



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

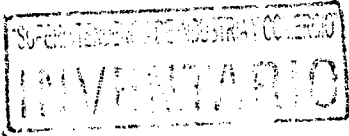
CSA125660
Digitalización CSA Ltda



Handwritten signature

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION



ENTRADA EN REGISTRO NACIONAL

10-77940

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO

CEPAS DE LACTOBACILLUS PLANTARUM COMO PROBIÓTICOS CON
EFECTO INMUNOMODULADOR ESPECIFICO

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A.

DOMICILIO

SANT QUIRZE DEL VALLÈS, ESPAÑA.

74. APODERADO

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. BOGOTÁ, D.C.

$$1/54 \quad 1/59$$

[REDACTED]

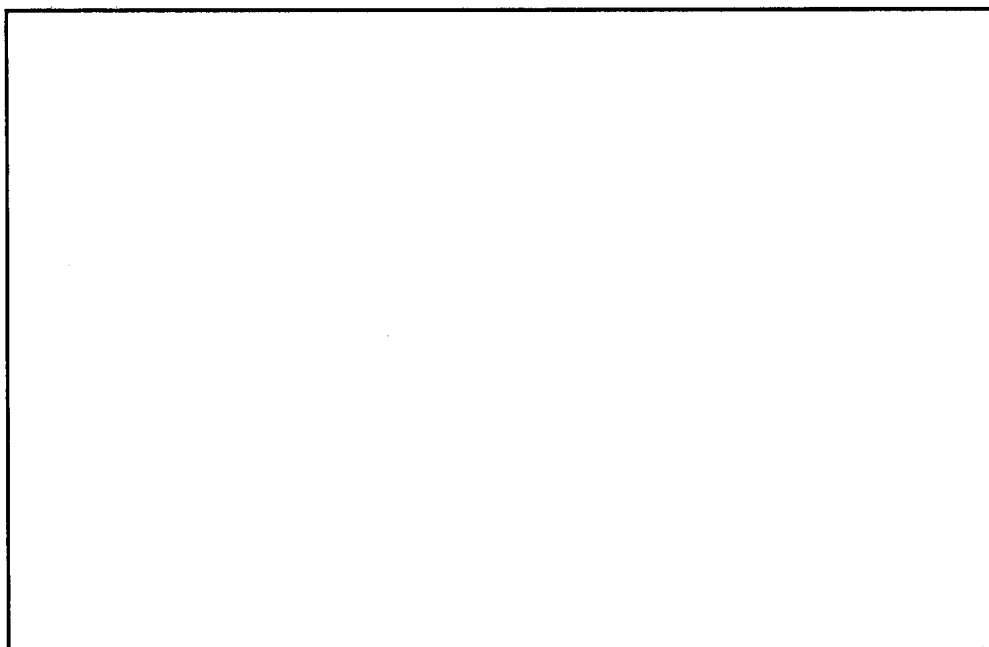
Fecha: 2010-06-28 17:12:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 54

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 554.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales.
\$ 312.000 (12*\$26.000)
- Listado de Secuencias

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

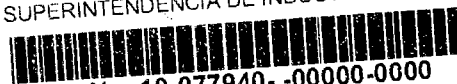
NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: 

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

114268 87

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077940-00000-0000

Fecha: 2010-06-28 17:12:17
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 54

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 45,646
FECHA : JUNIO 3 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ERIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662326	03/06/2010	39,365,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

114 268

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 40,879
 FECHA : MAYO 19 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077940- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 17:12:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII - Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 54

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662201	19/05/2010	38,050,400.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			260,000.00
		TOTAL :	\$ 260,000.00

SON: DOSCIENTOS SESENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
 COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
 SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

114268
4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 38,599

FECHA : MAYO 12 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077940- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 17:12:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 54

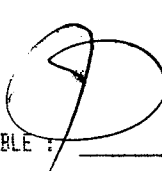
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80845365	12/05/2010	56,110,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 52,000.00

SON: CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 June 2009 (04.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/068474 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)

(ES). BONACHERA SIERRA, Miquel Àngel [ES/ES];
C. Enric Serra, 38, E-17130 L'escala (ES). AUDIVERT
BRUGUÉ, Sergi [ES/ES]; Ctra. Sarrià de Dalt, 36,
E-17841 Sarrià De Ter (ES).

(21) International Application Number:

PCT/EP2008/065950

(74) Agent: BARLOCCI, Anna; ZBM Patents, S. L., Balma,
114 4^o, E-08008 Barcelona (ES).

(22) International Filing Date:

21 November 2008 (21.11.2008)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

07121817.6 29 November 2007 (29.11.2007) EP

(71) Applicant (for all designated States except US):
CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS IN-
DUSTRIALES, S. A. [ES/ES]; Pol. Ind. Can Llobet, J.
Cuatre Casas i Arumí, 2, E-08192 Sant Quirze Del Vallès
(ES).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MARTÍNEZ
CHAMORRO, Vanesa [ES/ES]; Ctra. de Barcelona, 200,
4^o, 3^a, E-08205 Sabadell (ES). LÓPEZ GONZÁLEZ,
Quiro [ES/ES]; Ctra. de Barcelona, 200, 4^o 3^a, E-08205
Sabadell (ES). GASULL, Miquel Àngel [ES/ES]; C.
dels Madrazo, 24-26, àtic 2^a, E-08006 Barcelona (ES).
CUÑÉ CASTELLANA, Jordi [ES/ES]; C. Tramontana,
3, 1^o, E-25210 Girona (ES). ESPADALER MAZO,
Jordi [ES/ES]; C. Can Prunell, 11, E-17003 Girona (ES).
CABRÉ GELADA, Eduard [ES/ES]; C. Consell de Cent,
98, 2^o 2^a, E-08015 Barcelona (ES). MANÉ ALMERO,
Josep [ES/ES]; Av. Martí i Pujol, 597, 3^o, E-08917
Badalona (ES). CALVO TORRAS, Maria de los Ángeles
[ES/ES]; C. Sepúlveda, 101, 4^o 2^a, E-08015 Barcelona

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— with international search report
— with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

(54) Title: STRAINS OF LACTOBACILLUS PLANTARUM AS PROBIOTICS WITH IMMUNOMODULATORY SPECIFIC
EFFECT

(57) Abstract: Two new strains of Lactobacillus plantarum are provided, suitable as probiotics in food industry. The strains of the invention were deposited on 18.09.2007 in the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) under the Accession Numbers CECT 7315 and 7316. The administration of the strains results in an overall activation of the immune system. There are also provided products which comprise the strains, particularly edible products and pharmaceutical compositions for enhancing the immune system of an animal including a human.

WO 2009/068474 A1

(19) Organización Mundial de Propiedad

Intelectual

Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

04 de Junio de 2009 (04.06.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 2009/068474 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C12N 1/20 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)

(21) Numero de Solicitud Internacional:

PCT/EP2008/065950

(22) Fecha de Presentación Internacional:

21 de Noviembre de 2008 (21.11.2008)

(25) Lenguaje de entrega:

Inglés

(26) Lenguaje de Publicación:

Inglés

(30) Datos de la Prioridad:

07121817.6 29 de noviembre de 2007 (29.11.2007) EP

(71) Solicitante (para todos los Estados designados menos los Estados Unidos): **CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A.** [ES/ES]; Pol. Ind. Can Llobet J. Cuatrecasas i Arumí, 2 E-08192 Sant Quirze Del Vallès (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (solo para los Estados Unidos): **MARTÍNEZ CHAMORRO, Vanesa** [ES/ES]; Ctra. de Barcelona, 200, 4º, 3ª E-08205 Sabadell (ES). **LÓPEZ GONZÁLEZ, Quiro** [ES/ES]; Ctra. de Barcelona, 200, 4º 3ª E-08205 Sabadell (ES). **GASULL, Miquel Àngel** [ES/ES]; C. dels Madrazo, 24-26, ático 2ª E-08006 Barcelona (ES). **CUNÉ CASTELLANA, Jordi** [ES/ES]; C. Tramontana, 3, 1º E-25210 Girona (ES). **ESPADALER MAZO, Jordi** [ES/ES]; C. Can Prunell, 11 E-17003 Girona (ES). **CABRÉ GELADA, Eduard** [ES/ES]; C. Consell de Cent, 98, 2º 2ª E-08015 Barcelona (ES). **MAÑÉ ALMERO, Josep** [ES/ES]; Av. Martí i Pujol, 597, 3º E-08917 Badalona (ES). **CALVO TORRAS, Maria de los Ángeles** [ES/ES]; C. Sepúlveda, 101, 4º 2ª E-08015

Barcelona (ES). **BONACHERA SIERRA, Miquel Àngel** [ES/ES]; C. Enric Serra, 38 E-17130 L'escala (ES). **AUDIVERT BRUGUÉ, Sergi** [ES/ES]; Ctra. Sarrià de Dalt, 36 E-17841 Sarrià De Ter (ES).

(74)

Agente: **BARLOCCI, Anna**; ZBM Patents, S.L. Plaza Cataluña no. 1 E-08002 Barcelona (ES).

(81)

Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84)

Estados Designados (a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones bajo la Regla 4.17:

— relativa al derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17 (ii))

Publicado:

— con el informe internacional de búsqueda.
— con el listado de secuencias como parte de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible bajo requerimiento de la Oficina Internacional.

(54) Título: CEPAS DE LACTOBACILLUS PLANTARUM COMO PROBIÓTICOS CON EFECTO INMUNOMODULADOR ESPECÍFICO

(57) Resumen: Se proporcionan dos nuevas cepas de Lactobacillus plantarum, adecuadas como probióticos en la industria alimentaria. Las cepas de la invención se depositaron con fecha 18-09-2007 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los Números de Acceso CECT 7315 y 7316. La administración de las cepas produce una activación global del sistema inmune. También se proporcionan productos que comprenden las cepas, particularmente productos comestibles y composiciones farmacéuticas para mejorar el sistema inmune de un animal, incluyendo un ser humano.

db

CEPAS DE LACTOBACILLUS PLANTARUM COMO PROBIÓTICOS CON EFECTO
INMUNOMODULADOR ESPECÍFICO

La presente invención se refiere a los campos de la medicina, microbiología y tecnología de los alimentos y, particularmente, a nuevas cepas de Lactobacillus plantarum para uso como probióticos para producir un efecto beneficioso sobre la salud humana.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Ciertas deficiencias en el funcionamiento del sistema inmune pueden ser una consecuencia de una edad avanzada, estrés, enfermedades infecciosas (por ejemplo, síndrome de inmunodeficiencia adquirida) y malnutrición. En muchos países occidentales, los ancianos representan una proporción de la población en aumento y para la que el gasto sanitario es desproporcionadamente elevado. Muchos de los problemas sanitarios con los que se enfrentan los ancianos se representan por un mayor riesgo dependiente de la edad de morbilidad, debida a una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas y no infecciosas. Se sabe que el proceso de envejecimiento afecta de manera adversa en particular al sistema de defensa inmune, y cada vez hay más indicios de que un sistema inmune que funciona de manera deficiente puede contribuir a una menor resistencia a las enfermedades y una menor esperanza de vida en los ancianos. La inmunosenescencia se caracteriza particularmente por una función del sistema inmune celular por debajo de la óptima. En la mayoría de los cambios relacionados con la edad bien caracterizados están implicados los linfocitos tímicos (T), incluyendo una reducción en el número de células T CD3+ maduras en la circulación periférica, una reducción en el conjunto de células T vírgenes (CD45RA+), una predisposición a la expresión del fenotipo de células T colaboradoras de tipo 2 y una baja capacidad de las células T de sangre periférica de proliferar y secretar interleuquina 2 o contribuir a repuestas de hipersensibilidad de tipo retardado eficaces in vivo. La inmunosenescencia también puede expresarse por cambios en la función o en las proporciones de leucocitos que contribuyen a la inmunidad innata, tales como fagocitos y células destructoras naturales (NK). Hasta el 70% de los sujetos de más de 70 años tienen bajas respuestas de citotoxicidad mediadas por células NK contra células tumorales K562 en comparación con el 40% de los adultos jóvenes. Una reducción en la función innata de las células inmunes generalmente se considera un factor contribuyente a la reducción de la inmunidad en los ancianos. Además, como tanto las células NK como los fagocitos (particularmente los monocitos) secretan muchas citoquinas inmunorreguladoras, su función potencialmente disminuida en los individuos ancianos puede tener efectos importantes aguas abajo sobre acontecimientos inmunes en el sistema inmune integrado, tales como activación y diferenciación de linfocitos (véase H.S. Gill et al., "Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes", Journal of Clinical Immunology 2001, vol. 21, páginas 264-271). Por consiguiente, son muy deseables

intervenciones que puedan combatir la inmunosenescencia por medio de la restauración de la función inmune celular.

Los descubrimientos de que estas deficiencias inmunológicas podrían solucionarse modulando el sistema inmune han estimulado una búsqueda de agentes y/o productos naturales y químicos con propiedades inmunomoduladoras. Desafortunadamente, el uso de muchos productos inmunoestimuladores disponibles actualmente está asociado con efectos secundarios perjudiciales (véase A.K. Nussler y A.W. Thomson, "Immunomodulatory agents in the laboratory and clinic" Parasitology 1992, vol. 105, S5-S23). Por lo tanto, el desarrollo de productos alimentarios naturales con propiedades inmunopotenciadoras, que estén exentos de efectos secundarios, proporcionaría un efecto beneficioso significativo a grupos de población con la función inmune reducida. Por lo tanto, un medio atractivo para restaurar la función inmune es la intervención de la dieta. Las investigaciones previas en los ancianos demostraron que el suplemento de la dieta con micronutrientes (por ejemplo, vitaminas A, C y E; β -caroteno) mejoraba algunos aspectos de la inmunidad celular, incluyendo la proporción de subseries de linfocitos T circulantes y la actividad in vitro de células NK procedentes de la sangre. Otro régimen dietético que podría proporcionar un efecto beneficioso a los ancianos es la suplementación probiótica con cepas inmunoestimuladoras de bacterias de ácido láctico (LAB).

