

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 3 244 903

a nome: Infant Bacterial Therapeutics AB

a: 111 21 Stockholm - SVEZIA

dal titolo: Preparazione comprendente *Lactobacillus reuteri* e citrato per uso medico.

DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda generalmente l'accrescimento dell'insorgenza di attività di certi batteri *Lactobacillus reuteri* vivi in mammiferi. Per di più questa invenzione riguarda preparazioni terapeutiche comprendenti citrato e certi batteri *Lactobacillus reuteri* vivi, per migliorare la ricostituzione e la crescita precoce di detti batteri.

Contesto dell'invenzione

Composizioni a base di latte che sono usate per scopi nutrizionali e contengono batteri vivi sono note nell'arte. Per esempio, US 2012/0171166 divulga composizioni nutrizionali includenti oligosaccaridi e probiotici di latte umano. US 2003/0017192 divulga anche composizioni a base di latte contenenti probiotici, in particolare Bifidobatteri. CN 104206539 divulga un latte in polvere per lattanti contenente probiotici che contiene *Lactobacillus reuteri* DSM17938 e *Bifidobacterium animalis* Bb~12.

L'efficacia di terapeutici a base di batteri vivi è specifica per scopo e ceppo, e ceppi differenti possono contribuire alla salute dell'ospite attraverso meccanismi differenti. Batteri vivi differenti possono prevenire o inibire la

proliferazione di patogeni, sopprimere la produzione di fattori di virulenza da parte di patogeni, modulare la risposta immunitaria in un modo pro-infiammatorio o uno antinfiammatorio e influenzare l'ospite in un certo numero di altri modi.

Lactobacillus reuteri è un batterio dell'acido lattico eterofermentativo ed è trovato di frequente nel tratto gastrointestinale di esseri umani e altri animali. *L. reuteri* è considerato un organismo indigeno del tratto gastrointestinale umano ed è per esempio presente sulla mucosa del corpo gastrico, antro gastrico, duodeno, e ileo. Differenti ceppi di *L. reuteri* hanno l'abilità di colonizzare l'intestino, agire come agente terapeutico di diarrea, modulare la motilità delle viscere, fungere da un inibitore di patogeni batterici, modulare immunologicamente la mucosa gastrointestinale, fungere da un agente antinfiammatorio nello stomaco, ecc.

Un problema con la somministrazione orale di batteri vivi è quantità e/o attività insufficienti dei batteri vivi in ubicazioni del tratto intestinale dove impongono i loro effetti. Questo può avere come una conseguenza che il dosaggio di batteri vivi deve essere aumentato e/o è necessaria una somministrazione più frequente e può anche dare come risultato perdita di attività. Questo porta a costi non necessari, frequenza indesiderabile di assunzione e/o benefici di salute diminuiti o non esistenti.

In alcune applicazioni specifiche di batteri vivi è massimamente importante avere velocemente dopo la somministrazione batteri vivi attivi e metabolizzanti per gli effetti di salute voluti e, in alcune di queste applicazioni le quantità di nutrienti nell'individuo possono dover essere deliberatamente ristrette per ragioni mediche. Così il problema da risolvere è attivare velocemente i batteri vivi selezionati da somministrare a un individuo ma con il minimo di influenza su nutrienti dati all'individuo. L'invenzione nel presente contesto è intesa risolvere questo

problema per certi batteri.

Sommario dell'invenzione

Un oggetto primario della presente invenzione è fornire un'insorgenza accresciuta di attività di certi batteri *L. reuteri* vivi negli esseri umani, specialmente neonati. L'insorgenza accresciuta di attività è basata sulla ricostituzione migliorata (ad es. più veloce o più rapida) e crescita precoce (ad es. crescita o tasso di crescita migliorato) dei batteri vivi quando somministrati a detto neonato senza alterare significativamente il tenore di nutrienti dato al neonato. I neonati includono da lattanti nati pretermine a lattanti nati a termine.

Nell'invenzione nel presente contesto, per un'attivazione celere dei batteri *L. reuteri* vivi per esempio nel lattante prematuro, è stata sviluppata una nuova combinazione di componenti di substrato da aggiungere al prodotto. Gli inventori hanno sorprendentemente trovato che l'aggiunta di sali di citrato, preferibilmente in combinazione con una fonte di carbonio, come lattosio, alla miscela di formulazione, ha migliorato la ricostituzione e crescita precoce di *L. reuteri* DSM 17938 e batteri similari. I ceppi che possono usare citrato come un accettore di elettroni nel loro metabolismo, con influenza minima sul tenore di nutrienti dati al bambino, devono essere usati nell'invenzione nel presente contesto.

Più specificamente, l'oggetto della presente invenzione è fornire preparazioni per l'uso in trattamenti terapeutici come descritto nel presente contesto comprendenti componenti di substrato, inclusi citrato e certi batteri *L. reuteri* vivi, i componenti di substrato essendo progettati specificamente per migliorare la ricostituzione, il risveglio e la crescita precoce di detti batteri *L. reuteri* vivi.

La presente invenzione è basata sulla sorprendente scoperta che la presenza di citrato (esposizione a citrato) nel punto temporale di quando certi batteri *L. reuteri* sono attivati (cioè quando passano da una forma dormiente a una forma attiva e metabolizzante) migliora la loro attivazione, per esempio in termini di ricostituzione, risveglio e/o crescita migliorati. In altre parole, la presenza di citrato (esposizione a citrato) fornisce il "La" ai batteri quando sono attivati.

Dunque, la presente invenzione utilizza un metodo per attivare batteri *L. reuteri* vivi, comprendente esporre detti batteri a una preparazione comprendente citrato, in cui detti batteri hanno l'abilità di utilizzare citrato come un accettore di elettroni esterno. In particolare, detta utilizzazione di citrato dà come risultato un tasso di crescita migliorato. Dunque, la presente invenzione utilizza anche un metodo per attivare batteri *L. reuteri* vivi, comprendente esporre detti batteri a una preparazione comprendente citrato, in cui detti batteri hanno l'abilità di utilizzare citrato per il tasso di crescita migliorato.

L'invenzione fornisce gli usi terapeutici di tali batteri attivati da citrato o preparazioni come descritto nel presente contesto.

Forme di realizzazione della presente invenzione sono definite nelle rivendicazioni. In particolare, la presente invenzione riguarda una preparazione comprendente (i) un batteri *Lactobacillus reuteri* vivo che ha l'abilità di utilizzare citrato come un accettore di elettroni esterno e (ii) citrato, per l'uso nel trattamento terapeutico di un soggetto con una condizione che beneficia della somministrazione di una più veloce attivazione di un batteri *Lactobacillus reuteri* vivo attivato più celermente o un batteri *Lactobacillus reuteri* con un tasso di crescita migliorato;

in cui i batteri nella preparazione sono congelati, liofilizzati o crioessiccati,

in cui detta preparazione congelata, liofilizzata o crioessiccata è ricostituita in una soluzione acquosa appropriata per la somministrazione al soggetto prima della somministrazione a detto soggetto;

in cui detto soggetto è un soggetto umano ed è un neonato, o un lattante fino a un anno di età, o è un soggetto che è nato prematuramente;

in cui detta condizione è una condizione in cui il soggetto neonato, lattante o prematuro ha difficoltà ad alimentarsi per via orale, è incapace di allattamento al seno o alimentarsi per via orale, o richiede nutrizione parenterale o endovenosa, o in cui la quantità di nutrienti nell'intestino è stata deliberatamente ristretta per ragioni mediche; e

in cui detto uso non altera significativamente lo stato nutrizionale del soggetto neonato, lattante o prematuro.

In forme di realizzazione preferite, detto citrato è presente in detta preparazione congelata, liofilizzata o crioessiccata, e/o detto citrato è presente nella formulazione finale per la somministrazione a detto soggetto.

La somministrazione dei batteri o preparazioni batteriche in detti usi terapeutici dell'invenzione è svolta in quantità farmaceuticamente o fisiologicamente efficaci, a soggetti (esseri umani) in necessità di trattamento. Dunque, detti usi terapeutici possono comportare il passaggio addizionale di identificare un soggetto in necessità di trattamento. Forme di realizzazione e peculiarità alternative e preferite dell'invenzione come descritto altrove nel presente contesto si applicano ugualmente a questi usi terapeutici dell'invenzione.

Breve descrizione dei disegni

La Figura 1 è un grafico che mostra la crescita di *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in "substrato intestinale simulato". Sono state sottoposte a

prova due differenti fonti di carboidrati in combinazione con tre differenti accettori di elettroni. I batteri non sono cresciuti molto soltanto con i carboidrati, ma, quando sono stati addizionati accettori di elettroni, la crescita è aumentata. Il citrato come accettore di elettroni ha mostrato l'effetto più alto.

La Figura 2 mostra i risultati da elettroforesi su gel che identificano la coltura di fermentatore come DSM 17938: 1. Marcatore (GeneRuler 1 kb più scala di DNA); 2. Campione di fermentatore 1 (66 ng/μl); 3. Campione di fermentatore 2 (6,6 ng/μl); 4. Controllo positivo (sospensione batterica di DSM 17938); 5. Controllo negativo (H₂O); 6. Marcatore

La Figura 3 mostra i risultati dagli esperimenti di torbidità, rivelando che un mezzo di liofilizzazione contenente citrato fa sì che DSM 17938 raggiunga un aumento di OD del 3% più celere in confronto al mezzo di liofilizzazione senza citrato. * = differenza significativa (test t di Student, $\alpha = 0,05$).

Descrizione dettagliata dell'invenzione e

Forme di realizzazione preferite di essa

Per facilitare la comprensione dell'invenzione, nel seguito sono definiti numerosi termini/espressioni.

"Neonatale", o *"neonato"* e *"appena nato"* sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono a un bambino appena nato e al periodo di tempo direttamente dopo la nascita. Questo termine include da lattanti nati pretermine o lattanti prematuri a lattanti nati a termine, e il periodo di tempo direttamente dopo la nascita.

