inferiori a quelli richiesti con i Lattobacilli della tecnica anteriore. La rapidità di azione può essere per lo meno in parte attribuita alla elevata stabilità alla conservazione mostrata dai presenti Lattobacilli.

Il procedimento della presente invenzione ha in particolare consentito di selezionare nuovi ceppi di Lattobacilli appartenenti alle specie *Paracasei* e *Salivarius*, in particolare 3 ceppi depositati in accordi al Trattato di Budapest presso la "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" (CNCM) dell'Institut Pasteur (25, Rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15), di cui si riportano di seguito gli estremi di deposito:

- Lattobacillo PF1S, depositato in data 03 Aprile 1996, con il numero di deposito CNCM I-1687, con la designazione tassonomica di *Lactobacillus Paracasei*;
- Lattobacillo PF2P, depositato in data 03 Aprile 1996, con il numero di deposito CNCM I-1688, con la designazione tassonomica di *Lactobacillus Paracasei*;
- Lattobacillo PF1S1, depositato in data 06 Dicembre 1996, con il numero di deposito CNCM I-1794, con la designazione tassonomica di *Lactobacillus Salivarius*.

I 3 ceppi di Lattobacilli *Paracasei* e *Salivarius* sopra identificati attraverso i relativi estremi di deposito producono esclusivamente acido L(+) Lattico, sono sensibili a eritromicina e rifampicina e insensibili alle tetracicline, sono stabili agli acidi, resistendo a pH 3,5 per 30 minuti a 40°C.

In particolare, i ceppi di L. *Paracasei*, quali in particolare il Lattobacillo PF2P CNCM I-1688, sono insensibili a aztreonam, cefotixina, vancomicina e tetraciclina, e sensibili a eritromicina, rifampicina e cefotaxima, e fermentano il ribosio; e ceppi di *Salivarius*, quali il ceppo PF1S1 CNCM I-1794, sono insensibili a cefotaxima e tetraciclina, e sensibili a eritromicina e rifampicina.

I Lattobacilli secondo la presente invenzione possono essere somministrati come tali, oppure aggiunti ad un veicolo farmaceuticamente o comunque fisiologicamente accettabile, ottenendo vari tipi di preparati o formulazioni, quali composizioni farmaceutiche, integratori dietetici o prodotti alimentari, in particolare caseari (quali latte, yogurt), che costituiscono ulteriori oggetti della presente invenzione.

I presenti preparati o formulazioni contengono almeno un Lattobacillo secondo la presente invenzione, preferibilmente miscele di almeno un Lattobacillo della specie *Paracasei* o *Salivarius*, in particolare in quantità efficace per il trattamento terapeutico, profilattico o probiotico che si vuole effettuare, e possono essere ad esempio preparati secondo

tecniche convenzionali.

Il veicolo può contenere eccipienti, additivi, diluenti o altre sostanze utili, purchè farmacologicamente o fisiologicamente accettabili.

Per il trattamento delle turbe del sistema gastrointestinale secondo la presente invenzione, i Lattobacilli sono somministrati tipicamente per via orale, preferibilmente come miscele di *Paracasei* e *Salivarius*.

La quantità efficace riferita all'uomo è ad esempio compresa fra 10^7 e circa 2×10^9 Lattobacilli per persona al giorno, per un adulto del peso medio di 50-70 Kg. o per i neonati fra 10^6 e 10^8 Lattobacilli per individuo al giorno.

Preparati per il trattamento di turbe del sistema gastroenterico tipici secondo la presente invenzione contengono ad esempio da 10^6 a 3×10^9 UFC di Lattobacilli per dose unitaria.

Preferibilmente, i preparati secondo la presente invenzione contengono i Lattobacilli in forma liofilizzata.

A tale scopo, miscele acquose contenenti i Lattobacilli, e preferibilmente almeno un additivo per la liofilizzazione, sono tipicamente liofilizzate nelle condizioni sopra riportate per il procedimento di selezione dei Lattobacilli secondo la presente invenzione, oppure secondo metodiche note.

Preferibilmente, per gli scopi della presente invenzione, i Lattobacilli, tipicamente in forma liofilizzata, sono associati ad eccipienti o additivi scelti fra : vitamine (quali vitamine

del gruppo B, ad esempio vitamina B1 e B2, vitamina C e loro miscele), carboidrati (ad esempio edulcoranti, quali il saccarosio, e maltodestrine) e biossido di silicio, preferibilmente in miscela, ad esempio miscele di vitamine B1, B2, C, saccarosio, maltodestrine e biossido di silicio.