Los probióticos son microorganismos no patógenos vivos que se encuentran normalmente en el tracto gastrointestinal y que, cuando se administran en cantidades adecuadas, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud. Las situaciones específicas para las que se usan los probióticos incluyen aumento en la resistencia a infecciones, prevención y tratamiento de diarrea asociada con antibióticos y otras enfermedades diarreicas, profilaxis de infecciones en el tracto genitourinario, aumento de la función inmune, reducción de los niveles del colesterol y lípidos, aumento de la resistencia de colonización a la microbiota perjudicial y diversos trastorno inmunes incluyendo dermatitis atópica y alergias alimentarias. Se ha demostrado que ciertas cepas de bacterias de ácido láctico bien definidas son potentes potenciadores de inmunidad y ofrecen efectos clínicos beneficiosos a grupos definidos. Por ejemplo, la cepa GG de Lactobacillus rhamnosus se ha usado satisfactoriamente como inmunomodulador dietético en la asistencia pediátrica. Por el contrario, sin embargo, no está bien establecida la capacidad de ciertas cepas definidas de bacterias probióticas de ácido láctico para modular la inmunidad en los ancianos (H. Gill et al., "Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic Bifidobacterium lactis HN019", Am. J. Clin. Nutr. 2001, vol. 74, paginas 833-9).

Estos descubrimientos han promovido el interés en descubrir nuevas cepas de lactobacilos y bifidobacterias que puedan mejorar la inmunidad. Por lo tanto, es deseable

proporcionar nuevos agentes con propiedades probióticas para mejorar la salud, incluyendo la salud geriátrica.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

5

Los inventores proporcionan dos nuevas cepas de Lactobacillus plantarum adecuadas como probióticos como resultado de estudios exhaustivos de diferentes cepas bacterianas aisladas a partir de heces y saliva de seres humanos alimentados con una dieta a base de vegetales. Las cepas de la invención se depositaron con fecha 18-09-2007 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los números de Acceso CECT 7315 y 7316.

10

15

Las cepas CECT 7315 y 7316 fueron las procedentes de muestras de heces que crecieron en un medio MRS suplementado con HCl al 0,05% p/v, 100 µg/l de Novobiocin (Sigma), 5 µg/ml de nistatina, 5 µg/ml de ciclohexamida (Sigma), 1 mg/l de ampicilina y 10 µg/ml de vancomicina, y se incubaron a 30°C en condiciones anaerobias y a un pH de 6,4. La tinción Gram mostró una clara tinción Gram+, así como morfología de bacilos, sin formación de esporas.

20

25

Existe una diversidad de cepas de Lactobacillus plantarum en estudio y comercializadas actualmente como probióticos (véase, M.C. de Vries et al., "Lactobacillus plantarum-survival, functional and potencial probiotic properties in the human intestinal tract", International Dairy Journal 2006, vol. 16, páginas 1018-1028). Sin embargo, es importante indicar que existe una gran variación en la capacidad de mejorar la función inmune y hasta la fecha solamente se han identificado unas cuantas cepas con efectos potenciadores de la inmunidad bien establecidos. Se ha descubierto que la presencia de propiedades inmunomoduladoras de probióticos y el patrón de inmunomodulación dependen de la especie bacteriana implicada, la cepa individual, el uso de bacterias viables o inactivadas y la dosis de bacterias.

30

Como se ilustra más adelante, los resultados de un estudio clínico con seres humanos ancianos sanos demuestra que el suplemento con las dos cepas de la invención es eficaz para mejorar tanto la inmunidad natural como la inmunidad adquirida en los seres humanos.

35

40

Particularmente, las células CD4+ y CD8+ mostraron un aumento significativo en la actividad como se indica por la expresión de CD25. Los linfocitos B (CD19+) y las células destructoras naturales (CD59+) mostraron un aumento significativo en número y también se estimularon las células presentadoras de antígenos (HLA-DR+). Además se observó una reducción significativa en la liberación de citoquinas proinflamatorias (TGF-β). Este resultado, junto con la recuperación de la inmunidad celular, puede indicar que la

regulación inmune se desplaza desde una inmunidad no específica (citoquinas) hacia una inmunidad más específica (celular). Además, las cepas han demostrado que son particularmente útiles como probióticos en la industria alimentaria. Se ha demostrado que las cepas:

- 5 - tienen una eficacia de crecimiento adecuada para producirse a escala industrial y ser económicamente viables;
- son capaces de fermentar leche para formar yogurt y ninguna presenta olores desagradables;
- sobreviven a las condiciones del medio gastrointestinal de los mamíferos (lisozimas, medio ácido, sales biliares y peróxido de oxígeno);
- 10 - se adhieren al epitelio intestinal, lo que permite que las cepas permanezcan al menos de forma transitoria en el tracto intestinal y ejerzan sus efectos probióticos; muestran una mejor capacidad de adhesión que otras cepas comerciales;
- no tienen efectos negativos sobre el comportamiento y el bienestar de los animales en un estudio de toxicidad aguda realizado con ratas;
- 15 - son seguras ya que no producen un aumento en la translocación de bacterias lácticas ni facilitan la translocación enterobacteriana;
- son beneficiosas para el equilibrio de la microbiota intestinal debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de cepas patógenas; y
- 20 - secretan uno o más factores solubles responsable de la actividad antibacteriana.

De esta forma, en un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de Lactobacillus plantarum depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 7315.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de Lactobacillus plantarum depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 7316.

- 30 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un cultivo bacteriano que comprende la cepa 7315 o la cepa 7316 o una mezcla de las mismas.

Como se ilustra más adelante de una forma no restringida, se ha descubierto que las cepas de Lactobacillus plantarum de la presente invención son útiles en la industria alimentaria y, en particular, como probióticos.

De esta manera, en un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un producto que comprende una cantidad eficaz de la cepa 7315 o de la cepa 7316 o de una mezcla de las mismas.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un producto comestible que

comprende una cantidad nutricionalmente eficaz de la cepa 7315 o de la cepa 7316 o de una mezcla de las mismas, junto con cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.

5 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la cepa 7315 o de la cepa 7316 o de una mezcla de las mismas, junto con cantidades apropiadas de excipientes y/o vehículos farmacéuticos aceptables.

10 En un séptimo aspecto, la presente invención se refiere al uso de las cepas de la invención o una mezcla de las mismas para la fabricación de un producto comestible.

En un octavo aspecto, la presente invención se refiere al uso de las cepas de la invención o de una mezcla de las mismas para la fabricación de un medicamento para mejorar el sistema inmune de un animal, incluyendo un ser humano. La invención como alternativa puede formularse como un método para mejorar el sistema inmune de un animal incluyendo un ser humano, que comprende administrar a dicho animal que lo necesita una cantidad eficaz de la cepa 7315 o de la cepa 7316 o de una mezcla de las mismas. El uso de las cepas de la invención puede ser beneficioso en el sentido de que puede usarse profilácticamente en un individuo normal sano, para prevenir el inicio de un estado inmune que funciona de manera deficiente o antes de que se haya desarrollado una enfermedad. La administración de las cepas de la invención también puede ser beneficiosa en el tratamiento terapéutico de estados que presentan una desregulación del sistema inmune (por ejemplo, inmunosenescencia) algunas veces asociada con una enfermedad. Las cepas pueden administrarse con un tratamiento o como un complemento de otro tratamiento.

En un noveno aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de un producto comestible, que comprende cultivar la cepa 7315 o la cepa 7316 o una mezcla de las mismas, en un medio adecuado (por ejemplo, leche, proteína de suero, medio técnico). Las bacterias pueden añadirse a un producto alimentario durante su proceso de fabricación, o pueden añadirse a un producto terminado. Pueden añadirse cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.

35 Estos y otros objetos de la presente invención se describirán adicionalmente en la sección de descripción detallada que se proporciona a continuación y no pretenden limitar la presente invención. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

40 En la práctica de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento. A lo largo de la descripción y las

reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los especialistas en la técnica tras el examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra las curvas de crecimiento de F35 (FIG. 1A) y F47 (FIG. 1B). Se representa el log de cfu/ml frente a T (tiempo, en horas).

10

La FIG. 2 muestra la clasificación filogenética de cepas F35 y F47 basándose en su secuencia 16S, con respecto a las cepas de Lactobacillus más caracterizadas genéticamente.

15

La FIG. 3 muestra los patrones de macro-restricción genómica con enzimas Sfi-I (superior) y Sma-I (inferior). M, marcador; 1: 299v; 2. F35; 3; F47. (*) significa bandas que son diferentes entre patrones.

20

La FIG. 4 muestra el porcentaje de adhesión de las cepas F35 y F47 frente a dos cepas comerciales de Lactobacillus reuteri y Lactobacillus rhamnosus.

25

La FIG. 5 muestra los resultados de la regulación del tránsito intestinal en el estudio clínico. La parte oscura del gráfico corresponde a los individuos con 0-3,5 defecaciones/semana y la parte sin color con 3,5-7 defecaciones/semana. "w" significa semana. La FIG. 5A corresponde al grupo de placebo (n = 15). Desde el punto basal a 24 semanas no hubo diferencias estadísticamente significativas. La FIG. 5B corresponde a grupos que recibieron los probióticos, y $p < 0,05$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PARTICULARES

30

En las secciones que se presentan a continuación se describe una caracterización detallada de las cepas de la invención, sus propiedades y productos derivados de las mismas.

35

Como se usa en la técnica, el término "probiótico" se refiera a bacterias en el contexto de suplementos dietéticos. Generalmente, el término probiótico se refiere a bacterias o levaduras potencialmente beneficiosas, siendo las bacterias de ácido láctico los microbios más comunes usados. La expresión "cantidad eficaz", como se usa en este documento, significa una cantidad de un ingrediente activo suficientemente elevada para proporcionar el efecto beneficioso deseado, pero suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del juicio médico. La expresión "farmacéuticamente aceptable",

40

como se usa en este documento, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance de un criterio médico razonable, son adecuadas para uso en contacto con los tejidos de un sujeto (un ser humano) sin que se produzca una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, en relación con una proporción de beneficios/riesgos razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. Pueden encontrarse vehículos, excipientes, etc. adecuados en textos farmacéuticos convencionales, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990.

El uso de las cepas de la invención es particularmente en forma de células viables. Esto significa la administración de las bacterias vivas que permite que tenga lugar la actividad probiótica en el tracto gastrointestinal del individuo. Sin embargo, como resultado del proceso de preparación (por ejemplo, una fermentación para formar un producto lácteo), el cultivo o parte del cultivo puede estar en forma de células no viables. Como se demuestra más adelante, las cepas de la invención secretan uno o más factores solubles responsables de la actividad antibacteriana.

A este respecto, una realización de la presente invención es un producto que comprende una cantidad eficaz de la cepa 7315 o la cepa 7316 o de una mezcla de las mismas. El producto podría estar en una forma adecuada para la administración tal como píldoras, cápsulas, microcápsulas, gránulos, suspensiones, jarabes o polvos liofilizados para administrarse directamente. Dependiendo de la forma, las cepas pueden estar como una bacteria purificada, como un cultivo bacteriano, como parte de un cultivo bacteriano, como un cultivo bacteriano que se ha tratado posteriormente, y solas o junto con vehículos o ingredientes adecuados. También pueden añadirse prebióticos. Este producto puede administrarse al sujeto como un aditivo.

En otras realizaciones, las cepas de la invención pueden usarse para la preparación de una diversidad de productos comestibles tales como productos lácteos, un yogurt, una cuajada, un queso (por ejemplo, quark, cremoso, procesado, blando y duro), una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado basado en leche, un helado, un producto basado en cereales fermentado, un polvo basado en leche, una bebida, un aliño y un pienso para mascotas. Son ejemplos de otros productos comestibles productos cárnicos (por ejemplo, pasta de hígado, salchichas de Frankfurt y salami o productos de carne que pueden untarse), chocolate para untar, rellenos (por ejemplo trufa, crema) y coberturas frías para pastelería (frostings), chocolate, dulces (por ejemplo, caramelo, pasta de azúcar o dulce de leche), artículos horneados (tartas, pasteles), salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores para el café. Sin embargo, la expresión "producto comestible" se usa en este documento en su significado más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que puede ingerirse por un animal.

Incluye tanto productos listos para comer como productos a los que se añade el producto de la invención como suplemento o como componente constituyente del producto. Son productos comestibles particularmente interesantes suplementos dietéticos y fórmulas infantiles. Los suplementos dietéticos pretenden suministrar nutrientes (vitaminas, minerales, ácidos grasos o aminoácidos) que están ausentes o no se consumen en una cantidad suficiente en la dieta de una persona (niños, mujeres embarazadas, ancianos, etc.). También se incluirían piensos para animales.

En una realización particular de la invención, el producto comestible comprende una mezcla de las cepas 7315 y 7316 en una relación 50:50. En estos productos, la cepa o cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^5 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g y preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10^7 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g, de acuerdo con la legislación actual. Para los fines de la presente invención, la abreviatura "cfu" designará una "unidad formadora de colonias" que se define como el número de células bacterianas como se revela por recuentos microbiológicos en placas de agar.