"Lattante" e *"bambino"* sono usati in modo intercambiabile e si riferiscono a un bambino appena nato e al suo primo anno di vita (fino a un anno o fino a dodici mesi).

"Pretermine" e *"prematuro"* si riferisce a una nascita che ha luogo prima della settimana 37 di gravidanza (o il punto temporale equivalente nei mammiferi non umani).

"Infezione" si riferisce all'invasione di un microrganismo causante malattia.

Un *"batteri metabolizzante"* è vitale, a significare che cresce e si replica utilizzando componenti di substrato idonei per esempio dando come risultato la produzione di metaboliti e a significare che i batteri possono essere usati per scopi specifici.

"Batteri morti" significa un batteri non metabolizzante che non si replica e non può essere reso vitale.

"Batteri dormienti", significa un batteri non metabolizzante che non si replica ma è vivo e può essere attivato (o riattivato) in un batteri metabolizzante. Esempi di tali batteri dormienti sono batteri congelati o crioessiccati o liofilizzati (o altrimenti essiccati, ad es. essiccati per nebulizzazione). A sua volta una "preparazione dormiente" significa una preparazione comprendente batteri dormienti, per esempio una preparazione congelata o crioessiccata o liofilizzata (o altrimenti essiccata, ad es. essiccata per nebulizzazione).

"Batteri vivi" significa batteri metabolizzanti o dormienti che possono essere attivati per metabolizzare.

"Attivazione" di batteri significa il processo di cambiamento dello stato di un batterio dall'essere dormiente allo stato di batteri metabolizzanti.

L'invenzione nel presente contesto può essere usata per fornire un'insorgenza accresciuta di attività di certi batteri *L. reuteri* vivi, specialmente quando vi sono quantità limitate di nutrienti per i batteri nella sede di somministrazione. Tutto questo viene fatto senza alterare significativamente altro

stato nutrizionale dell'ospite.

Nella presente invenzione le quantità locali e/o attività metabolica di *L. reuteri* selezionati sono accresciute portando, tra le altre cose, al fatto che il potenziale di abbassamento del dosaggio dei batteri vivi e inoltre che sono possibili benefici di salute sito-diretti.

NEC (enterocolite necrotizzante) è una condizione medica osservata primariamente in lattanti prematuri. È caratterizzata da danno variabile al tratto intestinale, che oscilla da lesione mucosa a necrosi e perforazione a tutto spessore dove porzioni delle budella subiscono necrosi per via di infezione e infiammazione nell'intestino. Si verifica dopo la nascita ed è la seconda causa più comune di mortalità in lattanti prematuri. Sintomi iniziali includono intolleranza all'alimentazione, residui gastrici aumentati, dilatazione addominale e feci con sangue. Per questa malattia imprevedibile e devastante non vi è alcun trattamento definitivo. Dunque, strategie di prevenzione di NEC sono vitali e urgentemente necessarie, ma ad oggi nessuna è stata adottata con successo o generalmente come standard di cura, e la profilassi per SNC rimane una vera necessità medica non soddisfatta. Il coinvolgimento di un microbiota gastrointestinale anomalo nella NEC include scoperte di batteriemia ed endotossiemia in lattanti con NEC e scoperte radiologiche di pneumatosi intestinale, che probabilmente rappresenta il gas sottomucoso prodotto mediante fermentazione batterica.

È stato mostrato che i lattanti pretermine a rischio di ricevere o sviluppare NEC, o aventi NEC, beneficiano di *L. reuteri* DSM 17938 nel loro intestino per contrastare l'infezione e infiammazione massive associate a NEC. Questa procedura potenzialmente salva delle vite nelle NICU (unità di cura intensiva neonatale). Il prodotto deve essere dato al bambino tramite un tubo nasogastrico

od orogastrico (NG/OG) direttamente nello stomaco.

Nei primi giorni di vita di un bambino pretermine a rischio di sviluppare NEC, la fornitura di nutrienti per mantenere vivo il bambino è normalmente data attraverso un'erogazione parenterale, e normalmente non sono dati inizialmente nutrienti all'intestino. La ragione di questo è che nutrienti precoci dati attraverso alimentazione enterale possono indurre NEC, così la nutrizione è pertanto data per via parenterale. Questo a sua volta significa che non vi sono nutrienti nell'intestino per supportare l'attivazione e crescita dei batteri di acido lattico necessari, particolarmente nei primi critici giorni di vita e particolarmente nei lattanti prematuri. Dal momento che l'intestino è un ambiente vivente, possono essere disponibili alcuni nutrienti e zuccheri limitati, ma non in entità tale da supportare un'attivazione celere e una crescita precoce dei batteri in quelle condizioni.

L'invenzione nel presente contesto è di fornire una soluzione migliorata al problema abilitando un'attivazione celere e selettiva dei batteri di acido lattico vivi o qualsiasi altro batteri vivo idoneo già quando viene erogato nell'intestino del bambino, per esempio, sulla via nel sistema di erogazione di alimentazione a tubo, con minima influenza sui nutrienti dati al bambino.

Normalmente il latte umano è la fonte primaria di nutrizione per i bambini sani appena nati. Durante i primi giorni di lattazione, la madre produce quello che è chiamato colostro, che è un fluido giallastro poco denso ricco di proteine e anticorpi per fornire al bambino un buon avvio. Dopo pochi giorni il fluido cambia gradualmente e diventa latte maturo che contiene proteina, grasso, carboidrati e minerali. I carboidrati consistono principalmente in lattosio. Il primo giorno di lattazione le concentrazioni di citrato e lattosio sono normalmente come il

seguinte esempio: citrato 0,25 mM e lattosio 76 mM, mentre al quinto giorno di lattazione le concentrazioni sono come segue: citrato 5 mM e lattosio 173 mM. Ricalcolato, questo dà un rapporto tra citrato e lattosio da 1:30 a 1:300.

Per varie ragioni l'allattamento al seno di un bambino appena nato può non essere fattibile, per esempio, ma non limitato a, nascita pretermine, parto complicato, problemi funzionali (ad es. la madre non produce latte o produce latte insufficiente, ostruzione dei dotti galattofori, mastite), infermità della madre ecc. In tali casi il bambino necessita di nutrizione in altri modi, e normalmente formule per lattanti sono disponibili e possono essere fornite ai lattanti per compensare la lattazione. In eventi critici, per esempio lattanti pretermine dove i lattanti non hanno avuto il tempo di svilupparsi adeguatamente nell'utero e spesso mostrano budella non sviluppate, è fondamentale instaurare velocemente un ambiente nell'intestino che rallenti un'infezione e un'infiammazione in corso. I bambini nati pretermine sono sensibili e necessitano di cura apposita per essere in grado di adattarsi alla vita all'esterno dell'utero.

Per neonati cui è diagnosticata o a rischio di sviluppare NEC, il prodotto per l'uso dell'invenzione nel presente contesto è spesso dato tramite un tubo orogastrico o nasogastrico (OG/NG) direttamente nello stomaco e nutrienti per mantenere vivo il bambino sono normalmente dati attraverso un'erogazione parenterale, a significare che normalmente non vi sono nutrienti inizialmente dati all'intestino.

Nell'invenzione nel presente contesto, per un'attivazione celere dei batteri vivi per esempio nel lattante prematuro, è stata sviluppata una nuova combinazione di componenti di substrato da aggiungere alla preparazione. Gli inventori hanno sorprendentemente trovato che l'aggiunta di sali di citrato,

preferibilmente in combinazione con una fonte di carbonio, come lattosio, alla miscela di formulazione ha migliorato la ricostituzione e crescita precoce di *L. reuteri* DSM 17938.

Mediante questa invenzione, il citrato agisce da un accettore di elettroni esterno e rilascia il freno di NAD(P)H nel metabolismo mediante i batteri specifici.

A questo riguardo, la fermentazione è un processo che rilascia energia da uno zucchero e non richiede ossigeno o una catena di trasporto di elettroni. Invece come accettore di elettroni è usata una molecola organica che svolge la riossidazione di NAD(P)H prodotto durante la glicolisi. Molto spesso questa molecola organica è piruvato, il prodotto terminale del percorso di Embden-Meyerhof (EMP), il tipo più comune di glicolisi.

I lattobacilli omofermentativi convertono carboidrati in lattato usando l'EMP, mentre lattobacilli eterofermentativi (come *L. reuteri*) usano il percorso di fosfochetolasi (PKP). La PKP ha una scarsa resa energetica in confronto a quella dell'EMP, ma questo può essere compensato mediante l'aggiunta di accettori di elettroni esterni, che creano percorsi alternativi per la riossidazione di NAD(P)H. Questo dà come risultato un'ATP addizionale, rendendo la PKP efficiente quanto l'EMP. Nella presente invenzione, citrato è usato come un accettore di elettroni esterno e dunque sono selezionati batteri *L. reuteri* che hanno l'abilità di utilizzare citrato come un accettore di elettroni esterno.

La fonte di carbonio, come lattosio, è specificamente efficace per crescita celere dei ceppi adattati al latte materno umano e che sono in grado di usare citrato come un accettore di elettroni, come *L. reuteri* DSM 17938.

L'effetto visto mediante *L. reuteri* DSM 17938 e citrato è specifico per ceppo e per esempio altri ceppi di *Lactobacillus reuteri* come *L. reuteri* ATCC

PTA-4659, *L. reuteri* ATCC PTA-6475 e *L. reuteri* ATCC PTA-5289 non sono in grado di usare citrato come un accettore di elettroni e dunque non sono appropriati per l'uso nella presente invenzione. Citrato e lattosio sono presenti nel latte umano e sono una delle basi per la crescita di *L. reuteri* DSM 17938 nel latte.