Le vitamine sono in quantità dipendente dal dosaggio tipico per quella vitamina, ad esempio circa 0,1-5 mg di vitamina B1 o B2 per 10^9 Lattobacilli e circa 5-20 mg di Vitamina C per 10^9 Lattobacilli; i carboidrati sono ad esempio in quantità di 500-1000 mg per 10^9 Lattobacilli (ad esempio circa 500-800 mg di saccarosio per 10^9 Lattobacilli, preferibilmente associati a circa 100-300 mg di maltodestrine per 10^9 Lattobacilli); il biossido di silicio è ad esempio in quantità di circa 0,5- 5,0 mg per 10^9 Lattobacilli.

Preferibilmente, nel prodotto finito il liofilizzato contenente i presenti Lattobacilli è confezionato in bustine in accoppiato carta/alluminio/polietene.

I Lattobacilli della presente invenzione trovano indicazione nel trattamento di varie turbe dell'apparato gastrointestinale, dovuti ad esempio, ma non solo, ad alterazioni degli equilibri della flora intestinale, in particolare diarrea e stipsi, ad esempio diarrea specifica e non specifica (in special modo diarrea conseguente all'uso di antibiotici), infiammazioni intestinali croniche, colite, flatulenza, acidità gastrica, gastroenteriti, stomatiti aftose, disordini peristaltici, altri

stati di alterato funzionamento e/o dismicrobismo gastrointestinale conseguenti ad operazioni chirurgiche, a disturbi renali o epatici, o a terapia radioattiva, ma anche in conseguenza a squilibri dietetici, a stress emozionali, ad invecchiamento o a disordini del sistema immunitario.

I presenti Lattobacilli sono inoltre efficaci nel trattamento del colon irritabile. Questo risultato è particolarmente inaspettato in considerazione del fatto che mentre è noto che i Lattobacilli si impiantano soprattutto a livello di intestino distale, non risulta che siano in grado di impiantarsi in grande quantità nel colon.

Si riportano alcune forme di realizzazione particolari della presente invenzione, a scopo illustrativo, ma non limitativo.

ESEMPIO -

Composizione per uso orale, in forma di liofilizzato contenuto in bustine di accoppiato carta/alluminio/polietene, ognuna contenente:

- *Lactobacillus Paracasei* PF2P, in quantità di almeno 10^9 UFC;
- *Lactobacillus Salivarius* PF1S1, in quantità di almeno 10^9 UFC;

Vitamina B1	mg 0,6;
Vitamina B2	mg 0,5;
Vitamina C	mg 20,0;
Saccarosio	mg 1417,8;
Maltodestrine	mg 400,0;
Aroma panna	mg 50,0;

Biossido di silicio mg 5,0.

oppure

- *Lactobacillus Paracasei* PF1S, in quantità di almeno 10^9 UFC;
- *Lactobacillus Salivarius* PF1S1, in quantità di almeno 10^9 UFC;

Vitamina B1 mg 0,6;

Vitamina B2 mg 0,5;

Vitamina C mg 20,0;

Saccarosio mg 1417,8;

Maltodestrine mg 400,0;

Aroma panna mg 50,0;

Biossido di silicio mg 5,0.

Riportiamo nelle tabelle seguenti i profili fermentativi dei tre ceppi di lattobacilli depositati all'Istituto Pasteur, ottenuti mediante il sistema API 50CHL.

TABELLA 1

Il ceppo di *L. Paracasei* PF1S-CNCM I-1687 fermenta i seguenti carboidrati:

L-Arabinosio, Ribosio, Galattosio, D-Glucosio, D-Fruttosio, D-mannosio, L-Sorbose, Ramnosio, Dulcitol, Inositol, Mannitol, Sorbitolo, α -Metil-D-Mannoside, α -Metil-D-Glucoside, N-Acetilglucosamina, Amigdalina, Arbutina, Esculina, Salicina, Cellobiosio, Maltosio, Lattosio, Melibiosio, Saccarosio, Trealosio, Inulina, Melicitosio, β -Gentobiosio, D-Turanosio, D-tagatosio.