Las cepas de la invención se producen cultivando las bacterias en un medio adecuado y en condiciones adecuadas. Las cepas pueden cultivarse solas para formar un cultivo puro, como un cultivo mixto junto con otros microorganismos o cultivando bacterias de diferentes tipos por separado y después combinándolas en las proporciones deseadas. Después del cultivo, la suspensión celular se recupera y se usa como tal o se trata de la manera deseada, por ejemplo, por concentración o liofilización.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden las cepas de la invención. A este respecto, la composición farmacéutica puede prepararse para administrarse por vía oral en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, microcápsulas, gránulos, suspensiones, jarabes, polvos liofilizados, preparaciones líquidas etc., estando la cantidad de bacterias a incorporar en la presente invención en el intervalo de aproximadamente 10^5 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g del producto, y preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10^7 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g. Basándose en el objetivo deseado, la persona especialista en la técnica seleccionará los excipientes y/o vehículos apropiados. En una realización particular de la invención, la composición farmacéutica comprende una mezcla de las cepas 7315 y 7316 en una relación 50:50. Aunque se prefiere la administración oral, son posibles otras formas tales como formas inyectables, rectales o tópicas.

En general, las composiciones pueden comprender las cepas de la invención como agentes probióticos individuales, combinaciones de dichos probióticos o combinaciones con otros agentes terapéuticos/nutracéuticos dependiendo de la afección.

Las siguientes secciones describen la caracterización de las cepas de la invención, sus características probióticas específicas y sus efectos fisiológicos sobre los sistemas gastrointestinal e inmune. Como se usa más adelante, la cepa F35 corresponde a Lactobacillus plantarum CECT 7315 y la cepa F47 a L. plantarum CECT 7316.

5

1. Aislamiento de microorganismos

Las fuentes de microorganismos fueron torundas y heces de niños con edades de 0 a 5 años. Las muestras se disolvieron en tampón PBS pH 7,4, se recogieron alícuotas y se cultivaron en diferentes medios para incubación en diferentes condiciones. El tiempo de incubación dependía de la velocidad de crecimiento de la cepa y normalmente era de 24 horas a 7 días. El aislamiento de las cepas individuales se realizó con el mismo medio de selección, y después se realizaron ensayos de tinción Gram y exámenes microscópicos para su caracterización inicial.

15

Las cepas seleccionadas F35 y F47 fueron las procedentes de muestras de heces que crecieron en un medio RMS suplementado con HCl al 0,05% p/v, 100 µg/l de Novobiocin (Sigma), 5 µg/ml de nistatina, 5 µg/ml de ciclohexamida (Sigma), 1 mg/l de ampicilina, 10 µg/ml de vancomicina y se incubaron a 30°C en condiciones anaerobias y a un pH de 6,4.

20 La tinción Gram demostró una clara tinción Gram+, así como morfología de bacilos, y sin formación de esporas. Después, las cepas aisladas y cultivadas se almacenaron por liofilización.

2. Parámetros de crecimiento y producción de biomasa

25

Se evaluó la eficacia de crecimiento, la producción de compuestos de azufre volátiles (VSC), la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y la viabilidad económica global de las cepas.

30 Las cepas seleccionadas se incubaron en las condiciones de selección iniciales. Se controló la densidad de unidades formadoras de colonias (cfu/ml) hasta la saturación y se comparó con patrones de McFarland (Biomérieux) usando un espectrofotómetro (Cecil CE 303). Se tomaron muestras a intervalos de 60 minutos y se sembraron 100 µl de cultivo (x2) sobre placas de MRS o TSA en cada punto de tiempo. También se evaluaron el rendimiento, la velocidad de crecimiento, el peso seco y el consumo de nutrientes en cada punto de tiempo. El rendimiento se calculó de acuerdo con la ecuación $y = (X_t - X_0) / (S_t - S_0)$

35

donde y es rendimiento, X_0 es la concentración inicial, X_t es la concentración en cada punto de tiempo, S_0 es la concentración inicial de nutrientes y S_t es la concentración de nutrientes en cada punto de tiempo.

40

La velocidad de crecimiento se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación $\mu = \mu_{\max} * (S/K_S + S)$

donde la constante de saturación es $K_S = 697 \text{ mg/ml}$ y $\mu_{\max} = 0,46 \text{ h}^{-1}$.

- 5 Para calcular el peso seco, se centrifugó 1 ml de cultivo a 10000 rpm durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante, se secó al aire a 25°C durante 72 horas y se pesó en una balanza de precisión. El consumo de nutrientes se evaluó por colorimetría indirecta. Para la liberación de colorías se ensayó el contenido de azúcar en los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de muestras de medio de cultivo a 10000 rpm durante 5 minutos.

10

Como se muestra en la FIG. 1, las cepas tienen una eficacia de crecimiento adecuada para producirse de forma industrial y son económicamente viables (es decir, tienen un tiempo de producción mínimo y un rendimiento máximo). El valor de $\mu_{\max}$ fue de $0,4425 \text{ h}^{-1}$ tanto para la cepa F35 como para la cepa F47.

15

3. Ensayo de fermentación de leche

El objetivo de este ensayo fue determinar si F35 y F47 podían fermentar la leche y si producían sustancias de olor desagradable (VSC o SCFA). Se pasteurizó un litro de leche desnatada no enriquecida y se inocularon alícuotas de 100 ml con 10^8 cfu de cada cepa individual F35 y F47, y se incubaron a 37°C durante 24 h (x3). Después se estimaron la coagulación y el olor a simple vista y por medio del olfato. Los resultados demostraron que las dos cepas pueden fermentar leche para formar yogur y ninguna presentaba olores desagradables.

20

25

Se siguió el pH durante la fermentación, produciéndose una reducción hasta un valor pH de 5,8 para F35 y de 5,4 para F47 en la fase estacionaria. Esto se debe al efecto tamponante producido por la leche y la producción de biomasa.

30

4. Caracterización taxonómica de cepas

Se recogieron bacterias de cepas seleccionadas, se lavaron y se pre-trataron con tampón de pre-lisis (480 μl de EDTA 50 mM, pH 8,0; 120 μl de lisozima a 10 mg/ml) por resuspensión e incubación a 37°C durante 60 min. El ADN se extrajo usando un kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega). Después de la centrifugación de las bacterias pre-tratadas a 14000 g durante 2 min para retirar el sobrenadante, se siguió el protocolo de Promega. En resumen, las bacterias se resuspendieron en Solución de Lisis Nuclear (Nuclei Lysis Solution) y se incubaron a 80°C durante 5 min, después se enfriaron a temperatura ambiente. Se incubaron lisados celulares en solución de RNasa a 37°C durante 60 min y se precipitaron proteínas añadiendo la Solución de Precipitación de Proteínas y agitando con vórtice a alta velocidad. Las muestras se enfriaron y se

35

40

centrifugaron a 15000 g durante 3 min. Los sobrenadantes que contenían el ADN se transfirieron a tubos de microcentrífuga limpios de 1,5 ml y se mezclaron con 600 µl de isopropanol por inversión. El ADN se recogió por centrifugación a 15000 g durante 2 min vertiendo cuidadosamente el sobrenadante. Se lavaron muestras de ADN con 600 µl de etanol al 70% invirtiendo suavemente el tubo varias veces. El etanol se retiró por aspiración, después de una centrifugación a 15000 g durante 2 min. Finalmente, el sedimento de ADN se resuspendió en 100 µl de Solución de Rehidratación incubando a 65°C durante 1 h. Se almacenaron muestras a 2-8°C.

4.1 Identificación genética de género y especie

El ARNr 16S se amplificó por PCR usando los cebadores universales Eub27f y Eub1492r, que producen un fragmento de secuencia casi completa de 16S (más de 1000 nucleótidos) (TABLA 1). Después, el ADN obtenido se lavó usando el kit Quiaquick (Quiagene).

TABLA 1. Cebadores usados para amplificar y secuenciar del gen 16S.

Etapas	Cebador	Orientación	Secuencia 5' → 3'
Amplificación	Eub27f	directa	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEC ID Nº: 1)
	Eub1492r	inversa	TACGGYTACCTTGTTACGACTT (SEC ID Nº: 2)
Secuenciación	27f	directa	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEC ID Nº: 3)
	357f	directa	CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGC CCGCCGCCCCCGCCCCCTACGGG AGGCAGCAG (SEC ID Nº: 4)
	907r	inversa	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEC ID Nº: 5)
	1492r	inversa	GGTTACCTTGTTACGACTT (SEC ID Nº: 6)

Se realizaron cuatro reacciones de secuenciación consecutivas para cada muestra en un Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) usando el kit BigDye v.3.1, usando los cebadores mostrados en la TABLA 1. La recogida de los datos y los cromatogramas se construyeron usando el software DNA Sequence Analysis v.5.2 (Applied Biosystems) y se comprobaron por análisis visual con Chromas (Technelysium Pty Ltd.) y BioEdit (Ibis Biosciences).

La identificación del género se realizó usando la herramienta Ribosomal Database Project

(RDP) (Q. Wang et al., "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy", Appl. Environ. Microbiol. 2007, vol. 73, págs. 5261-7). La identificación de especies se realizó por comparación de la secuencia obtenida con secuencias 16S de organismos conocidos de la base de datos RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) por medio de un BLASTN, y del Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>, J.R. Cole et al, "The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data" Nucl. Acids Res. 2007, vol. 35, págs. 169-72).

La herramienta RDP identificó las dos cepas F35 y F47 como cepas pertenecientes al género Lactobacillus. Los resultados demostraron que F35 y F47 presentan una identidad del 98% y del 99%, respectivamente, con 16S de la cepa WCFS1 de L. plantarum (FIG. 2).

4.2. Genotipificación de cepas

La caracterización se realizó por digestión genómica y electroforesis en gel con campo pulsado. Se sometieron cepas F35 y F47 a un protocolo descrito previamente (A.M. Rodas et al., "Polyphasic study of wine Lactobacillus Strains: taxonomic implications", Int J Syst Evol Microbiol 2005, vol. 55, págs., 197-207). Las cepas se cultivaron en placas de agar MRS y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 18 horas. Después se recogieron y se lavaron 3 veces en 8 ml de PET (Tris 10 mM, pH 7,6, NaCl 1 M) y después se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en 700 µl de tampón de lisis (Tris 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, SLS al 0,5%, ácido desoxicólico al 0,2%; 1 mg/ml de lisozima; 40 U/ml de mutanolisina; 20 µg/ml de RNasa). A las células resuspendidas se les añadió un volumen igual de agarosa de bajo punto de fusión al 1,6% (FMC BioProducts, Rockland, ME, USA) y se permitió la solidificación a 4°C durante 1 h. Se transfirieron insertos a 2 ml de tampón de lisis II (EDTA 0,5 M, pH 9,2, N-lauril sarcosina al 1% y 1 mg/ml de pronasa) y se incubaron a 50°C durante 48 h. Después, los insertos se lavaron a temperatura ambiente con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). La digestión de ADN total se realizó por las enzimas de restricciones Sfi-I y Sma-I (Roche Diagnostics).

Se realizó una electroforesis de campo pulsado usando el aparato CHEF DRIII (BioRad Laboratories). Se cargaron insertos en un gel de agarosa al 1% (SeaKem ME agarose, FMC BioProducts, ME, USA). La TABLA 2 describe las condiciones de electroforesis para cada enzima. Los marcadores de PM de ADN fueron el Marcador PFG Lambda ladder y el Marcador PFG Low Range (New England Biolabs). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y UV usando el Sistema GelDoc (BioRad).

TABLA 2. Condiciones de electroforesis para este estudio

Enzima	Bloque	Pulso inicial (seg)	Pulso Final (seg)	Tiempo (horas)
Sfi-I	1	2	10	10
	2	15	25	6
Sma-I	1	0,5	5	16

Los resultados obtenidos con las dos enzimas Sfi-I y Sma-I fueron similares. Como se muestra en la FIG. 3, el patrón obtenido para la cepa L. plantarum 299v es muy diferente de los patrones mostrados por las cepas F35 y F47. Estos patrones difieren en la posición de una banda en el caso de Sfi-I (figura superior), mientras que con la enzima Sma-I (figura inferior), la cepa F47 muestra una banda adicional. En la bibliografía se ha descrito que a diferencia de otros Lactobacillus, la especie L. plantarum presenta una alta heterogeneidad genética (I. Sánchez et al., "Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with 'Almagro' eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns" Journal Applied Microbiology 2004, vol. 97, págs. 446-58). Las cepas F35 y F47 parecen estar muy relacionadas genéticamente, de forma que pueden proceder del mismo origen clónico (F.C. Tenover et al., "Interpreting chromosomal DNA restrictions patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing" J. Clin. Microbiol. 1995, vol. 33, págs. 2233-9).

5. Resistencia al medio gastrointestinal

Para evaluar la resistencia de cepas F35 y F47 a las condiciones del medio gastrointestinal de los mamíferos, se realizaron ensayos específicos para cuantificar la supervivencia después del tratamiento con lisozima, medio ácido, sales biliares y peróxido de oxígeno.

5.1. Tolerancia a lisozima: se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa bacteriana en una placa de 96 pocillos, y después se añadieron 200 µl de lisozima (Sigma) a 100, 200 ó 300 µg/ml en medio MRS. Las placas se incubaron a 37°C, con 5% de CO₂ durante 1 h. El crecimiento bacteriano se cuantificó midiendo la densidad óptica a 620 nm en un lector ELISA. Los resultados se expresan frente al control, que es crecimiento máximo de cada una de las cepas en un caldo MRS (TABLA 3).