L'invenzione nel presente contesto riguarda l'aggiunta di citrato in rapporto appropriato con lattosio, o un'altra fonte di carbonio idonea (per esempio altri zuccheri come saccarosio, fruttosio, glucosio o galattooligosaccaridi [GOS]), in un prodotto da dare a un individuo che necessita di un batteri *L. reuteri* vivo rapidamente attivato, come *L. reuteri* DSM 17938 con influenza minima sui nutrienti dati. Questo rende la ricostituzione e crescita di *L. reuteri* DSM 17938 più simile a quelle condizioni viste nelle viscere di lattanti allattati al seno nei primi giorni di vita.

La presente invenzione mira a risolvere le problematiche correlate alla salute associate alle condizioni per esempio di NEC fornendo certi ceppi batterici di *L. reuteri* vivi e antinfiammatori come *L. reuteri* DSM 17938, o ceppi di *L. reuteri* con abilità simile di utilizzare citrato come un accettore di elettroni, con una ricostituzione e capacità di crescita precoce migliorate. Il prodotto per l'uso dell'invenzione può anche essere usato per neonati che hanno difficoltà nell'alimentazione orale e a ricevere nutrizione endovenosa senza che sia loro stata specificamente diagnosticata NEC. L'invenzione può inoltre essere usata in altri casi dove una rapida attivazione di specifici batteri *L. reuteri* è benefica di una prospettiva di salute come esposto nelle rivendicazioni.

L'invenzione incorpora una rapida attivazione dei batteri *L. reuteri* vivi liofilizzati per esempio nel lattante prematuro mediante una nuova combinazione di componenti di substrato da aggiungere al prodotto finale. L'invenzione

incorpora inoltre l'uso di componenti di substrato che sono selezionati e miscelati in un rapporto che serve specificamente a supportare l'insorgenza accresciuta di attività dei batteri specifici.

La presente invenzione utilizza dunque un metodo per attivare batteri *L. reuteri vivi* o migliorare l'attivazione di batteri *L. reuteri vivi* mediante l'addizione o incorporazione di citrato o altrimenti esponendo detti batteri a citrato (e facoltativamente altri componenti di substrato). L'attivazione di batteri come descritto nel presente contesto può prendere la forma di ricostituzione migliorata di una preparazione batterica viva (ad es. quando una formulazione essiccata, o altrimenti dormiente, e/o concentrata di batteri dormienti è diluita e attivata per l'uso) che può a sua volta manifestarsi come crescita migliorata e/o più rapida dei batteri vivi una volta che la ricostituzione ha avuto luogo, o l'insorgenza accresciuta (aumentata) o più celere di altre attività batteriche, ad es. metabolismo o colonizzazione.

Dunque, le preparazioni per l'uso dell'invenzione, e la presenza di citrato (esposizione a citrato) nelle formulazioni a base di *L. reuteri* (ad es. nelle formulazioni finali per la somministrazione al soggetto), danno origine all'attivazione migliorata, ad es. la ricostituzione migliorata o più rapida e/o crescita o tasso di crescita migliorato o più rapido di batteri vivi, quando confrontate con formulazioni batteriche che non hanno citrato o una quantità appropriata (cioè una quantità attivante) di citrato nella formulazione. Tale uso di citrato in formulazioni per attivare batteri *L. reuteri vivi* da uno stato dormiente (quando tali batteri sono congelati, liofilizzati, o crioessiccati), a conoscenza degli inventori, non è stato divulgato prima e dà come risultato un processo migliorato per la manipolazione di tali batteri, specialmente per certi trattamenti medici come descritto altrove nel

presente contesto.

Per esempio, l'attivazione rapida di batteri *L. reuteri* vivi dormienti dopo (o prima o durante) la somministrazione di batteri è importante in alcuni soggetti, ad es. perché i soggetti generalmente non hanno nutrienti nel loro stomaco o intestino che possano essere usati per attivare efficacemente batteri vivi dormienti, o perché i soggetti possono avere quantità di nutrienti deliberatamente ristrette per ragioni mediche (ad es. lattanti aventi o a rischio di avere NEC). Può anche essere importante somministrare una composizione che abbia il minimo di influenza su nutrienti dati all'individuo (ad es. in soggetti dove i nutrienti sono deliberatamente ristretti) o somministrare una composizione senza alterare significativamente altro stato nutrizionale del soggetto. Nelle formulazioni per l'uso dell'invenzione, vi è nutrizione sufficiente nella formulazione per far avviare i batteri (ad es. almeno avvio ad attivarsi e crescere) in modo che batteri *L. reuteri* non debba decontaminare eventuali nutrienti limitati che possono essere presenti nell'intestino del soggetto, ad es. il bambino prematuro. Questo può essere importante, in quanto le quantità e tenore della nutrizione data per esempio a un bambino affetto da o a rischio di NEC devono essere attentamente regolati e bilanciati.

Da qui, in tali soggetti, i batteri *L. reuteri* necessitano di essere attivati velocemente senza affidarsi a nutrienti esistenti nell'intestino del soggetto in modo che il beneficio terapeutico sia conseguito quanto più celermente possibile e prima che la salute dell'ospite si deteriori. Un'attivazione celere dopo (o prima o durante) la somministrazione è importante anche perché vi è una mancanza di nutrienti naturali nello stomaco dell'ospite che consenta che abbia luogo l'attivazione all'interno del soggetto.

Le preparazioni per l'uso dell'invenzione forniscono una soluzione a questo problema fornendo un metodo per attivare batteri *L. reuteri* vivi usando citrato come componente di substrato idoneo per i batteri e preferibilmente fornendo anche una fonte di carbonio appropriata per i batteri come uno zucchero (ad es. lattosio).

In modo alternativo, i metodi di attivazione come descritto nel presente contesto possono essere visti come un metodo di cambiamento dello stato di un batteri *L. reuteri* dall'essere dormiente allo stato di metabolizzazione (ad es. lo stato di crescita e replicazione e preferibilmente produzione di metaboliti). I metodi di attivazione come descritto nel presente contesto possono anche essere visti come metodi per ricostituzione o crescita di batteri, per esempio metodi per migliorare la ricostituzione e/o crescita o tasso di crescita di batteri vivi dormienti.

Vantaggiosamente, tale attivazione migliorata di batteri *L. reuteri* conformemente alla presente invenzione può anche dare come risultato una riduzione delle dosi richieste di batteri, o dare come risultato somministrazione meno frequente di batteri, o dare come risultato attività migliorata dei batteri una volta somministrati (e da qui benefici terapeutici e di salute).

Ceppi e tipi di batteri differenti hanno abilità differenti. Batteri o microrganismi *L. reuteri* vivi appropriati per l'uso nella presente invenzione sono quelli che hanno l'abilità di utilizzare citrato come un accettore di elettroni esterno. L'espressione "accettore di elettroni esterno" nel contesto della crescita e metabolismo batterici è un'espressione della tecnica. Per "esterno" è significato per esempio che l'accettore di elettroni (citrato) è derivato da una fonte esogena ai batteri e non è derivato da o prodotto mediante i batteri stesso.

Batteri *L. reuteri* appropriati possono anche avere l'abilità di usare (o

consumare) citrato come un nutriente o substrato per la crescita (hanno l'abilità di crescere in presenza di citrato), o di usare citrato come un accettore di elettroni esterno nel loro metabolismo (hanno l'abilità di metabolizzare citrato) o di avere l'abilità di usare citrato in una reazione di fermentazione (essere fermentanti il citrato).

Batteri *L. reuteri* vivi per gli usi dell'invenzione sono batteri fermentativi. I batteri *L. reuteri* vivi sono lattobacilli eterofermentativi, ad es. che usano il percorso di fosfochetolasi (PKP) per convertire carboidrati, in particolare il ceppo *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 o quelli con abilità simile di utilizzare citrato come un accettore di elettroni esterno. Il ceppo di *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 è stato depositato presso la DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) il 30 gennaio 2006. In alcune forme di realizzazione dell'invenzione, il ceppo di *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 non è usato.

Batteri *L. reuteri* vivi per l'uso nella presente invenzione sono anche capaci di avere un beneficio di salute sull'ospite o soggetto a cui sono somministrati in quantità adeguate. Dunque, qualsiasi microrganismo *L. reuteri* vivo che è utile per trattare malattie o condizioni o avere qualsiasi beneficio di salute in un soggetto, in particolare un lattante o neonato, può essere usato nella presente invenzione. Per esempio, come descritto altrove nel presente contesto, in quanto gli usi terapeutici della presente invenzione danno come risultato l'attivazione migliorata dei batteri, ad es. sotto forma di ricostituzione e crescita più celeri, vantaggiosamente l'invenzione può consentire di migliorare il beneficio di salute dei batteri o la presente invenzione può consentire di usare dosi inferiori o meno frequenti dei batteri selezionati per conseguire gli stessi benefici di

salute.

Dunque, per esempio, batteri *L. reuteri* che hanno un'attività antinfiammatoria (come anche l'abilità di utilizzare citrato come un accettore di elettroni esterno) sono preferiti in alcune forme di realizzazione. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 è un tale esempio.

Come descritto altrove nel presente contesto la presente invenzione trova particolare uso nel trattamento di certe malattie o condizioni in un soggetto.

Dosi appropriate dei batteri per l'uso nelle preparazioni per l'uso dell'invenzione come descritto nel presente contesto possono essere scelte a seconda della malattia o condizione da trattare, la modalità di somministrazione e la formulazione interessata.

Dunque, preferibilmente detto dosaggio è un dosaggio terapeuticamente efficace che è appropriato per il soggetto umano e la condizione che sono trattati ed è appropriato per dare origine agli effetti terapeutici o benefici di salute desiderati. Per esempio, possono essere usate dosi giornaliere da 10^5 a 10^{10} , per esempio da 10^6 a 10^9 , o da 10^6 a 10^8 , o da 10^8 a 10^{10} di UFC totali di batteri. Una dose giornaliera preferita è all'incirca 10^9 o 10^{10} UFC totali, ad es. da 10^9 a 10^{10} UFC totali. Queste dosi possono anche equivalere a dosi esemplificative per ml, dove preferibilmente è somministrata una dose da 1 ml.