TABELLA 2

Il L. Paracasei PF2P-CNCM I-1688 fermenta i seguenti carboidrati:

L-Arabinosio, Ribosio, Galattosio, D-Glucosio, D-Fruttosio, D-mannosio, L-Sorbose, Ramnosio, Dulcitol, Inositol, Mannitol, Sorbitolo, α -Metil-D-Mannoside, α -Metil-D-Glucoside, N-Acetilglucosamina, Amigdalina, Arbutina, Esculina, Salicina, Cellobiosio, Maltosio, Lattosio, Melibiosio, Saccarosio, Trealosio, Inulina, Melicitosio, α -Gentobiosio, D-Turanosio, D-tagatosio.

TABELLA 3

Il ceppo di L. Salivarius PF1S1-CNCM I-1794 fermenta i seguenti carboidrati:

Galattosio, D-Glucosio, D-Fruttosio, D-Mannosio, Mannitol, Sorbitolo, N-Acetilglucosamina, Maltosio, Lattosio, Melibiosio, Saccarosio, Trealosio, D-Raffinosio, Xilitolo, D-Arabitolo.

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per la selezione di ceppi di Lattobacilli utili nel trattamento di disfunzioni del tratto gastrointestinale nell'uomo, comprendente l'incubazione in un mezzo nutriente di una miscela contenente una molteplicità di ceppi di Lattobacilli, proveniente dalla normale flora batterica intestinale umana, precedentemente liofilizzata e quindi reidratata, seguita dalla selezione delle colonie che si sviluppano non oltre le prime 12 ore di incubazione in tale mezzo nutriente ad una temperatura da 30°C a 40°C.

2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, effettuato attraverso i seguenti passaggi:

1) incubazione di una miscela di microorganismi contenente una molteplicità di Lattobacilli in un terreno selettivo per Lattobacilli, e raccolta delle cellule batteriche così sviluppatesi;

2) liofilizzazione delle cellule batteriche ottenute dal passaggio precedente, preferibilmente in presenza di uno o più additivi per liofilizzazione;

3) reidratazione della miscela liofilizzata ottenuta dal passaggio precedente;

4) incubazione della miscela precedentemente liofilizzata e reidratata in un terreno selettivo per Lattobacilli o in altro mezzo nutriente, e raccolta delle cellule sviluppatesi non oltre le prime 12 ore di incubazione a 37°C in tale mezzo nutriente.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la raccolta delle cellule sviluppatasi dopo incubazione della miscela precedentemente liofilizzata e reidratata è effettuata entro 10 ore di incubazione a 37°C.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui l'incubazione è effettuata in un brodo di coltura MRS.

5. Procedimento secondo le rivendicazioni da 1 a 4, in cui l'incubazione della miscela precedentemente liofilizzata e reidratata è effettuata su piastre, in un terreno nutriente addizionato di agar.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui i passaggi di incubazione sono effettuati in atmosfera moderatamente anaerobica.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la liofilizzazione è effettuata in presenza di protettivi della liofilizzazione scelti fra latte scremato in polvere, saccarosio e glicerolo.

8. Procedimento secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui l'incubazione dei ceppi precedentemente liofilizzati e reidratati è seguita da uno o più dei seguenti passaggi di selezione, effettuati in un qualsivoglia ordine:

a) incubazione in un mezzo nutriente contenente bile, in concentrazione di almeno lo 0,1% peso/volume, e selezione dei ceppi che proliferano in tale mezzo;

b) incubazione in un mezzo nutriente acido, avente pH inferiore o

uguale a 5,5 (più preferibilmente inferiore a 3,5), e selezione dei ceppi che proliferano in tale mezzo;

c) incubazione in un mezzo nutriente contenente cellule della mucosa intestinale del soggetto da trattare, e selezione dei batteri capaci di aderire alle cellule ad una velocità media corrispondente alla adesione di almeno 50 batteri per ogni cellula intestinale in un tempo di incubazione inferiore o uguale a 5 minuti;

d) incubazione dei ceppi in un mezzo nutriente e selezione dei batteri che producono almeno 3.5 mEq di acido lattico per 10^{10} UFC (Unità Formanti Colonia) a 37°C in un periodo di 24 ore;

e) incubazione dei ceppi in un mezzo nutriente, e selezione dei ceppi batterici che si riproducono con un tempo di generazione a 37°C di meno di un'ora.