TABLA 3

Lisozima (µg/ml)	Media	Media C+	Desviación Típica	Desviación Típica C+
F35				
100	0,35	0,25	0,02	0,02
200	0,32	0,24	0,01	0,01
300	0,38	0,28	0,01	0,02
F47				
100	0,16	0,20	0,01	0,01
200	0,18	0,21	0,01	0,01
300	0,19	0,20	0,02	0,02

5.2. Tolerancia a medio ácido: se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa en una placa de 96 pocillos, y después se pusieron alícuotas de 200 µl de medio TBS o MRS ajustado al valor de pH deseado con HCl (Panreac) sobre pocillos que contenían bacterias. Después, las placas se mantuvieron a 42°C durante 2 h y se leyeron en un espectrofotómetro a 620 nm. Los resultados se expresan frente al control, que es el crecimiento máximo de cada una de las cepas en un caldo MRS (TABLA 4).

TABLA 4

pH	Media	Media C+	Desviación Típica	Desviación Típica C+
F35				
2	0,1976	0,428	0,02	0,018
2,5	0,2547	0,277	0,022	0,031
3	0,2498	0,366	0,019	0,018
3,5	0,2494	0,472	0,017	0,015
4	0,263	0,404	0,019	0,017
4,5	0,285	0,345	0,02	0,025
5	0,2783	0,266	0,0278	0,026
5,5	0,18	0,173	0,017	0,021
6	0,3465	0,355	0,0201	0,018
F47				
2	0,1392	0,2324	0,019	0,017
2,5	0,2748	0,3506	0,025	0,024
3	0,205	0,27	0,017	0,016
3,5	0,157	0,207	0,026	0,024
4	0,1963	0,2406	0,011	0,015
4,5	0,2477	0,286	0,09	0,05

pH	Media	Media C+	Desviación Típica	Desviación Típica C+
5	0,31	0,373	0,017	0,016
5,5	0,308	0,337	0,015	0,014
6	0,2929	0,282	0,017	0,014

5.3. Tolerancia a sales biliares: se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa bacteriana en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µl de dilución de sales biliares a los pocillos. Se ensayaron cuatro condiciones y tres concentraciones diferentes (0,3%; 0,5% y 1%, en p/v, pH 3 y 0,3% p/v, pH no ajustado). Las placas se mantuvieron a 37°C, con 5% de CO₂ durante 3 h y se leyeron a 620 nm (TABLA 5).

TABLA 5

Sales biliares-pH	Media	Media C+	Desviación Típica	Desviación Típica C+
F35				
0,3% sin pH	0,217	0,4001	0,017	0,015
0,3% pH 2	0,2214	0,4009	0,018	0,017
0,5% pH 3	0,3154	0,4099	0,02	0,019
1% pH 3	0,2997	0,4099	0,022	0,025
F47				
0,3% sin pH	0,525	0,41	0,02	0,017
0,3% pH 2	0,7728	0,419	0,017	0,022
0,5% pH 3	0,7224	0,42	0,019	0,025
1% pH 3	0,756	0,4194	0,022	0,026

5.4. Tolerancia a peróxido de oxígeno: se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µl de diluciones de H₂O₂ (0,8823, 0,5882, 0,2941 mM) a los pocillos y las placas se incubaron 30 min a 37°C y después se leyeron a 620 nm (TABLA 6).

TABLA 6

Dilución de H ₂ O ₂ (mM)	Media	Media C+	Desviación Típica	Desviación Típica C+
F35				
0,8823	0,32	0,3021	0,016	0,014
0,5882	0,332	0,3024	0,018	0,018
0,2941	0,311	0,301	0,016	0,015
F47				

0,8823	0,272	0,31	0,022	0,02
0,5882	0,3424	0,32	0,016	0,018
0,2941	0,286	0,33	0,021	0,023

Un resultado de más de un 40% de crecimiento con respecto al control se considera positivo. Considerando agentes en la boca que tienen una actividad bactericida (peróxido de oxígeno y lisozima), no se observó ninguna falta de viabilidad de estas cepas, incluso en concentraciones de los agentes bactericidas mayores de las condiciones fisiológicas (lisozima 0,8823 mM/ml y 10 µg/ml de peróxido de oxígeno). Con respecto a los parámetros en el estómago (pH), sólo hubo una falta de viabilidad del 5% a pH 2 (condiciones muy estrictas, no fisiológicas). No hubo falta de viabilidad en el ensayo con sales biliares, incluso en el momento del vaciado del estómago cuando la capacidad detergente de las sales biliares se combina con un pH ácido.

6. Adhesión al intestino

Se obtuvo moco lavando un intestino con PBS pH 7,4, gelatina al 0,01% e inhibidor de proteasas (Complete®, Sigma). Se raspó la mucosa y se depositó en un recipiente con tampón HEPES 10 mM-sal de Hank pH 7,4 y los mismos inhibidores. El moco después se lavó por centrifugación a 13000 rpm durante 10 min con el mismo tampón. Los sobrenadantes se recuperaron y el contenido de moco se evaluó por el protocolo de Bradford.

Las capacidades de adhesión de F35 y F47 se compararon con la adhesión de dos cepas comerciales. Se pusieron inóculos de 150 µl de cultivos de una noche de cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos en medio MRS suplementado con timidina marcada con tritio (5 µl en 3 ml de MRS) y se contó la concentración de microorganismos en una cámara Neubauer. Después, las preparaciones se centrifugaron y los sedimentos se resuspendieron en PBS para obtener las cfu/ml deseadas. La señal de tritio incorporada en los microorganismos se calcula a partir de la señal de tritio inicial (los µl de timina marcada con tritio añadidos al medio) y la señal del sobrenadante. A partir de las cfu totales del cultivo, la relación entre este número (señal incorporada en la biomasa) y el número total de microorganismos en el cultivo produce el valor de dpm/cfu (señal/bacteria).

Para realizar el ensayo se consideró que el moco no tiene puntos ilimitados para la adhesión de microorganismos y que en un área limitada, tal como un pocillo de una placa, la adición de una concentración inadecuada de cfus puede producir una super- o infra-evaluación de la capacidad de unión. De esta manera, en un preensayo, se evaluó el porcentaje de adhesión de diferentes concentraciones para encontrar la concentración

adecuada a usar en el ensayo. Se observó una reducción en el porcentaje de adhesión desde una concentración de 1×10^8 cfu/ml, de forma que esta concentración se eligió para el ensayo.

5 24 h antes del ensayo, se incubó 1 ml de la solución de moco a 0,5 mg/ml en pocillos de una placa ELISA. Después se añadieron las preparaciones de microorganismos a los pocillos y, después de una incubación durante 60 min a 37°C, se retiraron los sobrenadantes de cada pocillo, los pocillos se lavaron con medio MEM Alfa (Gibco) y se rasparon para despegar el moco-microorganismos de los pocillos. El % de adhesión se
10 calcula contando la señal de tritio en un lector de centelleo de la preparación de moco en el pocillo y el valor de dpm/cfu como se ha obtenido anteriormente. El resultado es el número de bacterias adheridas por unidad de área de moco. La FIG. 4 demuestra que $3,06 \times 10^6$ y $3,25 \times 10^6$ cfu de las cepas F35 y F47 respectivamente pueden unirse a 2 cm² de moco intestinal. En comparación con otras cepas comerciales, F35 y F47 mostraron
15 doble capacidad de adhesión.

7. Ensayos de toxicidad

Se administraron las cepas F35 y F47 a 5×10^{10} cfu/kg en PBS a dieciocho ratas Wistar de
20 9 meses (machos y hembras) durante dos días consecutivos a una dosis total de 10^{11} cf/kg. Los animales se alimentaron con pienso (Teklad 2014) y agua ad libitum. La administración fue después de comer con el estómago lleno y con ayuda de un tubo oro-gástrico. Cada dos días se determinó el comportamiento y el bienestar de los animales asignando valores a los parámetros detallados en la TABLA 7. Las puntuaciones totales
25 se deben a la suma de los valores obtenidos en cada parámetro: peso + comportamiento + respuesta a estímulos. Durante el estudio no se detectó ningún efecto negativo sobre el comportamiento y bienestar de los animales.

30 TABLA 7. Evaluación del comportamiento y bienestar animal. El valor 0 es normal; un valor de 7 indica una morbilidad intolerable y sacrificio del animal para evitar el sufrimiento innecesario.

	Parámetro	valor
Peso	Normal	0
	Pérdida < 10%	1
	Pérdida del 10% al 20%; posible cambio en heces	2
	Pérdida > 20%	3
Comportamiento	Normal	0
	Piel dañada	1
	Piel dañada y secreción ocular	2

Respuesta a estímulo	Postura Anormal	3
	Automutilación o manifestaciones de dolor	3
	Normal	0
	Agresiva	3
	Comatosa	3

Los animales se sacrificaron el día 7 por inhalación de CO₂. Se realizó una necropsia completa para encontrar lesiones macroscópicas en los órganos. Se tomaron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos para ensayar la translocación bacteriana. Se homogeneizaron aproximadamente 5 mg de cada muestra en 1 ml de PBS con gelatina al 0,01%. Se cultivaron 100 µl de este homogeneizado en placas McConkey o placas MRS. Las colonias se contaron después de la incubación a 37°C durante 48 h. Los resultados se presentan en la TABLA 8. Se observaron unas pocas colonias lácticas en placas MRS de animales de control o alimentados con F35 o F47. Estos corresponden a una translocación basal normal de bacterias de ácido láctico (J.S. Zhou et al, "Acute oral toxicity 15 and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria", Food Chem Toxicol 2000, vol. 38, págs. 153-61).

TABLA 8. Translocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos de animales después de comer. Los números indican el número de animales con crecimiento bacteriano positivo y el número máximo de cfus por miligramo de tejido.

Grupo	Sexo	Enterobacterias [cfu/mg]	Bacterias de Ácido Láctico [cfu/mg]	Translocación Máxima observada [cfu/mg]
Control	Machos	0/3	2/3	2
	Hembras	0/3	2/3	2
F35	Machos	0/3	1/3	2
	Hembras	0/3	2/3	4
F47	Machos	0/3	1/3	4
	Hembras	0/3	0/3	0

En conclusión, los resultados demuestran que la administración oral de cepas F35 y F47 es segura, ya que no conduce a un aumento en la translocación de bacterias lácticas ni facilita la translocación enterobacteriana. Todos los animales mostraron una evolución similar en el peso corporal a lo largo del estudio. No se observaron diferencias significativas en el pienso y el consumo de agua. No se detectó ningún síntoma clínico ni la alteración del bienestar de los animales. No se detectaron lesiones macroscópicas en órganos y cavidades durante el examen histopatológico.

8. Propiedades antibacterianas

Para evaluar si las cepas F35 y F47 presentaban actividades antibacterianas, se realizó un protocolo Campbell usando placas de agar sembradas con patógenos bacterianos en medio Oxoid. Los patógenos usados en este estudio se seleccionaron entre los presentes comúnmente en el tracto gastrointestinal humano (véase la TABLA 9). Se frotaron uniformemente las placas y se cultivaron hasta la confluencia a las temperaturas apropiadas en un incubador con 5% de CO₂. Después se puso una sección cilíndrica de una placa de agar con F35 o F47 confluentes sembradas uniformemente sobre la placa de patógeno de manera que se permitiera la transferencia y se incubó durante una noche a 37°C.

Al día siguiente se midieron las zonas de inhibición poniendo la placa de agar sobre una regla plana. Después se calculó la actividad inhibidora del crecimiento restando el diámetro del cilindro (CD) del diámetro de la zona de inhibición (IZD) y dividiendo esta diferencia por dos siguiendo la fórmula $GI = (IZD - CD) / 2$.

TABLA 9. Valores de inhibición del crecimiento de acuerdo con la fórmula representada anteriormente.

	F35	F47
<u>Salmonella enterica Enteritidis</u> CECT 4155	1	1
<u>Salmonella enterica Typhimurium</u> CECT 4594	0,5	1
<u>Bacillus subtilis</u> CECT 35	1,5	0,5
<u>Clostridium botulinum</u> CECT 4611	1	0,5
<u>Yersinia enterocolitic</u> NCTC 10460	2	2,5
<u>Listeria monocytogenes</u> CECT 4031 T	0,5	0

Las cepas F35 y F47 inhibieron el crecimiento de las cepas patógenas mostradas en la TABLA 9. De esta manera, se benefician del equilibrio de la microbiota intestinal debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de cepas patógenas.

9. Ensayo de secreción de agentes antibacterianos

Para ensayar si un factor antibacteriano de F35 y F47 se secretaba al medio, se cultivó una mezcla 1:1 de las dos cepas en placas MRS y se incubaron durante 18 h a 37°C y con un 5% de CO₂. Después, las bacterias se recogieron y se sedimentaron a 6000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore) y el sedimento se lavó dos veces y se resuspendió en HEPES (Sigma). Se sembraron placas McConkey con cada cepa patógena (Salmonella enterica CETC 4155, Salmonella typhimurium CETC 4594 o Escherichia coli entero-haemorrágica (H7:O157, aislado silvestre)) y se perforaron pocillos cilíndricos de 5 mm de diámetro en las placas con una

pipeta pasteur. Los pocillos después se rellenaron con 60 µl de cada mezcla resuspendida de cepas o sobrenadante y las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Al día siguiente, el diámetro de las zonas de inhibición se calculó como se ha indicado anteriormente. Los resultados, mostrados más adelante en la TABLA 10, indican que la inhibición del crecimiento se debe a uno o más factores solubles secretados por estas dos cepas.

TABLA 10. Valores de inhibición del crecimiento para sobrenadante frente a células de las cepas F35 y F47.