L'abilità di un ceppo batterico di *L. reuteri* di utilizzare citrato come accettore di elettroni esterno (per esempio durante la fermentazione di zuccheri) è ben compresa da un esperto della tecnica e può essere prontamente determinata usando tecniche standard. Per esempio, un'opzione è sottoporre a prova tale abilità semplicemente addizionando citrato al mezzo di crescita e, se quello dà come risultato una crescita o un tasso di crescita dei batteri più celere, migliore o

migliorato, allora si può concludere che il ceppo batterico può utilizzare citrato come accettore di elettroni. In modo alternativo l'utilizzazione di citrato può essere valutata misurando se il citrato è consumato dai batteri, per esempio misurando se la concentrazione di citrato nel mezzo di crescita è impoverita quando i batteri crescono.

Un'altra opzione è sottoporre a screening ceppi di batteri per la presenza di geni codificanti per uno o più degli (ad es. 2 o più, 3 o più, 4 o più, ecc., o tutti gli) enzimi coinvolti nel metabolismo del citrato, per esempio nella conversione del citrato in succinato (ad es. tramite ossaloacetato, malato o fumarato). Dunque, i ceppi possono essere sottoposti a screening per la presenza di uno o più dei (o preferibilmente tutti i) seguenti enzimi: EC:1.1.1.37: malato deidrogenasi; EC:1.2.4.1; piruvato deidrogenasi (a trasferimento di acetile); EC:1.3.99.1:

succinato deidrogenasi; EC:1.8.1.4: diidrolipoil deidrogenasi; EC:2.3.1.12: acetiltransferasi del residuo di diidrolipoillisina; EC:4.1.3.6: citrato(pro-3S)-lisi (3 subunità rappresentate da 3 geni differenti); EC:4.2.1.2: idrati di fumarato. La presenza dell'enzima citrato liasi è particolarmente importante. I ceppi batterici possono anche essere sottoposti a screening per la presenza di un enzima citrato permeasi.

L'uso di batteri *L. reuteri* che hanno l'abilità di utilizzare citrato come un accettore di elettroni esterno significa che formulazioni e preparazioni per l'uso della presente invenzione contengono fonti di citrato, ad es. ioni citrato, per esempio sali di citrato come citrato di sodio (ad es. trisodio citrato diidrato), o altri sali di metallo di citrato o acido citrico. Sali preferiti sono quelli che hanno un'influenza minima sul pH, ad es. quelli che possono essere presenti in soluzioni tamponate all'incirca a pH neutro, ad es. pH da 6,0 a 7,5.

I presenti inventori hanno sorprendentemente mostrato che la presenza di citrato nelle formulazioni batteriche, cioè l'esposizione dei batteri *L. reuteri* a una preparazione o formulazione comprendente citrato, dà come risultato un'attivazione migliorata (ad es. più rapida) dei batteri, in particolare in termini di ricostituzione migliorata dei batteri, ad es. da una preparazione crioessiccata o liofilizzata o altrimenti dormiente, o crescita migliorata dei batteri, in confronto a formulazioni e preparazioni che non contengono citrato.

Dunque, il citrato deve essere nella formulazione finale al tempo della somministrazione al paziente (ad es. per agire come eccipiente) per attivazioni più celeri in confronto al caso in cui il citrato non è incluso. Questo significa che un modo opportuno per mettere in pratica l'invenzione è aggiungere citrato alla preparazione batterica bagnata o impasto liquido appena prima del crioessiccamento o liofilizzazione o rendendo altrimenti dormienti i batteri (così è disponibile quando il batteri dormiente è attivato). Un modo opportuno alternativo per mettere in pratica l'invenzione è aggiungere citrato come un ingrediente secco alla formulazione di batteri già secchi (ad es. crioessiccati o liofilizzati) in modo che il citrato sia nuovamente presente nella formulazione finale e disponibile quando il batteri dormiente è attivato. In modo alternativo il citrato può essere aggiunto a o può essere presente nel mezzo o altra soluzione usata per comporre la formulazione finale per la somministrazione al paziente (ad es. usata per dissolvere o ricostituire o attivare i batteri congelati, crioessiccati o liofilizzati o altrimenti dormienti).

Una concentrazione appropriata di citrato per conseguire l'attivazione, ad es. l'attivazione migliorata, dei batteri *L. reuteri* conformemente alla presente invenzione può essere stabilita da un esperto della tecnica mediante qualsiasi

metodo appropriato, per esempio esponendo i batteri a ioni citrato a concentrazioni che differiscono e osservando l'effetto su ricostituzione e/o crescita. Sono appropriate concentrazioni che per esempio agiscono per stimolare la crescita (o tasso di crescita) migliorata, preferibilmente crescita (o tasso di crescita) significativamente migliorata di batteri. Concentrazioni esemplificative sono da 0,01 o 0,05 mg/ml a 100 mg/ml, ad es. da 0,05 o 0,1 mg/ml a 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0 o 50,0 mg/ml. Concentrazioni alternative possono essere da 1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0, 20,0, 30,0 o 50,0 mg/ml a 100 mg/ml. Una concentrazione preferita può essere da 0,05 o 0,1 mg/ml a 5,0 o 3,0 o 2,0 o 1,0 o 0,5 mg/ml, ad es. da 0,2 a 0,7 mg/ml, ad es. da 0,3 a 0,6 mg/ml. Questi valori possono anche essere appropriati per mg/dose equivalenti dati al soggetto.

Per esempio, i presenti inventori hanno mostrato che, quando citrato è presente in una formulazione, per esempio in una formulazione batterica di *L. reuteri* liofilizzata o crioessiccata, allora, in presenza di citrato, i batteri mostrano una crescita (tasso di crescita) più celere o migliorata, per esempio impiegano una quantità di tempo ridotta per conseguire una certa densità ottica (OD) quando confrontati con l'assenza di citrato. Dunque, concentrazioni preferite di citrato (ioni citrato) sono quelle che possono dare origine a tali osservazioni, ad es. una crescita più celere o migliorata o un tasso di crescita più celere o migliorato in presenza in contrapposizione a in assenza di citrato. In particolare, concentrazioni preferite di citrato sono quelle che possono dare origine a o dare come risultato il conseguimento da parte di ceppi batterici di una certa OD o innalzamento percentuale di OD in un tempo più breve, preferibilmente un tempo significativamente più breve, di quando il citrato è assente. Una metodologia appropriata è mostrata negli Esempi e nella Figura 3. Per esempio,

opportunamente si può misurare il tempo che i batteri impiegano per conseguire un aumento dell'OD dell'1%, 2%, 3%, 4% o 5%, o uno maggiore dell'1%, 2%, 3%, 4% o 5% (per esempio un aumento dell'OD del 3% o uno maggiore del 3%), e osservare le concentrazioni di citrato dove questo si verifica più velocemente, preferibilmente in modo significativamente più veloce, con citrato presente in contrapposizione ad assente (cioè in presenza di citrato in confronto all'assenza). Tali concentrazioni di citrato sono appropriate per l'uso. Può essere usata qualsiasi misura appropriata di crescita o tasso di crescita batterico o numeri batterici. Per esempio, può essere usata qualsiasi tecnica appropriata per misurare l'OD, per esempio esperimenti di torbidità appropriati come mostrato negli Esempi.

L'abilità di batteri *L. reuteri* di crescere più velocemente o di mostrare un tasso di crescita migliorato in presenza di citrato è anche un esempio dell'attivazione di batteri conformemente alla presente invenzione.

I batteri *L. reuteri* vivi per gli usi dell'invenzione nel presente contesto possono essere liofilizzati, freschi, congelati, crioessiccati, essiccati per nebulizzazione o simili e possono essere in qualsiasi prodotto formulato, incluso in un olio, o soluzione acquosa, o sospensione, o emulsione o simili o un'altra formulazione che è somministrata al neonato in un modo enterale, per esempio in un sistema di erogazione di alimentazione a tubo, tramite una via orale o tramite una via rettale.

Conformemente alla presente invenzione il citrato necessita di essere presente nella formulazione finale che è somministrata a pazienti.

Nell'invenzione i batteri *L. reuteri* da attivare sono essiccati o altrimenti dormienti, e sono congelati, liofilizzati o crioessiccati. Dunque, in certe forme di

realizzazione preferite le preparazioni per l'uso dell'invenzione comprendono inoltre un passaggio in cui i batteri sono liofilizzati o crioessiccati o altrimenti resi dormienti (ad es. mediante congelamento) prima che abbia luogo l'attivazione. Preferibilmente citrato (e facoltativamente la fonte di carbonio o zucchero, ad es. lattosio) è presente in tali formulazioni o preparazioni di batteri dormienti (in altre parole i batteri è esposto a detto citrato e facoltativamente a detta fonte di carbonio).

In forme di realizzazione particolarmente preferite, il citrato (e facoltativamente la fonte di carbonio o zucchero, ad es. lattosio) è presente nella formulazione crioessiccata o altrimenti secca o solida di batteri dormienti (ad es. il citrato è presente nel mezzo di liofilizzazione). Preferibilmente il citrato è addizionato appena prima della liofilizzazione o altrimenti di rendere dormienti i batteri, per esempio è addizionato a o forma un componente del mezzo di liofilizzazione o del mezzo di congelamento, anziché per esempio essere usato nel mezzo di crescita usato per coltivare ed espandere (fare crescere) la popolazione di batteri *L. reuteri* vivi nei passaggi prima che si verifichi liofilizzazione o congelamento (in altre parole il citrato preferibilmente non è usato durante la crescita dei batteri).

Tali preparazioni di componenti secchi (formulazioni secche) possono essere preparate in qualsiasi modo appropriato. Per esempio, i componenti individuali nel prodotto finale possono essere combinati insieme in una formulazione liquida e quindi liofilizzati o essiccati, o i componenti secchi (o liofilizzati) individuali, inclusi i batteri secchi o liofilizzati, possono essere miscelati o mescolati insieme per formare la formulazione secca. Entrambi questi tipi di formulazione secca possono quindi essere ricostituiti per formare una soluzione o

formulazione finale contenente citrato e batteri *L. reuteri* vivi appropriata per la somministrazione ai pazienti.