9. Coltura di ceppi batterici appartenenti alla specie *Lactobacillus*, ottenibile secondo il procedimento come definito nelle rivendicazioni da 1 a 8.

10. Coltura di un ceppo batterico appartenente alla specie *Lactobacillus*, caratterizzata da : stabilità alla conservazione a 22°C pari ad un abbattimento di cellule vive pari a 1 logaritmo dopo 18-24 mesi; capacità di produrre acido lattico in forma di stereoisomero L-(+) sostanzialmente puro; resistenza a tetracicline, associata a sensibilità a rifampicina ed eritromicina; non trasmissibilità della resistenza alle tetracicline.

11. Coltura di Lattobacilli secondo la rivendicazione 10, ulteriormente caratterizzati dalle seguenti proprietà : capacità di aderire alle cellule della mucosa intestinale umana in quantità media di almeno 50 batteri per ogni cellula intestinale in un tempo di incubazione fino a 5 minuti; capacità di produrre almeno 3.5 mEq di acido lattico per 10^{10} UFC (Unità Formanti Colonia) a 37°C in un periodo di 24 ore; capacità di riprodursi in un mezzo nutriente con un tempo di generazione a 37°C di meno di un'ora.

12. Coltura secondo la rivendicazione 9 o 10, in cui i ceppi di Lattobacilli derivano dalla normale microflora intestinale.

13. Coltura secondo la rivendicazione 9 o 10, in cui i ceppi batterici sono ceppi di Lattobacilli *Paracasei* o *Salivarius*.

14. Coltura secondo la rivendicazione 9 o 10, scelta fra le seguenti colture depositate presso la collezione CNCM dell'Institut Pasteur:

- *Lactobacillus Paracasei*, CNCM I-1687;
- *Lactobacillus Paracasei*, CNCM I-1688;
- *Lactobacillus Salivarius*, CNCM I-1794.

15. Preparazione per uso terapeutico, profilattico o probiotico nel trattamento di disfunzioni del sistema gastroenterico in campo umano, contenente una quantità efficace di almeno un ceppo di Lattobacillo come definito in ognuna delle rivendicazioni da 9 a 14, in associazione ad un veicolo farmaceuticamente o fisiologicamente accettabile.

16. Preparazione secondo la rivendicazione 15, scelta fra composizione farmaceutica, integratore dietetico, e prodotto alimentare.

17. Preparazione secondo la rivendicazione 15, per uso orale.

18. Preparazione secondo la rivendicazione 15, contenente almeno un Lattobacillo della specie *Paracasei*, *Salivarius*, o loro miscela.

19. Preparazione secondo la rivendicazione 15, in cui detto ceppo di Lattobacillo è in forma liofilizzata.

20. Preparazione secondo la rivendicazione 15, scelta fra composizione farmaceutica ed integratore dietetico, in cui i Lattobacilli sono associati ad eccipienti o additivi scelti fra vitamine, carboidrati e biossido di silicio.

21. Preparazione secondo la rivendicazione 15, contenente vitamina B1 e B2, vitamina C e loro miscela, saccarosio, maltodestrine e biossido di silicio.

22. Uso di una coltura contenente un ceppo di Lattobacillo come definito in ognuna delle rivendicazioni da 9 a 14, nel trattamento di disfunzioni del sistema gastrointestinale in campo umano.

23. Uso secondo la rivendicazione 22, in cui dette disfunzioni sono scelte nel gruppo costituito da diarrea specifica, diarrea aspecifica, diarrea conseguente all'uso di antibiotici, stipsi, infiammazioni intestinali croniche, colite, flatulenza, acidità gastrica, gastroenteriti, stomatiti aftose, disordini

peristaltici, stati di dismicrobismo, stati di alterato funzionamento gastrointestinale conseguenti a condizioni scelte fra operazioni chirurgiche, disturbi renali o epatici, terapia radioattiva squilibri dietetici, stress emozionali, invecchiamento e disordini del sistema immunitario.

24. Uso secondo la rivendicazione 22, in cui una di dette disfunzioni è il colon irritabile.

(SLV/) *Slv*

Milano, li 27.02.1997

p. PROGE FARM S.r.l.

Il Mandatario

Gemma Gervasi
Dr.ssa Gemma Gervasi

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