Fracción	<u>S. enterica</u> CECT 4155	<u>S. enterica</u> CECT 4594	<u>E. coli</u> EHEC
Células enteras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Sobrenadante	2,0 ± 0,0	1,6 ± 0,5	1,4 ± 0,2

10. Inmunomodulación en seres humanos

El objeto de este ensayo clínico fue describir los efectos inmunomoduladores de cepas F35 y F47 en seres humano. El estudio era un estudio aleatorio, doble ciego y controlado con placebo. Sesenta individuos sanos con edades de 65 a 70 años elegidos según un criterio de exclusión estricto consistente en: cualquier enfermedad aguda grave en el mes previo al ensayo; cualquier enfermedad neoplásica avanzada; intolerancia a productos alimenticios; trastornos para tragar que impiden la ingesta de la preparación del estudio; suplementos dietético (vitaminas/oligoelementos) en el mes previo al ensayo; no poder asistir a las citas de monitorización. Se mezclaron cepas de L. plantarum F35 y F45 1:1 antes de la dosificación. Hubo tres grupos:

- Baja dosis (n=20): 5 x 10⁸ cfu/día en 20 g de leche desnatada en polvo
- Alta dosis (n=20): 5 x 10⁹ cfu/día en 20 g de leche desnatada en polvo
- Placebo (n=20): 20 g de leche desnatada en polvo (placebo/vehículo).

Los individuos recibieron uno de tres tratamientos aleatoriamente durante 12 semanas y se monitorizaron durante 12 semanas más. Cada dosis se empaquetó en un sobre sellado al vacío a disolver en 200 ml de agua u otra bebida fría. En las citas de monitorización se recogieron los siguientes datos, entre otros: examen físico; historia clínica (enfermedades crónicas, cirugía, defecaciones/semana); hábitos de automedicación; altura, peso, BMI; cuestionario de calidad de vida (SF-36), analítica sanguínea rutinaria (hemograma, recuento de leucocitos, ensayo de coagulación; glucemia, colesterol, triglicéridos, urea, creatinina, ionograma, bilirrubina, proteína C-reactiva) y ensayos de inmunología.

Ensayos de inmunología:

Se recogieron los siguientes datos: poblaciones de leucocitos (células T totales (CD3+),

células T CD4+, células T CD8+, células T activadas (CD25+), células B (CD19+), células NK (CD56+) y APC (HLA-DR+)) y citoquinas: IL-1, IL-10 y TGF- β .

Anticuerpos: CD3 de ratón anti-humano conjugado con PECy5, CD25 de ratón anti-humano conjugado con PE, CD8 de ratón anti-humano conjugado con APC, CD4 de ratón anti-humano conjugado con FITC, CD3 de ratón anti-humano conjugado con FITC, CD19 de ratón anti-humano conjugado con APC, CD56/16 anti-humano conjugado con PE, HLA-DR de ratón anti-humano conjugado con PECy5.

10 Reactivos y kits: Solución de Tampón FACSlysing (x10) y BD™ CBA Flex Sets: IL-1 β humana e IL-10 humana proporcionadas por BD Bioscience (San Diego, CA, USA); ELISA para TGF- β 1 humano proporcionado por Bionova científica, S.L. (Madrid, España). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

15 Caracterización fenotípica por citometría de flujo: Después de filtrar los anticuerpos marcados con fluorocromos por citometría, se procesaron simultáneamente dos tubos con 50 μ l de sangre total cada uno: tubo 1 con 2 μ l de CD25 anti-humano-PE, 4 μ l de CD4 anti-humano-FITC, 5 μ l de CD8 anti-humano-APC y 2 μ l de CD3 anti-humano-PECy5, y tubo 2 con 2 μ l de CD56/16 anti-humano-PE, 2 μ l de CD3 anti-humano-FITC y 2 μ l de CD19 anti-humano-APC. Después de la incubación durante 15 minutos en la oscuridad; se añadieron 2 ml de Solución de Tampón FACSlysing, y se dejaron 7 min en la oscuridad para ocasionar la lisis de los eritrocitos. Después, se centrifugó (1500 rpm, 10 min) y los sedimentos se lavaron dos veces con PBS (1500 rpm, 10 min). El sedimento se resuspendió con PBS y se analizó por FACScalibur. Los valores obtenidos por citometría expresan el porcentaje de cada marcador fenotípico por cada 10000 células CD3+.

30 Análisis de IL-10 e IL-1 β plasmáticas por citometría de flujo: Se analizó con el Kit Tampón Maestro de Proteína Soluble Humana (Human Soluble Master Buffer) (BD Cytometric Beas Array) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se incubaron 50 μ l de plasma obtenido por procedimientos rutinarios durante 1 h con 50 μ l de una mezcla que contenía perlas recubiertas con anticuerpos anti-IL-10 y perlas recubiertas con anticuerpos anti-IL-1 β . Después se añadieron 50 μ l de una solución que contenía anticuerpos específicos marcados con PE contra otros epítomos de citoquinas durante 2 h. Después, la muestra se lavó y se resuspendió para el análisis de FACScalibur. El análisis citométrico de las citoquinas se basó en la detección de PE junto con el tamaño diferente de cada perla. Los resultados se normalizaron con una curva patrón de IL-10 e IL-1 β proporcionada por el fabricante (pg/ml).

40 Análisis de TGF- β 1 por ELISA: Se usó un ELISA de tipo sándwich siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se diluyó plasma procedente de muestras de sangre 1:50 para después acidificarse con HCl 1N y neutralizarse con NaOH 1N (1 h).

Con este procedimiento, se activó el TFG-β1. Se prepararon diluciones a partir de 600 pg/ml de TFG-β1 para dibujar una curva patrón. Después, se depositaron 100 µl de patrones y de cada muestra x2 en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante una noche a 4°C. Posteriormente se incubaron 100 µl de anticuerpo monoclonal de ratón anti-TFG-β1 durante 2 h en un agitador y después se incubaron 100 µl de anticuerpo IgG marcado con biotina durante 45 min con agitación. Después de los lavados consecutivos, se distribuyeron 100 µl de una solución de estreptavidina peroxidasa en cada pocillo y se incubaron durante 45 min con agitación. A continuación se realizaron 3 lavados y 100 µl de solución con sustrato de peroxidasa (TMB). Quince minutos después se añadió la solución de interrupción y se realizó la medición de absorbancia (450 nm). Los valores de concentración de las muestras se obtuvieron por extrapolación de la absorbancia al gráfico lineal de la curva patrón.

Se realizó un estudio estadístico con el software SPSSv12 (USA). Se realizaron comparaciones intragrupo con el ensayo de ranking con signos (signed-rank) de Wilcoxon y comparaciones intergrupo con el ensayo de Kruskal-Wallis.

TABLA 11. Análisis de modulación del sistema inmune tras la ingestión de la mezcla F35/F47. Los grupos se han indicado anteriormente. Los datos se expresan como media e intervalo intercuartil entre paréntesis. (*) significa valores estadísticamente significativos (p<0,05).

Tiempo Grupo	1ª Semana Inicio	Semana 12 Final del Tratamiento	Semana 24 Eliminación	
Placebo	67,8 (51,9-73,5)	61,0 (59,6-71,8)	64,3 (56,2-69,0)	CD3+
Baja Dosis	71,1 (56,5-73,1)	67,7 (56,6-75,6)	64,7 (58,6-73,3)	
Alta Dosis	66,8 (59,1-75,6)	71,6 (58,0-76,4)	65,5 (59,5-70,1)	
Placebo	23,8 (20-28,19)	26,7 (18,8-31,5)	23,3 (19,0-29,2)	CD3+CD25+
Baja Dosis	17,7 (13,2-23,3)	22,8 (15,1-34,4)	18,2 (15,0-32,6)	
Alta Dosis	21,6 (16,0-25,3)	24,3 (15,1-28,2)	19,4 (14,5-23,5)	
Placebo	37,7 (32,3-45,0)	34,1 (27,8-43,3)	37,5* (32,6-40,4)	CD4+
Baja Dosis	37,5 (27,4-46,8)	36,1 (30,1-44,9)	36,1 (30,8-45,2)	

32

Tiempo Grupo	1ª Semana Inicio	Semana 12 Final del Tratamiento	Semana 24 Eliminación	
Alta Dosis	33,9 (22,9-38,8)	30,9 (26,3-37,8)	28,0 (24,9-38,4)	
Placebo	13,9 (10,3-22,4)	14,2 (13,3-26,4)	15,3 (12,4-22,3)	CD4+CD25+
Baja Dosis	12,2 (8,9-18)	17,0* (11,1-22,2)	14,3 (10,2-21,9)	
Alta Dosis	11,6 (10,6-20,2)	15,4 (11,0-21,3)	14,5 (9,8-20,1)	
Placebo	21,3 (12,2-26,3)	18,5 (12,9-26,2)	21,7 (13,2-28,4)	CD8+
Baja Dosis	20,6 (13,3-28,4)	19,1 (12,3-30,4)	19,4 (12,9-30,1)	
Alta Dosis	22,2 (17,7-36,4)	24,4 (21,7-36,9)	24,5 (20,9-37,7)	
Placebo	3,3 (1,6-3,8)	3,2 (2,2-4,5)	3,1 (2,5-4,1)	CD8+CD25+
Baja Dosis	3,4 (2,2-5,9)	3,7 (2,6-6,3)	3,9 (2,3-4,9)	
Alta Dosis	2,9 (2,1-4,6)	3,8* (1,9-6,0)	3,6 (2,4-5,0)	
Placebo	6,3 (6,0-8,3)	6,4 (6,2-10,7)	6,4 (5,9-10,4)	CD19+
Baja Dosis	5,9 (4,9-8,4)	6,8* (6,2-9,1)	7,6 (5,4-11,9)	
Alta Dosis	6,7 (4,9-7,5)	6,8 (4,8-7,9)	6,7 (4,5-9,9)	
Placebo	19,1 (10,3-33,6)	18,4 (14,3-27,1)	18,4 (15,5-26,9)	CD56+
Baja Dosis	17,2 (11,4-25,5)	19,5 (11,4-27,9)	15,2 (14,4-26,9)	
Alta Dosis	16,4 (10,4-24,4)	19,8* (10,4-32,8)	18,0 (12,5-23,5)	
Placebo	6,8 (6,3-8,3)	6,1 (5,8-7,4)	7,3 (5,9-8,6)	HLA-DR+
Baja Dosis	6,5 (6,2-9,3)	7,5* (6,9-9,2)	7,5 (5,4-9,7)	

Tiempo Grupo	1ª Semana Inicio	Semana 12 Final del Tratamiento	Semana 24 Eliminación	
Alta Dosis	6,1 (5,6-7,1)	6,3 (5,6-7,0)	6,0 (5,0-6,9)	
Placebo	16,5 (5,2-23,0)	14,1 (3,8-19,1)	10,2 (6,6-17,2)	TGF-β
Baja Dosis	25,9 (15,7-31,2)	12,5* (7,2-22,6)	8,2 (6,9-15,3)	
Alta Dosis	24,0 (10,4-30,1)	10,2* (5,8-16,7)	8,4 (6,4-12,9)	

De acuerdo con estos datos, el tratamiento con una mezcla de cepas F35 y F47 produce una activación global del sistema inmune. En particular, las células CD4+ y CD8+ mostraron un aumento significativo en la actividad como se indica por la expresión de CD25. Los linfocitos B (CD19+) y las células Destructoras Naturales (CD56+) mostraron un aumento significativo en número y también se estimularon las células presentadoras de antígeno (HLA-DR+). Además, se observó una reducción significativa en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (TGF-β). Este resultado, junto con la recuperación de la inmunidad celular, puede indicar que la regulación inmune se desplaza desde un nivel más inespecífico (citoquinas) a un nivel más específico (celular). Los niveles de citoquinas IL-1 e IL-10 fueron indetectables en todos los grupos, ya que los sujetos bajo estudio estaban sanos.

Se controlaron las defecaciones/semana durante el estudio clínico para evaluar la regulación del tránsito intestinal por la administración de la preparación. Los resultados (FIG. 5) demuestran que los sujetos suplementados con la preparación tienen una mayor frecuencia en sus hábitos de defecación, lo que indica que las cepas de la invención tienen un efecto regulador del tránsito intestinal.

Considerados conjuntamente, estos datos demuestran que la inmunidad sistémica se regula debido a la interacción intestinal con una mezcla de cepas de Lactobacillus plantarum (F35 y F47), interrumpiendo la ruta de señalización inmune inflamatoria.

11. Evaluación in vitro de la capacidad de inmunomodulación de la producción de citoquinas de un probiótico en un modelo de mucosa intestinal

Como se explicará más adelante, los inventores descubrieron sorprendentemente un grupo de cepas de Lactobacillus plantarum que podían antagonizar la capacidad inflamatoria de algunas bacterias patógenas encontradas normalmente en el intestino.

Estas cepas objeto de la invención comparten una actividad inmunomoduladora mejorada con respecto a otras cepas bacterianas relacionadas. La inmunomodulación se traduce en una inducción mejorada común del patrón de citoquinas de las células de la mucosa intestinal. Las dos cepas F35 y F47 promueven una reducción del TNF- α y un aumento de los niveles IL-10. Este efecto se consigue usando las cepas en una forma viable, que es la forma a aplicar cuando se administran como probióticos en seres humanos. En el sentido de la invención, "forma viable" significa que las bacterias se usan vivas sin ningún tratamiento previo. Además, esta modulación común del patrón de citoquinas es mejor que la modulación observada por otro Lactobacillus plantarum ensayado en formas no viables.