Come esposto altrove nel presente contesto, il citrato deve essere nella formulazione finale al tempo della somministrazione al paziente (ad es. per agire come un eccipiente) per attivazioni più celeri in confronto al caso in cui il citrato non è incluso. Questo significa che un modo opportuno per mettere in pratica l'invenzione e per esporre i batteri a citrato è aggiungere citrato alla preparazione batterica bagnata o impasto liquido appena prima del crioessiccamento o congelamento (così è disponibile quando il batteri dormiente è attivato). Un modo opportuno alternativo per mettere in pratica l'invenzione è aggiungere citrato come un ingrediente secco alla formulazione di batteri già secchi (ad es. crioessiccati o liofilizzati) in modo che il citrato sia nuovamente presente nella formulazione finale e disponibile quando il batteri dormiente è attivato. In modo alternativo il citrato può essere aggiunto a o può essere presente nel mezzo (ad es. mezzo di crescita) o altra soluzione usata per comporre la formulazione finale per la somministrazione al paziente (ad es. usata per dissolvere o ricostituire o diluire il prodotto batterico congelato, essiccato o liofilizzato).

Dunque, in forme di realizzazione preferite dell'invenzione detto citrato è presente nella preparazione batterica congelata, liofilizzata, o crioessiccata come anche nella formulazione finale per la somministrazione al soggetto.

Dove i batteri *L. reuteri* vivi sono liofilizzati o congelati, è un particolare vantaggio dell'invenzione che la presenza di citrato consenta una migliorata attivazione dei batteri quando sono ricostituiti dalla forma essiccata o dormiente. Tale attivazione migliorata può prendere la forma di ricostituzione o crescita più rapida. In altre parole la presenza di citrato aiuta a dare il La o migliora il risveglio

dei batteri dal loro stato liofilizzato (secco) o altrimenti dormiente.

Dunque, il concetto dietro la presente invenzione è che il citrato sia presente in corrispondenza di o all'incirca al punto temporale quando i batteri *L. reuteri* va da uno stato dormiente (ad es. congelato o crioessiccato) a uno stato attivo, a significare che il citrato è nella formulazione finale che è somministrata al paziente (ad es. come parte del mezzo o tampone usato per ricostituire o risospendere i batteri dormienti per la somministrazione, o nella preparazione stessa crioessiccata o congelata o altrimenti dormiente, ad es. il citrato è addizionato appena prima che abbia luogo liofilizzazione o congelamento dei batteri).

Come descritto altrove nel presente contesto, questo è particolarmente vantaggioso in soggetti che hanno nutrienti minimi nello stomaco o nell'intestino per fornire altrimenti nutrienti per l'attivazione e la crescita dei batteri. In alcune forme di realizzazione dell'invenzione, una qualche crescita dei batteri *L. reuteri* può già essersi verificata prima che la formulazione raggiunga l'intestino del paziente, ad es. durante la sua ricostituzione e somministrazione al paziente.

Sebbene il citrato sia un componente essenziale (ad es. un eccipiente) nelle formulazioni di prodotto, composizioni e preparazioni per l'uso dell'invenzione (ad es. nelle formulazioni da somministrare nel tratto gastrointestinale di pazienti), anche altri componenti o eccipienti sono preferibilmente forniti.

Per esempio, la presenza di una o più fonti di carbonio appropriate, per esempio che i batteri *L. reuteri* vivi possono usare come substrato di crescita, è un componente preferito. Fonti di carbonio appropriate possono essere prontamente determinate a seconda della natura dei batteri *L. reuteri* vivi nelle formulazioni. Tuttavia, fonti di carbonio preferite sono carboidrati, come zuccheri. Il lattosio è

uno zucchero preferito per l'uso. Tuttavia, può essere usato qualsiasi altro zucchero appropriato (per esempio a condizione che supporti la crescita dei batteri *L. reuteri*), per esempio saccarosio, fruttosio, glucosio o galatto-oligosaccaridi (GOS).

Dunque, in forme di realizzazione preferite dell'invenzione, la fonte di carbonio o zucchero, ad es. lattosio (ad es. lattosio monoidrato) o zucchero alternativo, è portata a contatto con i batteri vivi insieme al citrato. In altre parole i batteri, citrato e una fonte di carbonio fanno parte della stessa composizione o formulazione o preparazione.

Dunque, preparazioni preferite per l'uso dell'invenzione comprendono batteri *L. reuteri* vivi come definito altrove nel presente contesto, citrato e lattosio (o altro zucchero appropriato come descritto sopra, in particolare GOS).

Altri componenti o eccipienti possono anche essere presenti, per esempio componenti che sono utili per la stabilizzazione o altre proprietà della composizione o preparazione, ad es. qualsiasi crioprotettivo o stabilizzante appropriato. Esempi includono uno o più componenti selezionati dal gruppo costituito da: gelatina, glutammato di sodio, maltodestrina, e acido ascorbico. Mannitolo è un ulteriore componente facoltativo.

Nelle preparazioni per l'uso dell'invenzione è preferito che i componenti usati siano in una forma pura o sostanzialmente pura idonea per la somministrazione farmaceutica a esseri umani. Dunque i componenti individuali sono preferibilmente di grado farmaceutico che possono essere presenti in una quantità nota o precisa piuttosto che per esempio essere presenti o addizionati come parte di una miscela di quantità non note o quantità complesse di componenti. Dunque, sebbene le formulazioni per l'uso dell'invenzione possano

essere somministrate dopo miscelazione o ricostituzione nel latte materno (o altri prodotti a base di latte) che può contenere citrato e lattosio tra le molte altre cose, è preferito che le formulazioni di prodotto per la somministrazione a pazienti contengano preparazioni appropriatamente pure di ioni citrato, ad es. sotto forma di sali citrato, ad es. citrato di sodio come descritto altrove nel presente contesto, e lattosio (ad es. lattosio monoidrato) o altri zuccheri. Dunque, nell'invenzione, le formulazioni sono ricostituite (o diluite) in acqua o sono formulazioni acquose e non comportano per esempio ricostituzione in o presenza di un prodotto a base di latte come latte materno o latte in formula. Dunque, le formulazioni preferite per l'uso dell'invenzione mancano delle proteine del latte. Visto in modo alternativo, le formulazioni preferite per l'uso dell'invenzione contengono o sono esposte a citrato che non è fornito mediante un prodotto a base di latte come latte materno o latte in formula.

Le formulazioni per l'uso generalmente contengono anche un tampone o soluzione tampone per consentire di conservare un pH appropriato.

Formulazioni preferite per l'uso dell'invenzione (in particolare in termini di concentrazioni di lattosio e citrato) sono come descritto nella Tabella B o C. Altre formulazioni preferite contengono un batteri alternativo a *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 che utilizza citrato. Una formulazione preferita alternativa (in particolare in termini di concentrazioni di lattosio e citrato) per l'uso è la formulazione contenente citrato come descritto nella Tabella 2. Di nuovo, sebbene un batteri preferito da usare con una tale formulazione sia *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, in forme di realizzazione alternative, possono essere usati altri batteri *L. reuteri* che utilizzano citrato come definito nel presente contesto. La formulazione della Tabella 2 è particolarmente utile come un mezzo di

liofilizzazione (o lioprotettivo) per batteri *L. reuteri* che utilizzano citrato, in quanto dà come risultato un'attivazione migliorata (ad es. una crescita migliorata) dei batteri quando sono ricostituiti dalla loro forma liofilizzata.

Come menzionato sopra, in forme di realizzazione preferite dell'invenzione, citrato e lattosio sono entrambi presenti nelle preparazioni batteriche. Questi componenti possono essere presenti a qualsiasi concentrazione o rapporto appropriato. Il citrato è presente a una concentrazione alla quale l'attivazione (o attivazione migliorata) dei batteri *L. reuteri* vivi si verifica come descritto altrove nel presente contesto. Lattosio (o altro zucchero) è generalmente presente in una quantità tale da potere supportare la crescita dei batteri *L. reuteri* vivi. In forme di realizzazione preferite dell'invenzione, la preparazione comprende un rapporto tra citrato e lattosio da 1:10 o 1:50 a 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 o 1:600, preferibilmente da 1:40 o 1:50 o 1:60 a 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 o 1:600; o da 1:30 a 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 or 1:600, preferibilmente da 1:60 a 1:600 o da 1:30 a 1:300 o da 1:50 a 1:70 o da 1:50 a 1:60.

Dunque, un altro oggetto dell'invenzione è fornire una combinazione ottimale di una preparazione per l'uso dell'invenzione comprendente citrato e lattosio (o altro zucchero), in un rapporto tra da 1:10 a 1:600, almeno da 1:60 a 1:600, preferibilmente in un rapporto tra da 1:30 a 1:300, o almeno da 1:30 a 1:300 (o qualsiasi altro rapporto come delineato nel presente contesto). Un esempio della quantità di citrato è 0,3 mg per dose di all'incirca 1×10^{10} UFC di batteri *L. reuteri* vivi e la quantità di lattosio è 16,6 mg per la stessa dose. Un altro esempio della quantità di citrato è 0,6 mg per dose di all'incirca 1×10^9 UFC di batteri *L. reuteri* vivi e la quantità di lattosio è 35,7 mg per la stessa dose. Un

esempio della quantità di citrato è 1 mg per dose di all'incirca 1×10^9 UFC di batteri *L. reuteri* vivi. Il citrato può essere nell'intervallo da 0,01 mg a 100 mg per dose (o ad altre concentrazioni come descritto nel presente contesto) e la quantità di lattosio, o altro zucchero, può essere calcolata secondo i suddetti rapporti.