Ciertos miembros de la microflora comensal intestinal están en contacto permanente con GALT (Tejido Linfoide Asociado con el Intestino). Dependiendo de la composición de la microflora, hay un patrón de producción de citoquinas por el sistema inmune. Esta producción de citoquinas se desarrolla por los receptores de tipo Toll (TLR) de las células dendríticas, cuando reconocen estructuras específicas de la superficie de las bacterias. En concreto, los receptores TLR más importantes en esta función son TLR-2 y TLR-4. Estos receptores reconocen moléculas, estructuras o residuos muy conservados a lo largo de los diferentes taxones microbianos, que se expresan en la superficie de los mismos y actúan como ligandos para TLR. Cuando TLR-2 y 4 interaccionan con ciertos antígenos bacterianos, empiezan la producción de marcadores inflamatorios. En caso de que, como una consecuencia de la composición de la microbiota, la producción de citoquinas sea excesiva, es posible que aparezcan lesiones en los tejidos como resultado de la inflamación y problemas inmunológicos. Estas lesiones llevan asociadas consecuencias importantes, incluyendo una menor eficacia de la respuesta del sistema inmune y una mayor tendencia a desarrollar enfermedades autoinmunes.

Se sabe que las bacterias Gram negativas muestran en su superficie celular la molécula LPS (lipopolisácarido). El LPS es una endotoxina reconocida por el sistema inmune como un riesgo potencial. Cuando el LPS interacciona con el TLR-2 y TLR-4, induce la producción de marcadores inflamatorios. En una composición de microflora comensal normal, podemos encontrar microorganismos Gram negativos; por consiguiente, existe contacto entre el sistema inmune asociado al tracto gastrointestinal y el lipopolisácarido (LPS).

El suplemento de probióticos puede cambiar esta situación para favorecer una mayor presencia de bacterias gram positivas (agrupadas en el grupo de bacterias de ácido láctico), con mejor estado ecológico o con propiedades antagonistas contra algunos microorganismos Gram negativos, reduciendo de esta manera la presencia de LPS en la mucosa intestinal. Sin embargo, la configuración molecular y estructural de la superficie celular de algunos microorganismos probióticos muestra la capacidad de modular per se

la producción de moléculas de comunicación entre las células del sistema inmune (citoquinas) que se desplazan a un patrón más equilibrado entre la señalización pro/anti-inflamatoria (sin reducir el número de bacterias Gram negativas).

5 Los receptores TLR-2 y 4 se expresan comúnmente en la mucosa intestinal in vivo. Sin embargo, la mayoría de las líneas celulares usadas como modelo de mucosa intestinal, tales como HT-29 o Caco-2, no tienen la capacidad de producir citoquinas con o sin la presencia de elementos de inducción. Por esta razón, los inventores seleccionaron una línea celular apropiada para desarrollar los ensayos in vitro que se muestran más
10 adelante.

El modelo seleccionado es la línea celular de monocitos THP-1, debido a su sensibilidad a componentes bacterianos tales como LPS (como inductor de la respuesta inflamatoria), y su susceptibilidad para modular su producción de citoquinas cuando hay moléculas en el
15 medio adecuadas para la inducción de la producción de un patrón de citoquinas anti-inflamatorias.

Se propuso la hipótesis de que un probiótico (mezcla de F35 y F47, ahora denominada Lp 3547) tendría la capacidad de regular la producción de TNF- α (respuesta inflamatoria), en un cultivo de THP-1 inducido con LPS, mostrando mejores resultados que Lactobacillus plantarum 299V (denominado 299V para los fines de la invención). De hecho, los
20 inventores querían evaluar si el efecto de las cepas juntas sería más fuerte que el efecto de cada cepa por separado y que el efecto de las cepas de la técnica anterior. En los siguientes experimentos con células probióticas Lp 3547 y THP-1, se usa LPS como inductor. Una razón de elegir el LPS es la alta reactividad que muestran las células contra esta molécula, de forma que proporciona una manera más sencilla de realizar las lecturas experimentales. La otra razón importante es que el LPS representa un elemento real de microbiota intestinal, porque como se ha indicado anteriormente en el intestino podemos encontrar bacterias Gram negativas (con LPS).
25

30 La elección de Lactobacillus plantarum 299V como control del experimento se debió a su notoriedad como probiótico en el grupo taxonómico de Lactobacillus plantarum, el mismo al que pertenecen las cepas F35 y F47, así como el probiótico Lp 3547 a ensayar.

35 La serie de experimentos se diseñó con la intención de obtener información útil, para la siguiente hipótesis:

- a) el probiótico Lp 3547 tiene una mayor capacidad de inmunomodulación que Lactobacillus plantarum 299V, en relación con la regulación de la expresión del perfil de citoquinas (relación entre citoquinas antiinflamatorias y proinflamatorias); y
- 40 b) el efecto de las cepas integradas en el probiótico Lp 3547 (F35 y F47) es mucho mayor que el efecto de las dos cepas por separado.

La primera etapa del experimento fue el crecimiento de células THP-1 obtenidas a partir de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo). Se cultivaron en medio DMEM, hasta el momento óptimo para la realización del estudio de inmunomodulación. Las células se cultivaron en placas ELISA de 24 pocillos a una concentración final de 106 monocitos/pocillo, aproximadamente.

Estas células, al principio del experimento, se estimulan con LPS diluido en 500 microlitros de medio DMEM a una concentración final de 10 ng/ml, durante 2,5 horas. Después de este tiempo, los pocillos se lavan tres veces con 0,5 ml de PBS. La siguiente etapa consiste en poner las células THP-1 en contacto con microorganismos probióticos. Las cepas probióticas se han cultivado previamente durante la noche (F35, F47 y L299V) en medio MRS a 37°C con una atmósfera con un 5% de CO₂. Después de la incubación, se valora la concentración de microorganismos/ml usando la cámara de recuento Neubauer, para calcular la dilución necesaria para obtener una relación de cfu/monocitos de 25:1 ($2,5 \times 10^7$), en 500 microlitros de DMEM, en los pocillos ELISA con células THP-1. Cada dilución de F35, F47 y L299V se genera con medio DMEM suplementado con gentamicina (50 microgramos/ml), ampicilina (10 microgramos/ml) y cloranfenicol (12 microgramos/ml) (abreviado G.A.C.). El argumento para usar estos antibióticos es evitar la proliferación de microorganismos que podrían alterar la homogeneidad de la relación 25:1. Estos antibióticos se establecieron como inocuos para las células THP-1 y solo bacteriostáticos para las células L. plantarum F35 y F47 y L. plantarum 299V. El tiempo de coincubación de células THP-1 con probióticos es de 24 horas, tomándose muestras de cada coincubación a las 6 horas y al final del experimento. Los tiempos estimados más adecuados para coger las muestras de sobrenadante y evaluar la producción de TNF- α e IL-10, son 6 y 24 horas después de la adición de las cepas probióticas. La elección no es aleatoria, pero es producto de un trabajo previo que estudiaba los tiempos en los que las diferencias y los valores de concentración de las interleuquinas son más evidentes (datos no mostrados). El sobrenadante obtenido de esta manera se usa para detectar TNF- α e IL-10 con un kit comercial que requiere un análisis por citometría de flujo, como el que se usa en la sección 10 anterior, y realizar las etapas rutinarias bien conocidas por el especialista en la técnica.

Para la interpretación de los resultados obtenidos, se calculó la pendiente entre los valores obtenidos a 6 y 24 horas, calculando posteriormente la pendiente normalizada. La pendiente normalizada se calcula con la siguiente fórmula: $NS = ((1 - \text{valor de IL a 24 h} / \text{valor de IL a 6 h}) / 24) \times 100$; donde NS es la pendiente normalizada, y el valor de IL es la concentración de interleuquina 10 o TNF- α a las 6 ó 24 horas. La razón de la selección de este método es obtener un valor estándar que permita una comparación transversal entre los experimentos (Tabla 13), ya que es más interesante la evolución de la concentración de

citoquinas que el valor absoluto de las mismas (pg/ml). En los valores obtenidos a las 6 horas, las células THP-1 están aún bajo inducción de LPS; entonces, la concentración de TNF- α se eleva y la IL-10 se reduce. Es a las 24 horas cuando es posible observar la inversión del perfil de producción de citoquinas (reducción de TNF- α y el aumento de IL-10).

En la TABLA 12 se muestra esquemáticamente el diseño experimental de cada ensayo. Los ensayos, Exp. 1, Exp. 2, Exp. 3, Exp. 4 y Exp. 5, tienen el objetivo de atribuir la detección de citoquinas a su producción por células THP-1, y asegurar que los valores obtenidos no son un resultado de reacciones cruzadas con otros elementos integrales del experimento. El Exp. 6 representa los valores basales de la producción de citoquinas sin inductor ni probióticos (control negativo). El Exp. 7 representa el valor de producción de citoquinas por THP-1 cuando se inducen por LPS (control positivo). El resto de ensayos (Exp. 8 – Exp. 14) corresponde a la evaluación de la modulación del perfil de citoquinas por las cepas probióticas ensayadas. Todos los valores mostrados son medias de duplicados en cada réplica realizada.

TABLA 12. Representación esquemática de los elementos experimentales usados en cada ensayo.

Componente Experimento	THP1	G.A.C	LPS	Cepa 1	Cepa 2
Exp. 1		X	X		
Exp. 2		X	X	L299V	
Exp. 3		X	X	F35	
Exp. 4		X	X	F47	
Exp. 5		X	X	F35	F47
Exp. 6	X				
Exp. 7	X	X			
Exp. 8	X	X	X		
Exp. 9	X	X	X	F35	
Exp. 10	X	X	X	F47	
Exp. 11	X	X	X	F35	F47
Exp. 12	X	X	X	F35	F299V
Exp. 13	X	X	X	F47	F299V
Exp. 14	X	X	X	F299V	

Análisis de IL-10 y TNF- α en diferentes experimentos:

Con los resultados obtenidos en los 5 primeros experimentos, se demostró que no existen interacciones cruzadas en los métodos de evaluación con otros elementos usados en la

experimentación, es decir, sólo podrían determinarse variaciones de TNF- α e IL-10 debido a la presencia de THP-1. La pendiente normalizada entre los valores obtenidos a 6 y 24 horas fue nula para los experimentos 1-5 (sin THP), de esta forma puede deducirse que no hay reacciones cruzadas.

5

En la TABLA 13 se muestran los valores de IL-10 y TNF- α obtenidos para los experimentos 6 a 14 (Exp. 6 - Exp. 14).

TABLA 13. Análisis de capacidad de inmunomodulación de diferentes probióticos y mezclas de los mismos

10

Exp.	24 h		6 h		(24-6 h)		Pendiente		Pendiente Normalizada	
	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Exp. 6	0,945	1,730	0,805	1,675	0,14	0,05	0,01	0,002	0,72	0,14
Exp. 7	1,045	1,830	0,915	1,675	0,13	0,16	0,01	0,01	0,59	0,39
Exp. 8	33,055	5613,53	18,02	5980,46	15,04	-366,03	0,63	-15,29	3,48	-0,26
Exp. 9	234,505	2042,395	27,755	3701,56	206,75	-1650,17	8,61	-69,13	31,04	-1,87
Exp. 10	283,70	2380,045	31,365	3927,345	252,34	-1547,30	10,51	-64,47	33,52	-1,64
Exp. 11	348,28	1054,155	28,11	3820,925	320,17	-2766,77	13,34	-115,28	47,46	-3,02
Exp. 12	423,94	3411,85	45,475	4605,655	378,47	-1193,81	15,77	-49,74	34,68	-1,08
Exp. 13	270,805	3175,83	32,25	4420,09	238,56	-1244,26	9,94	-51,84	30,82	-1,17
Exp. 14	232,93	4111,85	37,925	4693,815	195,01	-581,06	8,13	-24,25	21,42	-0,52

Antes de proceder con la interpretación de los resultados del Exp. 6 al Exp. 14, es necesario subrayar los valores obtenidos en los experimentos 6, 7 y 8. En los dos primeros, es posible observar que la producción de IL-10 y TNF- α es baja en células THP-1 sin LPS ni cepas probióticas (con o sin presencia de antibiótico; Exp. 6 – Exp. 7). Éste es un hecho importante para la interpretación de las pendientes normalizadas calculadas en los experimentos, ya que el medio o la alta producción de interleuquinas por células THP-1 de una manera intrínseca podrían ocultar los valores experimentales obtenidos.

15

Los valores obtenidos en el experimento 8 (Exp. 8), en relación con el valor negativo obtenido en la pendiente normalizada de la producción de TNF- α , se atribuyen al fenómeno de retroalimentación negativa, muy común en los sistemas biológicos. Es decir, la producción elevada de interleuquinas proinflamatorias por células THP-1 las conduce a una autorregulación de la producción de TNF- α . Sin embargo, es necesario subrayar que, a pesar de una reducción en la concentración de la producción de TNF- α a 24 horas, los valores a 6 y 24 horas en este Exp. 8 son los más elevados en todas las series experimentales. En este Exp. 8 el valor para IL-10 es menor que los obtenidos cuando las células THP-1 se inducen por LPS y en presencia de cepas probióticas. De una forma neta, puede deducirse que la inducción con LPS conduce a una respuesta inflamatoria en células THP-1.

Basándose en estas primeras premisas, es posible darse cuenta de que el experimento 11 (Exp. 11) es el experimento en el que se observa una mayor inducción de la producción de IL-10 (entre 6 y 24 horas) y una mayor reducción de la producción de TNF- α . En el Exp. 11 las células se pusieron en contacto con el probiótico Lp 3547 (F35 + F47), después de una inducción de THP-1 con LPS.

Cuando se observan los valores obtenidos en experimentos con las cepas F35 y F47 añadidas de forma independiente, los resultados demuestran que existe una función cooperativa cuando las dos cepas permanecen juntas (probiótico Lp 3547), ya que los valores, cuando se añaden de forma individual, a pesar de ser buenos, no alcanzan los valores obtenidos cuando se usan conjuntamente. Esta función cooperativa no se detecta cuando cada una de ellas (F35 o F47) está en contacto con células THP-1 y con Lactobacillus plantarum 299V (Exp. 12 y Exp. 13). Aunque los valores obtenidos en los experimentos 12 (Exp. 12) y 13 (Exp. 13) son interesantes, son mucho menores que los obtenidos en el experimento 11 (Exp. 11).

Los valores obtenidos en el experimento 14, que corresponden al efecto de la cepa L299V cuando se usa individualmente, refuerzan la idea de la superioridad de inmunomodulación de las cepas F35 y F47 (Exp. 9 y Exp. 10) individualmente y, especialmente, cuando se usan juntas (Exp. 11) en la forma probiótica Lp 3547. De hecho, por los resultados de la TABLA 13 se deduce claramente que el efecto de las dos cepas de Lactobacillus plantarum (F35 y F47) juntas (Lp3547) es mayor que el efecto obtenido por cada cepa independientemente, o cuando se combina con Lactobacillus plantarum 299V, o cuando sólo se añade L299V al medio. Por consiguiente, puede concluirse que el uso de las dos cepas juntas implica una sinergia en la respuesta de las células THP-1 a la inducción con LPS.

La reducción observada en la respuesta inflamatoria inducida por la presencia de LPS y

8
5

otras toxinas a nivel intestinal tiene un efecto directo a nivel sistémico. El efecto sobre el nivel sistémico evita desregulaciones inmunológicas, o la prosecución de un estado inflamatorio a largo plazo, que normalmente conduce a estados inflamatorios crónicos con implicación en enfermedades graves tales como reacciones autoinmunes o lesiones intestinales tales como el Síndrome de Crohn.

Tiene que subrayarse que los efectos descritos se han demostrado usando las cepas en una forma viable y sin ninguna alteración (sonicación, purificación de fracción, etc.). Esta forma viable imita la manera en la que el probiótico se administraría a un mamífero, incluyendo seres humanos. Éste es un hecho importante, ya que podemos encontrar estudios con Lactobacillus plantarum 299V en los que la capacidad de esta cepa de producir inmunomodulación por medio de la reducción de la expresión TNF- α se ensaya con extractos de L299V, obteniéndose los extractos por una sonicación de un sedimento bacteriano. Esto representa una situación irreal, ya que aunque es perfectamente aceptable que hay una pérdida de porcentaje de viabilidad de microorganismos durante el paso por el tracto gastrointestinal; esta pérdida no implica una ruptura de la célula ni una disgregación como la que se produce por un proceso de sonicación.

De esta manera, los experimentos con la forma viable de las cepas mostradas en esta sección 11 representa un modelo más adecuado para estudiar el efecto de las mismas, y permitir la extrapolación al patrón de administración real en mamíferos, incluyendo seres humanos.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de Lactobacillus plantarum depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 7315.

5

2. Cepa de Lactobacillus plantarum depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 7316.

10

3. Cultivo bacteriano que comprende la cepa según la reivindicación 1 o la cepa según la reivindicación 2 o una mezcla de las mismas.

4. Producto que comprende una cantidad efectiva de la cepa definida en la reivindicación 1 o de la cepa definida en la reivindicación 2 o de una mezcla de las mismas.

15

5. Producto comestible que comprende una cantidad nutricionalmente efectiva de la cepa definida en la reivindicación 1 o de la cepa definida en la reivindicación 2 o de una mezcla de las mismas, junto con cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.

20

6. Producto comestible según la reivindicación 5, que comprende una mezcla de las cepas definidas en la reivindicación 1 y 2 en una relación 50:50.

25

7. Producto comestible según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, donde la cepa o las cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^5 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g.

8. Producto comestible según la reivindicación 7, donde la cepa o las cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^7 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g.

30

9. Producto comestible según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, que se selecciona del grupo que consiste en un producto lácteo, un yogurt, una cuajada, un queso, una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado basado en leche, un helado, un producto basado en cereales fermentado, un polvo basado en leche, una bebida, un aliño, un pienso, un suplemento dietético y una fórmula infantil.

35

10. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de la cepa definida en la reivindicación 1 o de la cepa definida en la reivindicación 2 o de una mezcla de las mismas, junto con cantidades apropiadas de excipientes y/o vehículos farmacéuticos aceptables.

40

11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, que comprende una mezcla de las cepas definidas en la reivindicación 1 y 2 en una relación 50:50.

12. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 10-11, donde la cepa o las cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^5 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g.

5

13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde la cepa o las cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^7 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g.

10 14. Cepa definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para uso en la industria alimentaria.

15. Cepa definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para uso como probiótico.

15 16. Mezcla de las cepas definidas en la reivindicación 1 y 2, para uso en la industria alimentaria.

17. Mezcla de las cepas definidas en la reivindicación 1 y 2, para uso como probiótico.

20 18. Uso de la cepa definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para la fabricación de un producto comestible.

19. Uso de una mezcla de las cepas definidas en la reivindicación 1 y 2, para la fabricación de un producto comestible.

25 20. Uso de la cepa definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-2, para la fabricación de un medicamento para potenciar el sistema inmune de un animal, incluyendo un ser humano.

30 21. Uso de una mezcla de las cepas definidas en la reivindicación 1 y 2, para la fabricación de un medicamento para potenciar el sistema inmune de un animal, incluyendo un ser humano.

35 22. Procedimiento para la preparación de un producto comestible, que comprende cultivar la cepa definida en la reivindicación 1 o la cepa definida en la reivindicación 2 o una mezcla de las mismas, en un medio adecuado.

FIG. 1A

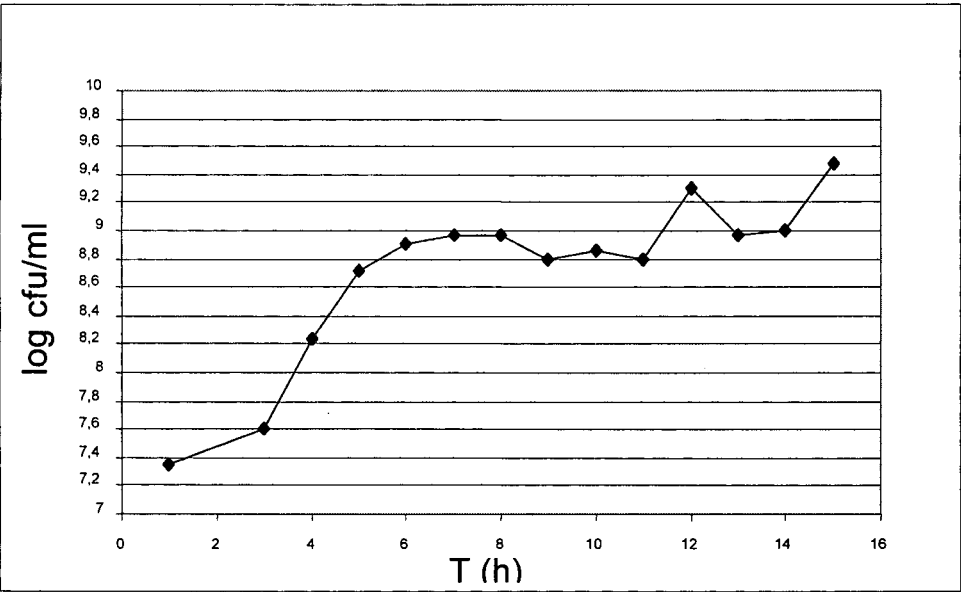


FIG. 1B

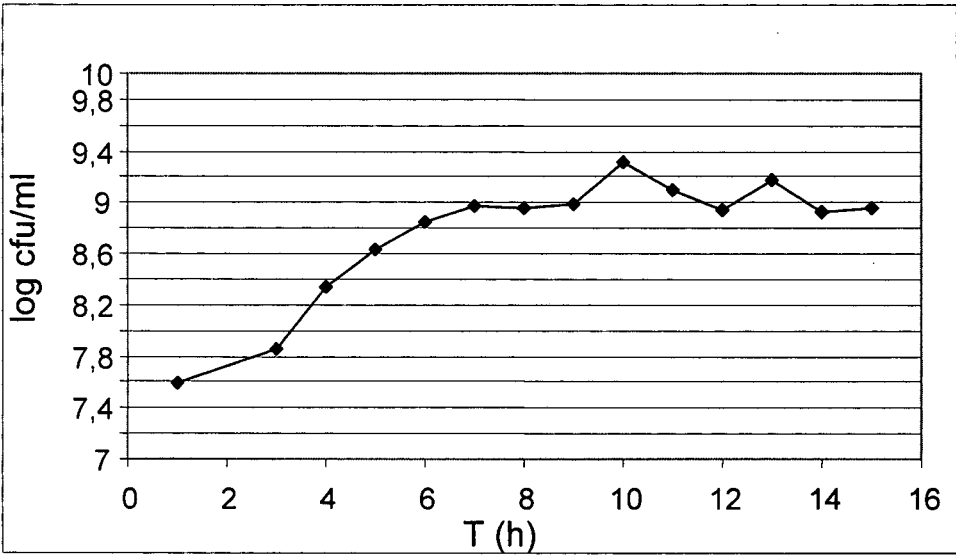
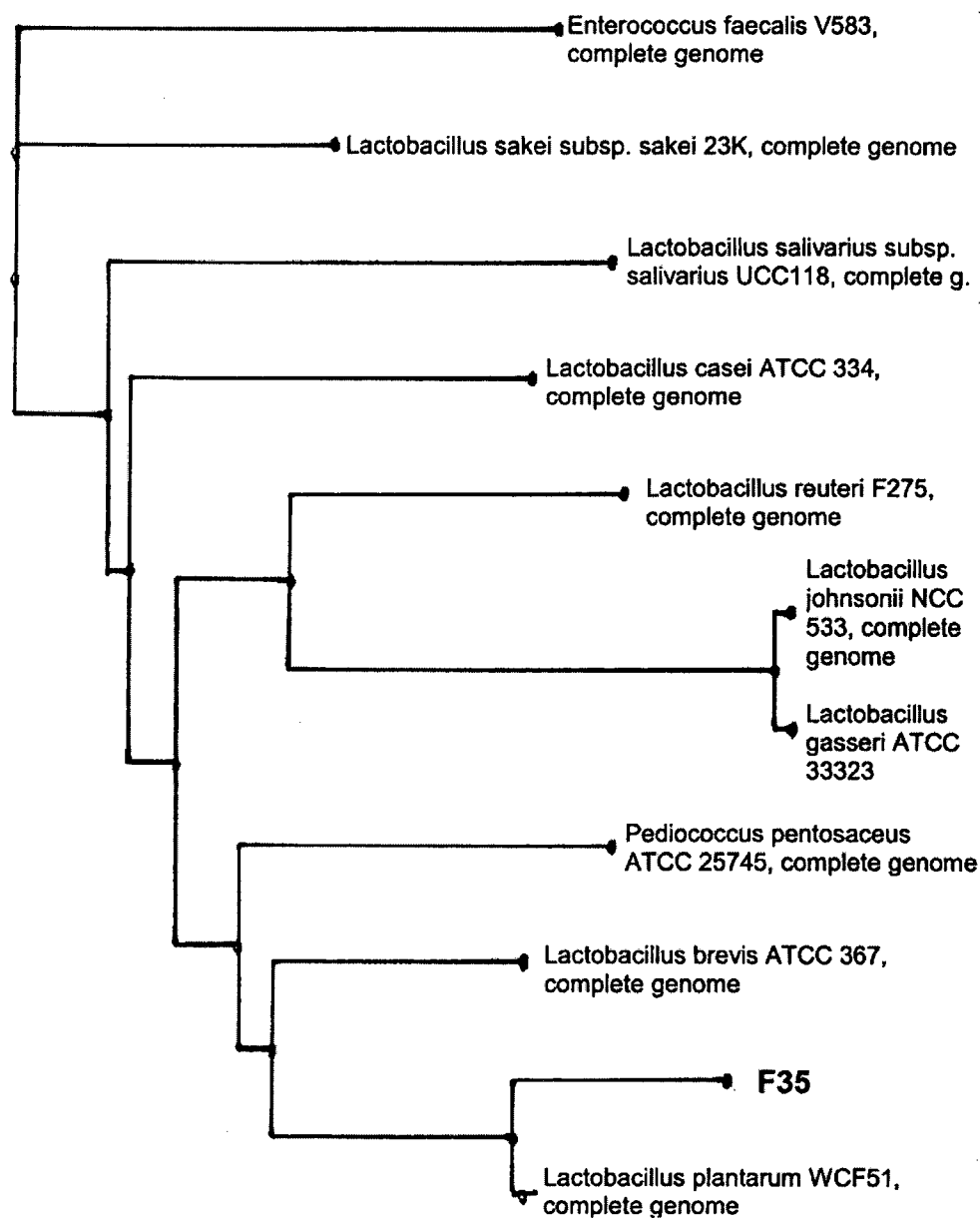