Un altro oggetto dell'invenzione è fornire una preparazione per l'uso dell'invenzione comprendente componenti di substrato ed eccipienti idonei per esempio lattosio, saccarosio, fruttosio, glucosio, GOS, 1,2-propandediolo, gelatina, glutammato di sodio, maltodestrina, mannitolo, acido ascorbico, citrato, trisodio citrato diidrato e un batteri *L. reuteri*, i componenti del substrato essendo progettati specificamente per migliorare inoltre la ricostituzione e crescita precoce di detti batteri dallo stato liofilizzato, fresco, congelato, crioessiccato, morto per nebulizzazione o simile e in cui detti batteri *L. reuteri* vivi comprendono un batteri dell'acido lattico che può utilizzare citrato come un accettore di elettroni.

Un altro oggetto dell'invenzione è fornire una preparazione per l'uso dell'invenzione comprendente per esempio lattosio, saccarosio, fruttosio, glucosio, GOS, 1,2-propandediolo, gelatina, glutammato di sodio, maltodestrina, mannitolo, acido ascorbico, citrato, trisodio citrato diidrato e un batteri vivo in cui detto batteri vivo è *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.

Un altro oggetto dell'invenzione è fornire una preparazione per l'uso dell'invenzione comprendente per esempio lattosio monoidrato, gelatina idrolizzata, glutammato monosodico, maltodestrina, acido ascorbico, trisodio citrato diidrato e un batteri vivo in cui detto batteri vivo è *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Concentrazioni preferite sono delineate negli Esempi 2 e 3. Concentrazioni particolarmente preferite di citrato sono 0,3 mg/dose o 0,6 mg/dose, o per esempio un intervallo da 0,3 a 0,6 mg/dose. Concentrazioni preferite di batteri

sono 1×10^9 UFC o 1×10^{10} UFC per dose, o per esempio un intervallo di da 1×10^9 UFC a 1×10^{10} UFC per dose. 1×10^{10} UFC è particolarmente preferito, facoltativamente in combinazione con una concentrazione di citrato di 0,3 mg/dose.

Un altro oggetto dell'invenzione è fornire una combinazione ottimale di una preparazione per l'uso dell'invenzione comprendente citrato e lattosio, o altro zucchero, in un rapporto tra da 1:10 a 1:600, almeno da 1:60 a 1:600.

Come esposto altrove nel presente contesto le formulazioni o preparazioni contenenti citrato sono per l'uso nel trattamento terapeutico di un soggetto umano con una condizione che beneficia della somministrazione di un batteri *L. reuteri* vivo attivato più celermente o un batteri *L. reuteri* con un tasso di crescita migliorato. Dunque, tali preparazioni per l'uso in tali metodi di trattamento di pazienti in loro necessità formano forme di realizzazione dell'invenzione.

Concentrazioni preferite di citrato e altre peculiarità preferite delle preparazioni batteriche a base di *L. reuteri* da usare in tali metodi e usi terapeutici sono esposte altrove nel presente contesto. In particolare, è importante che il citrato sia presente nella formulazione finale per la somministrazione a detto soggetto. Tuttavia, in addizione, i batteri *L. reuteri* o le preparazioni batteriche sono congelate, liofilizzate o crioessiccate, nel qual caso è preferito che detto citrato sia presente nella preparazione batterica congelata, liofilizzata o crioessiccata. È anche una forma di realizzazione preferita che dette preparazioni siano ricostituite in acqua prima della somministrazione a detto soggetto.

Un soggetto preferito per i metodi e usi terapeutici della presente invenzione è un soggetto umano che manca di o ha nutrienti limitati nel proprio intestino, o è un soggetto in cui la quantità di nutrienti nell'intestino è stata

deliberatamente ristretta, ad es. per ragioni mediche. In modo alternativo detto soggetto è un soggetto che richiede nutrizione parenterale o endovenosa (in altre parole richiede nutrizione addizionale o supplementare mediante altre vie, ad es. vie non orali, o non sta ricevendo nutrienti direttamente all'intestino). Questa situazione è per esempio piuttosto comune in bambini prematuri o in bambini affetti da o a rischio di NEC. Tali soggetti generalmente non hanno sufficienti nutrienti nel loro intestino per supportare l'attivazione e crescita di una preparazione somministrata di batteri *L. reuteri* a detto soggetto, in particolare, non sono generalmente in grado di supportare l'attivazione e la crescita di una preparazione somministrata di batteri *L. reuteri* in entità tale che sia osservato un beneficio di salute conferito dai batteri.

Dunque, può essere visto che i soggetti sono neonati, o lattanti fino a un anno di età, o un soggetto che è nato prematuramente (cioè è una nascita prematura o pretermine).

Altri soggetti preferiti sono soggetti aventi NEC o a rischio di sviluppare NEC, una condizione che può essere comune in bambini prematuri.

Altri soggetti preferiti sono soggetti che sono incapaci di allattamento al seno o alimentazione orale o i soggetti dove l'allattamento al seno non è fattibile come descritto altrove nel presente contesto. Tale situazione può insorgere per via di problemi di salute con il bambino o la madre, per esempio ma non limitato a nascita pretermine, parto complicato, problemi funzionali (ad es. la madre non produce alcun o insufficiente latte, ostruzione dei dotto galattofori, mastite), infermità della madre, ecc., il risultato terminale essendo che il soggetto da trattare non è in grado di prendere nutrienti sufficienti attraverso l'allattamento al seno o persino altra alimentazione orale per sostenere la salute, o in ultima analisi la vita.

Il termine "paziente" o "soggetto" come usato nel presente contesto è un soggetto umano.

La somministrazione dei ceppi batterici *L. reuteri* vivi per gli usi terapeutici dell'invenzione è svolta in quantità farmaceuticamente, terapeuticamente o fisiologicamente efficaci, a soggetti (esseri umani) in necessità di trattamento. Dunque, detti usi possono comportare il passaggio addizionale di identificare un soggetto in necessità di trattamento.

Come è chiaro dalla divulgazione altrove nel presente contesto, le preparazioni per l'uso della prevenire invenzione sono idonee per la prevenzione di malattie o condizioni come anche trattamento di malattie o condizioni, in particolare per esempio la prevenzione di NEC. Dunque, un trattamento profilattico è anch'esso ricompreso dall'invenzione. Per questa ragione nelle preparazioni per l'uso della presente invenzione, il trattamento include anche la profilassi o prevenzione dove appropriato.

Tali aspetti preventivi (o protettivi) possono opportunamente essere svolti su soggetti a rischio di sviluppare le malattie o condizioni descritte nel presente contesto, ad es. NEC, e possono includere sia una prevenzione completa sia una prevenzione significativa. Una prevenzione significativa può includere lo scenario dove la gravità di malattia o sintomi di malattia è ridotta (ad es. misurabilmente o significativamente ridotta) in confronto alla gravità o ai sintomi che ci si aspetta se non è dato alcun trattamento.

Tale riduzione o alleviamento di condizioni, malattie o sintomi di esse (ad es. sintomi o gravità clinica) può dunque essere misurato mediante qualsiasi saggio appropriato, esempi del quale sono ben noti a un esperto dell'arte. Preferibilmente la riduzione o alleviamento di condizioni, malattie o sintomi è

significativo, ad es. clinicamente significativo o statisticamente significativo, preferibilmente con un valore di probabilità di $\leq 0,05$. Tale riduzione o alleviamento di condizioni, malattie o sintomi sono generalmente determinati in confronto a un individuo o popolazione di controllo appropriata, per esempio un mammifero o soggetto (o una popolazione di essi) sano o un mammifero o soggetto (o una popolazione di essi) non trattato o trattato con placebo, o, se appropriato, lo stesso soggetto individuale prima del trattamento.

In quanto forme di realizzazione preferite dell'invenzione riguardano il trattamento di pazienti con nutrienti limitati o ristretti nell'intestino e/o o che stanno avendo difficoltà a mangiare o alimentarsi, una forma o modalità di somministrazione preferita è diretta allo stomaco del soggetto, ad es. mediante tubo per bocca (orogastrico) o per naso (nasogastrico), o qualsiasi altra forma di erogazione enterale. Se il soggetto è capace, allora è idonea anche un'erogazione orale. Può anche essere usata un'erogazione rettale.

Le composizioni contenenti citrato per l'uso dell'invenzione possono essere formulate o ricostituite con qualsiasi soluzione acquosa appropriata per una somministrazione al soggetto umano. Per esempio, la preparazione può essere ricostituita o formulata con acqua (ad es. acqua distillata) o altra soluzione acquosa, qualche tipologia di formulazione che mima o replica le condizioni nell'intestino, ad es. mezzo di substrato intestinale simulato (SIS, Simulated Intestinal Substrate), o simile, ad es. come descritto negli Esempi.

Preferibilmente e vantaggiosamente può essere usata acqua per ricostituire le formulazioni per l'uso dell'invenzione, in particolare una formulazione contenente citrato e zucchero (ad es. lattosio) come descritto nel presente contesto. A questo riguardo, la scoperta che gli inventori hanno fatto che la

presenza di citrato (e facoltativamente uno zucchero appropriato come lattosio) in formulazioni secche (ad es. crioessiccate o liofilizzate) di batteri dormienti o altre formulazioni di batteri dormienti, può dare come risultato un'attivazione migliorata dei batteri *L. reuteri* vivi quando ricostituiti, significa che non vi è la necessità di un mezzo di ricostituzione più complicato, meno stabile e meno facilmente disponibile come una formulazione a base di latte (latte materno o latte in formula) o altra formulazione per la somministrazione enterica. In altre parole, l'abilità di usare acqua per ricostituire le formulazioni preferite per l'uso dell'invenzione, usando la conoscenza che il citrato insieme al lattosio (o altro zucchero appropriato) può attivare i batteri *L. reuteri* vivi più celermente, fornisce vantaggiosamente un mezzo di attivazione "standardizzata" che usa acqua senza necessitare di fare affidamento su alcuna altra fonte di reagente.

Preferibilmente qualsiasi dei miglioramenti, accrescimenti o aumenti descritti nel presente contesto (per esempio gli effetti positivi su crescita, tasso di crescita, ricostituzione o attivazione, e in realtà qualsiasi altro tale effetto elevato come menzionato altrove nel presente contesto) sono aumenti misurabili, ecc. (come appropriato), più preferibilmente sono aumenti significativi, preferibilmente aumenti clinicamente significativi o statisticamente significativi, per esempio con un valore di probabilità di $\leq 0,05$, quando confrontati con un livello o valore o campione di controllo appropriato. Per esempio, per la valutazione degli effetti di citrato, un confronto appropriato è con un campione, preparazione o soggetto, ecc., dove non è presente citrato.

Preferibilmente qualsiasi delle riduzioni o diminuzioni descritte nel presente contesto (per esempio i tempi ridotti per raggiungere un'OD appropriata o la riduzione di dosi o malattie o sintomi, e in realtà qualsiasi altro effetto

abbassato come menzionato altrove nel presente contesto) sono riduzioni misurabili, più preferibilmente sono riduzioni significative, preferibilmente riduzioni clinicamente significative o statisticamente significative, per esempio con un valore di probabilità di $\leq 0,05$, quando confrontato con un livello o valore o campione di controllo appropriato. Per esempio, per la valutazione degli effetti di citrato, un confronto appropriato è con un campione, preparazione o soggetto, ecc., dove non è presente citrato.

L'invenzione è ulteriormente descritta con riferimento ai seguenti Esempi non limitativi:

Esempi

Esempio 1

Crescita di *Lactobacillus reuteri* in "substrato di intestino simulato"

Materiale e metodo

La crescita di *L. reuteri* DSM 17938 su combinazioni differenti di zucchero ed accettori di elettroni è stata valutata in "substrato intestinale simulato" (SIS).

Tabella A

Substrato intestinale simulato (per litro)
2 g di triptone (Oxoid)
2 g di estratto di lievito
1,0 g di NaCl
0,5 g di K ₂ HPO ₄
0,5 g di KH ₂ PO ₄
0,1 g di MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0,01 g di CaCl ₂ x 2 H ₂ O
5,58 g di MOPS

1 ml di Tween 80
2,5 mg di emina (1,0 mg/ml, 2,5 ml; sciolti in NaOH 0,05 M)
1 mg di vitamina K (vitamina K ₂ ; 2 mg/ml, 0,5 ml; sciolto in etanolo)
0,4 g di cisteina HCl
0,5 g di bile (porcina
0,005 g di FeSO ₄ x 7 H ₂ O
0,05 g di MnSO ₄
100 ng di CoCl ₂ x 6 H ₂ O (100 µg/ml, 1 ml)
il pH è stato aggiustato a 6,8; autoclavato a 121 °C per 15 min
Soluzioni di zucchero ed accettore di elettroni filtrate sterili sono state addizionate prima dell'inoculazione. Concentrazioni finali: 15 mM di ciascuno.
Zucchero: galatto-oligosaccaridi (GOS) o glucosio. Accettore di elettroni: citrato, 1,2-propandiolo o fruttosio.

Cellule di *Lactobacillus reuteri* di ceppo DSM 17938 sono state dapprima fatte crescere per tutta la notte in brodo MRS (Oxoid) a 37 °C. Dopo un lavaggio in soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) i batteri sono stati diluiti 10 × in PBS. 10 µl di sospensione batterica sono stati successivamente inoculati a 10 ml di SIS (con addizione di zucchero e accettore di elettroni), e i batteri sono stati messi in coltura per 16 h a 37 °C durante condizioni anaerobiche e nessuno scuotimento.

Messa in coltura di *L. reuteri* DSM 1738 in SIS con addizione di lattosio e citrato

La crescita di *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in SIS con lattosio e citrato come coppia di zucchero-accettore di elettroni è valutata nello stesso modo descritto sopra per GOS e citrato come accettore di elettroni . È usato il substrato (SIS) descritto sopra. Il *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 cresce in modo altrettanto efficiente su lattosio-citrato come sulla combinazione di GOS-citrato (dati non mostrati).

Esempio 2

Formulazione di un prodotto idoneo da usare in alimentazione a tubo di un lattante prematuro a rischio di sviluppare NEC, usando l'invenzione nel presente contesto.

La polvere di IBP-9414 per sospensione orale è una polvere liofilizzata da bianca a biancastra fornita in una fiala di vetro trasparente che contiene approssimativamente 1×10^9 UFC di *L. reuteri* DSM 17938 per dose e citrato e altri eccipienti come nella tabella nel seguito. È realizzata fresca, congelata, crioessiccata, essiccata per nebulizzazione ecc. come noto nell'industria.

Formulazione per doseTabella B

Eccipiente	Quantità
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	1×10^9 UFC
Lattosio monoidrato	35,7 mg
Gelatina idrolizzata	23,4 mg
Glutammato monosodico	23,4 mg
Maltodestrina	12,7 mg
Acido ascorbico	10,7 mg
Trisodio citrato diidrato	0,6 mg

Esempio 3

Formulazione di un prodotto idoneo da usare in alimentazione a tubo di un lattante prematuro a rischio di sviluppare NEC, usando l'invenzione nel presente contesto.

La polvere di IBP-9414 per sospensione orale è una polvere liofilizzata da bianca a biancastra fornita in una fiala di vetro trasparente che contiene

approssimativamente 1×10^{10} UFC di *L. reuteri* DSM 17938 per dose e citrato e altri eccipienti come nella tabella nel seguito. È realizzata fresca, congelata, crioessiccata, essiccata per nebulizzazione ecc. come noto nell'industria.

Formulazione per dose

Tabella C

Eccipiente	Quantità
<i>L. reuteri</i> DSM 17938	1×10^{10} UFC
Lattosio monoidrato	16,6 mg
Gelatina idrolizzata	10,9 mg
Glutammato monosodico	10,9 mg
Maltodestrina	5,9 mg
Acido ascorbico	5,0 mg
Trisodio citrato diidrato	0,3 mg

Esempio 4

L'aggiunta di citrato al lioprotettivo accorcia il tempo di attivazione di *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 liofilizzato

Metodi

Coltivazione:

Una provetta falcon con 9 ml di mezzo di crescita (si veda la **Tabella 1**) è stato inoculato con *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 da una scorta congelata. La pre-coltura è stata incubata a 37 °C per 16 ore. Questa è stata seguita da un secondo passaggio di pre-messa in coltura dove 5 ml della prima pre-coltura sono stati aggiunti a 45 ml di mezzo fresco. La seconda pre-coltura è stata lasciata raggiungere una densità ottica (600 nm) di ≥ 13 (~24 ore).

Un fermentatore con la capacità di 1,5 litri sono stati preparati e sterilizzati mediante autoclavaggio a 121 °C per 20 min. Tutti i componenti eccetto glucosio sono stati addizionati fino a 875 ml di dH₂O e autoclavati con il fermentatore. Una soluzione di glucosio è stata realizzata con i rimanenti 125 ml e autoclavata separatamente, e successivamente addizionata al fermentatore. Il fermentatore è stato impostato fino a una temperatura di 37 °C e pH 5,5 (controllato mediante addizione di NaOH) con un'agitazione a 100 giri/min. Il fermentatore è stato lasciato funzionare per tutta la notte per determinare possibili contaminazioni. In seguito a questo, 50 ml della seconda pre-coltura sono stati iniettati e il fermentatore è stato fatto funzionare per 15 ore, raggiungendo una densità ottica finale di 14,3.

La coltura è stata pompata dal fermentatore a una beuta sterilizzata (ha impiegato ~2,5 ore), divisa in due parti che sono state centrifugate a 3200 giri/min per 10 min. I due pellet (13,4 e 15,2 g) sono stati lavati con tampone di glutammato di sodio (45,2 g di glutammato di sodio in 1,8 litri di dH₂O, filtrati attraverso un filtro sterile da 0,2 µm) seguiti da sospensione in quantità uguali (13,4 e 15,2 ml) di tampone di glutammato di sodio. Le sospensioni batteriche sono state inoltre miscelate con un volume uguale di tampone di liofilizzazione con (C) o senza (N) addizione di citrato (si veda la **Tabella 2**).

Tabella 1. Composizione del mezzo di crescita

Componente	Quantitativo (g)
Acqua distillata	1000 ml
Estratto di lievito	14
Peptone di soia	20
Diammonio idrogeno citrato	5,2
Acetato di sodio triidrato	4,8
Fosfato di idrogeno dipotassico	2,0
Solfato di magnesio, eptaidrato	0,1

Solfato di manganese, monoidrato	0,018
Solfato di zinco, eptaidrato	0,01
Tween 80	0,52
D-Glucosio anidro	54,5

Tabella 2. Composizione del mezzo di liofilizzazione

Componente	N, senza citrato	C, con citrato
	Concentrazione (g/l)	
Lattosio	142,7	142,7
Maltodestrina	50,9	50,9
Acido ascorbico	42,7	42,7
Gelatina	93,6	93,6
Glutammato monosodico*	93,6	81,1
Trisodio citrato diidrato		2,38
pH	6,0, aggiustato con idrossido di sodio	
*La ragione di una differenza nella concentrazione di glutammato di sodio è aggiustare il pH, la concentrazione di sodio e la forza ionica.		

Liofilizzazione

Antecedentemente alla liofilizzazione le sospensioni batteriche sono state aliquotate in volumi di 1 ml in fiale di crioessiccamento da 5 ml con tappi di gomma. È stato fatto funzionare il seguente programma di liofilizzazione:

Tabella 3. Programma di liofilizzazione

Passaggio	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Pressione (µbar)
Congelamento	-50	11	Nessun vuoto
Essiccamento primario	da -50 a -35	36	da 100 a 50
Essiccamento secondario	25	27	20

Dopo il completamento del secondo passaggio di essiccamento, le fiale sono state sigillate senza vuoto in presenza di gas azoto.

Quantificazione

I campioni per la quantificazione di batteri sono stati presi dalla coltura prima della distribuzione in due parti. Per determinare il tasso di sopravvivenza, questi risultati sono stati poi confrontati con analisi di campioni liofilizzati.

Preparazione di DNA di coltura del fermentatore

DNeasy® Blood & Tissue Handbook (n. cat. 69504) (secondo il protocollo: pretrattamento per batteri Gram-positivi, con **lievi modifiche**)

Cellule dalla coltura di fermentatore (1 ml) sono state raccolte mediante centrifugazione per 10 min a 5000 × g (7500 giri/min). Il surnatante è stato scartato e il pellet batterico è stato risospeso in 180 µl di tampone di lisi enzimatica e incubato per **60 min** a 37 °C. Questo è stato seguito da un **passaggio di battitura delle sfere** usando 0,25 ml di sfere di ossido di zirconio/silice da 0,1 mm (BioSpec: Cat. n. 11079101z) in una microprovetta PP da 2 ml (Sarstedt: ordine n. 72.694.006) a una rapidità di 5,0 per 3 × 45 s (FastPrep®-24 Instrument, MP Biomedicals). I campioni di battitura delle sfere sono stati incubati per 30 min a 56 °C. Il resto dei passaggi è stato eseguito secondo il protocollo.

PCR

Primer: DSM17f2 (TACGGGGAACGAGTTATTGC) e DSM17r2 (GGACGGCTTAACAAAACAGC); Grandezza del prodotto 216 bp

Miscela madre per DreamTaq Green PCR (2X Thermo Scientific, numero di articolo K1081) è stata usata per le reazioni di PCR. Reazioni di PCR secondo questo:

<i>Miscela madre con primer</i>	<i>Volume per reazione</i>
Acqua (qualità di PCR)	3,0 μ l
Primer, dir. (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l
Primer, inv. (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l
BSA (conc. finale 0,1 μ g/ μ l)	2,5 μ l
DreamTaq	12,5 μ l

20 μ l di miscela madre sono stati miscelati con 5 μ l di campione di DNA e il seguente programma è stato fatto funzionare: 98 °C 5 min// 2 x (95 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 20 s) //2 x (95 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 20 s) //2 x (95 °C 30 s, 64 °C 30 s, 72 °C 20 s) // 2 x (95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 20 s) //35 x (95 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 20 s) //72 °C 5 min //16 °C.

Valutazione del tempo di attivazione

Il tempo di attivazione in mezzo intestinale simulato (STMmod 3, si veda la **Tabella 4**) delle due varianti di DSM 17938 liofilizzato (C e N) sono stati analizzati usando un incubatore/lettore/scuotitore controllato da computer (BioScreen C MBR) che misurano il cambiamento di torbidità nel tempo. Il mezzo STMmod 3 è stato usato per mimare le condizioni nell'intestino.

A ciascun pozzetto sono stati addizionati 200 μ l di STMmod 3. Successivamente sono stati addizionati differenti volumi (100, 60, 40, 30, 25 μ l) di sospensione batterica (fiale con batteri liofilizzati sospesi in 1 ml di dH₂O). I volumi sono stati regolati a 300 μ l con dH₂O. L'analisi di ciascun volume di inoculazione è stata fatta in triplicati. L'analisi BioScreen è stata fatta funzionare a 37 °C per 24 ore con un intervallo di 15 min tra le misurazioni (OD 600 nm), con l'aggiunta di un passaggio di scuotimento di 10 s prima di ciascun punto di misurazione.

Tabella 4. Composizione di mezzo intestinale simulato (STMmod 3)

Componente	Quantitativo
Acqua distillata	1000 ml
Estratto di lievito	2,0 g
Tryptone (oxoid)	2,0 g
NaCl	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
Tween 80	1 ml
Emina	2,5 mg
Vitamina K	1,0 mg
Cisteina HCl	0,4 g
Bile (porcina)	0,5 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,005 g
MnSO ₄	0,05 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	100 µg
pH	6,8

RisultatiPCR

Una PCR con i primer specifici per DSM 17938 sono state fatte funzionare sulle estrazioni di DNA sulla coltura di fermentatore, per confermare che erano stati coltivati i batteri corretti. I risultati mostrano di fatto che DSM 17938 è stato messo in coltura nel fermentatore (**Figura 2**).

Quantificazione

Il tasso di sopravvivenza di DSM 17938 dopo la liofilizzazione è stato determinato essere approssimativamente del 13% per i batteri liofilizzati con citrato (C) e del 12% per i batteri liofilizzati senza citrato (N) (si veda la **Tabella 5**).

Tabella 5. Quantificazione, tasso di sopravvivenza e densità ottica di colture di fermentatore e crioessiccate di DSM 17938

Campione	UFC/ml	Tasso di sopravvivenza	OD (600 nm)
Coltura di fermentatore (15 h)	$6,14 \cdot 10^9 (\pm 0,41)$		14,3
Batteri liofilizzati N	$6,83 \cdot 10^9 (\pm 3,67)$	12%	$66,3 \pm 5,0$
Batteri liofilizzati C	$7,25 \cdot 10^9 (\pm 1,44)$	13%	$75,7 \pm 2,1$

Valutazione del tempo di attivazione

I risultati dall'esperimento di torbidità hanno rivelato che colture crioessiccate di DSM 17938 hanno raggiunto un aumento del 3% dell'OD in un tempo più breve quando il lioprotettivo conteneva citrato (si veda la **Figura 3**).

Per riassumere: i risultati hanno rivelato che l'aggiunta di citrato (usato da *L. reuteri* come accettore di elettroni) nella formulazione di prodotto, accorciano il tempo di attivazione di *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in mezzo intestinale simulato.

RIVENDICAZIONI

1. Preparazione comprendente (i) un batteri *Lactobacillus reuteri* vivo che ha l'abilità di utilizzare citrato come accettore di elettroni esterno, e (ii) citrato, per l'uso nel trattamento terapeutico di un soggetto con una condizione che beneficia della somministrazione di un batteri *Lactobacillus reuteri* vivo attivato più celermente o un batteri *Lactobacillus reuteri* con un tasso di crescita migliorato;

in cui i batteri nella preparazione sono congelati, liofilizzati o crioessiccati, in cui detta preparazione congelata, liofilizzata o crioessiccata è ricostituita in una soluzione acquosa appropriata per la somministrazione al soggetto prima della somministrazione a detto soggetto;

in cui detto soggetto è un soggetto umano ed è un neonato, o un lattante fino a un anno di età, o è un soggetto che è nato prematuramente;

in cui detta condizione è una condizione in cui il soggetto neonato, lattante o prematuro ha difficoltà ad alimentarsi per via orale, è incapace di allattamento al seno o alimentarsi per via orale, o richiede nutrizione parenterale o endovenosa, o in cui la quantità di nutrienti nell'intestino è stata deliberatamente ristretta per ragioni mediche; e

in cui detto uso non altera significativamente lo stato nutrizionale del soggetto neonato, lattante o prematuro.

2. La preparazione per l'uso della rivendicazione 1, in cui detto citrato è presente in detta preparazione congelata, liofilizzata o crioessiccata, e/o in cui detto citrato è presente nella formulazione finale per la somministrazione a detto soggetto.
3. La preparazione per l'uso della rivendicazione 1 o rivendicazione 2, in cui i batteri è esposto a uno zucchero o la preparazione comprende inoltre uno zucchero, preferibilmente in cui detto zucchero è lattosio.
4. La preparazione per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui detto citrato e facoltativamente detto zucchero è presente in una preparazione di batteri dormienti che sono quindi attivati.
5. La preparazione per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detto citrato è presente a una concentrazione da 0,01 mg/ml a 10,0 mg/ml, preferibilmente da 0,01 mg/ml a 5,0 mg/ml o da 0,01 mg/ml a 2,0 mg/ml.

6. La preparazione per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 5, in cui la preparazione comprende un rapporto tra citrato e lattosio da 1:10 a 1:600, preferibilmente da 1:60 a 1:600 o da 1:30 a 1:300.
7. La preparazione per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui detto *Lactobacillus reuteri* è *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
8. La preparazione per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui detto soggetto è un soggetto avente enterocolite necrotizzante (NEC, Necrotizing Enterocolitis) o è a rischio di sviluppare NEC.

Figura 1

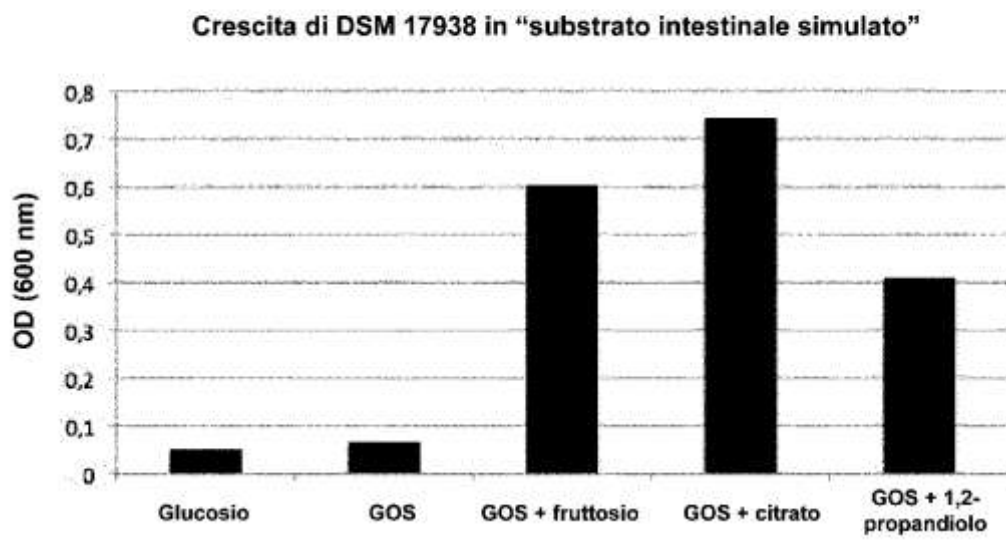


Figura 2



Figura 3