FIG. 2



Cont. FIG. 2

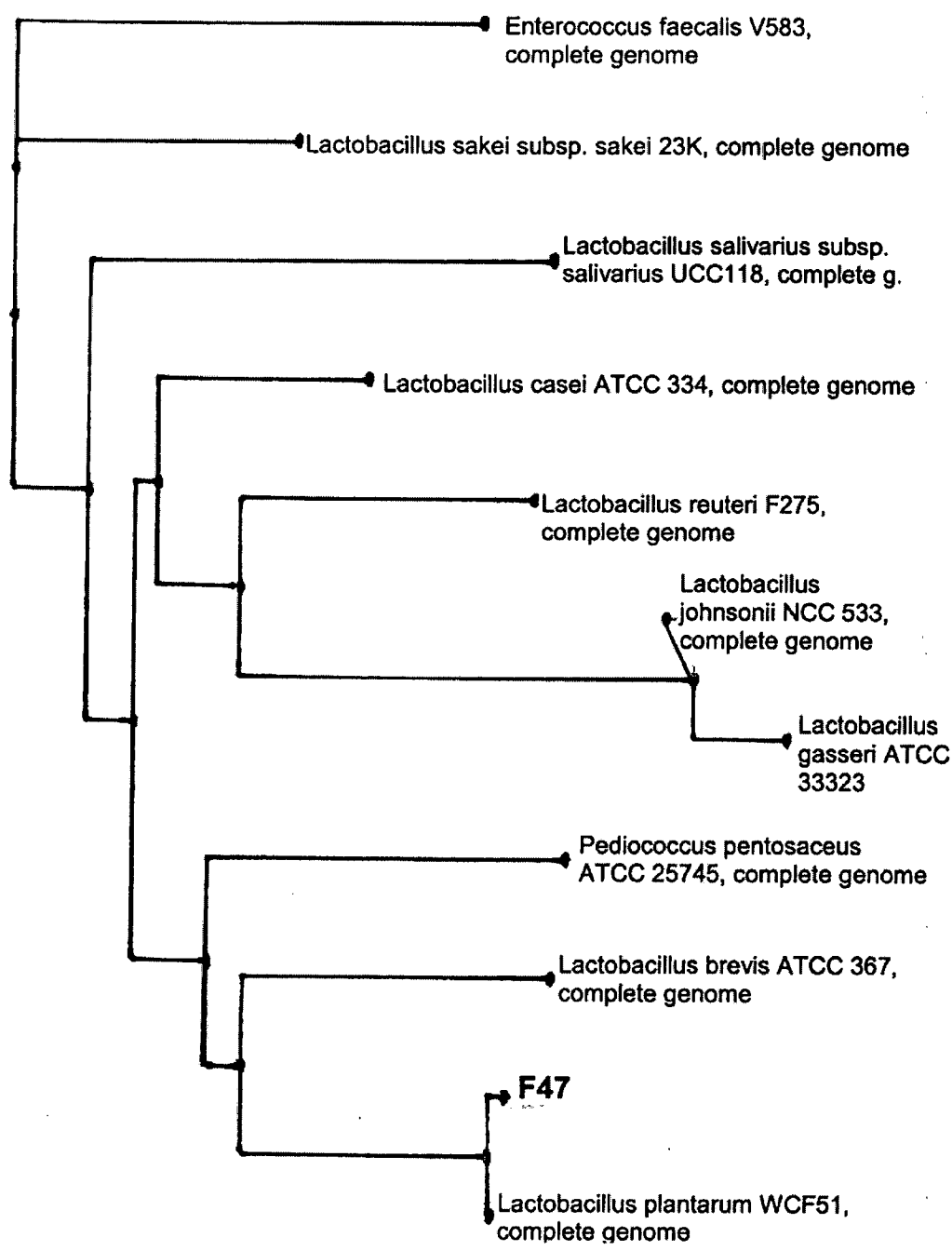


FIG. 3

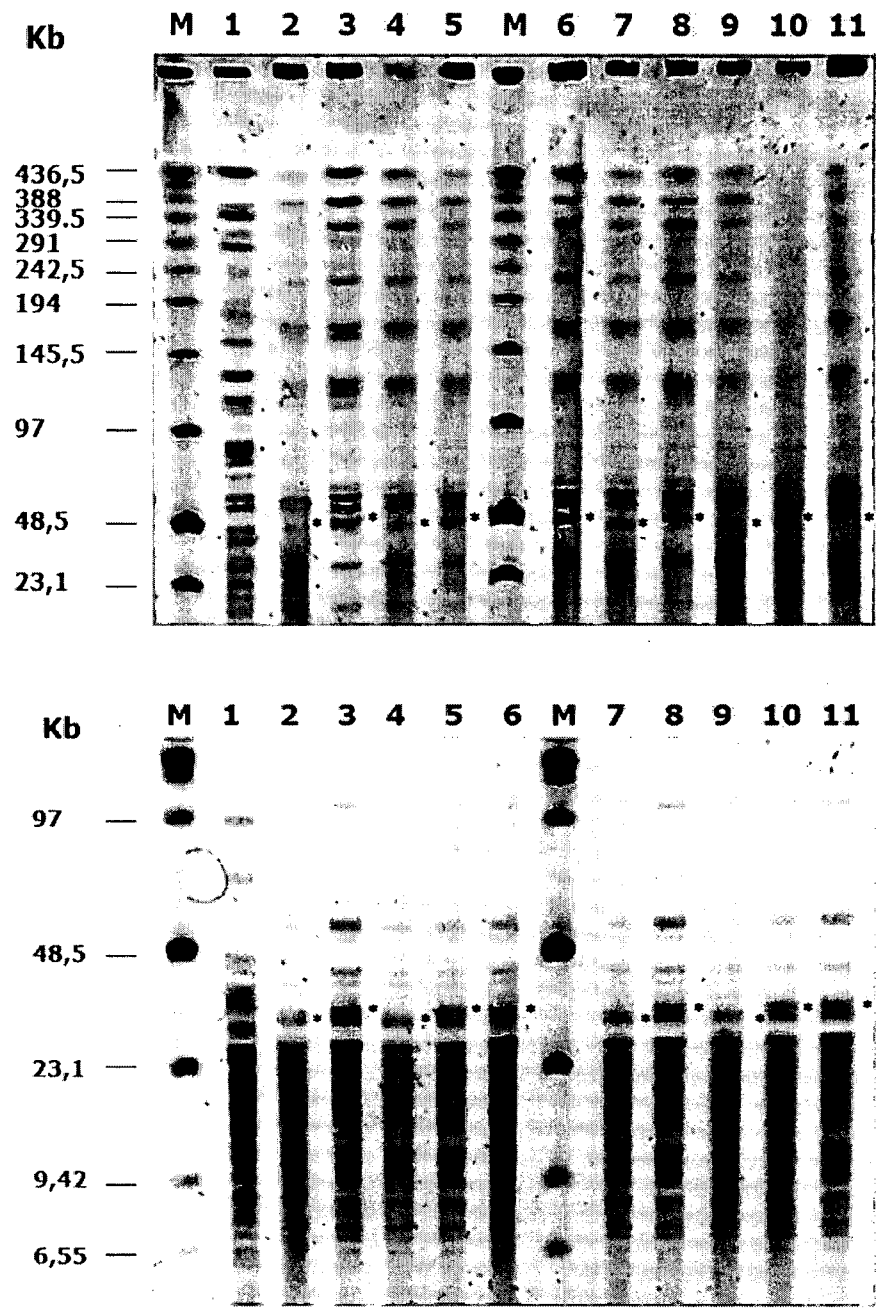


FIG. 4

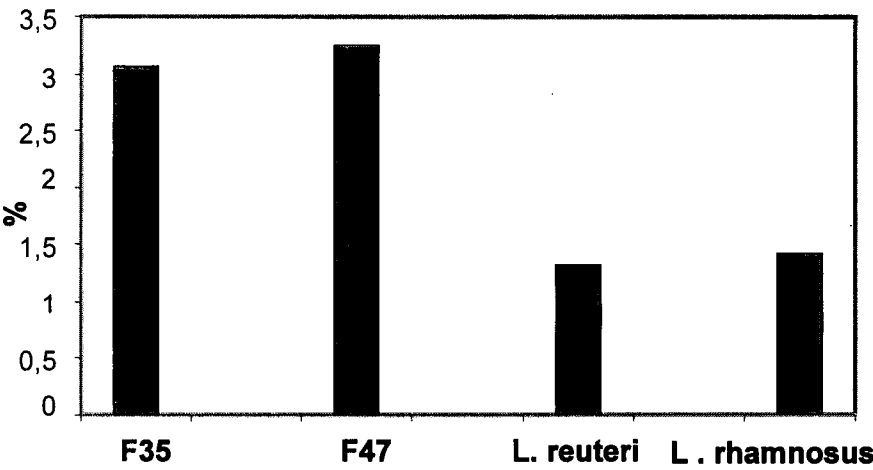


FIG. 5A

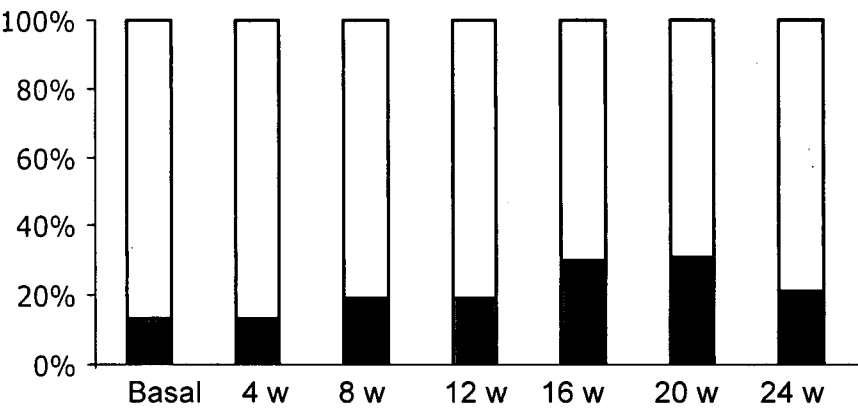
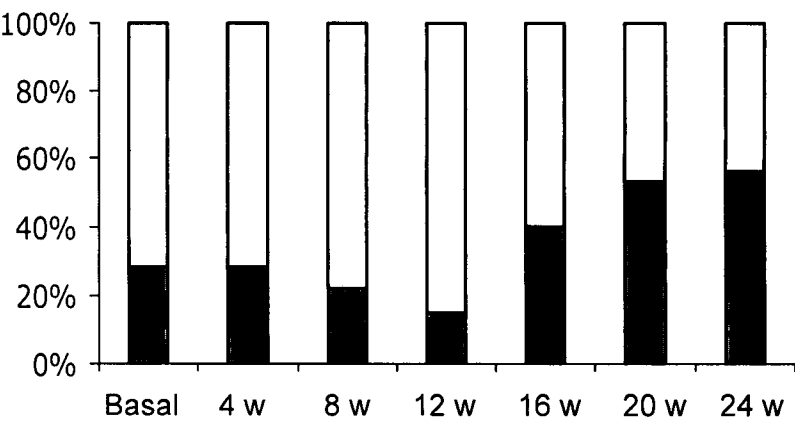


FIG. 5B



P1049PC00_ST25 SPANISH.TXT
LISTA DE SECUENCIAS

<110> CARINSA. Creaciones Aromáticas Industriales SA.

<120> Cepas de Lactobacillus plantarum como probióticos con efecto inmunomodulador específico

<130> P1049PC00

<150> EP 07121817.6

<151> 2007-11-29

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Eub27f, cebador directo para la amplificación del gen 16S

<400> 1
gagtttgatc ctggctcag 19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Eub1492r, cebador reverso para la amplificación del gen 16S

<400> 2
tacggytacc ttgttacgac tt 22

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo 27f para la secuenciación del gen 16S

<400> 3
agagtttgat cctggctcag 20

<210> 4

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador directo 357f para la secuenciación del gen 16S

<400> 4
cgccccgcgc gccccgcgcc cggccccgccg cccccgcccc cctacgggag gcagcag 57

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador reverso 907r para la secuenciación del gen 16S

<400> 5
ccgtcaattc ctttgagttt 20

<210> 6

<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> cebador reverso 1492r para la secuenciación del gen 16S

<400> 6
ggttaccttg ttacgactt

48

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DESTINATARIO

Compañías Agrícolas del Valles S.A.
CARINSA
P.O. Box 100, Echeburu C/J. C. Arriaga, Arumi 2
48940 S. Quinte del Valles (Barcelona)

RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO INICIAL
expedido en virtud de la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL
DE DEPÓSITO
identificada en la parte inferior de esta página

NOMBRE Y DIRECCIÓN
DEL DEPOSITANTE

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Etiqueta de identificación asignada
por el DEPOSITANTE:
Escherichia coli mantarion 1-47 CARINSA

Número de orden atribuido por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE
DEPÓSITO:
CECT 7316

II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN TAXONÓMICA PROPUESTA

Etiqueta que está identificado en Etiqueta acompañada:
Etiqueta de descripción científica

Etiqueta de designación taxonómica propuesta

Marque el círculo que corresponda:

III. RECEPCIÓN Y ACEPTACIÓN

La autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido
antes del 25 de Septiembre de 2007 (fecha del depósito inicial)

IV. RECEPCIÓN DE UNA PETICIÓN DE CONVERSIÓN

Esta autoridad internacional de depósito ha recibido el microorganismo identificado en I, el
(fecha de depósito inicial) y recibió una petición de conversión del depósito inicial en
deposición, conforme con el Tratado de Budapest en (fecha de recepción de la petición de
conversión)

V. AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Nombre:
COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO
(CECT)
Dirección:
Universidad de Valencia,
Facultad de Investigación,
Campus de Burjassot
46100 Burjassot (Valencia) ESPAÑA

Firma(s) de la(s) persona(s)
competente(s) para representar a la
autoridad internacional de depósito
o del (de los) empleado(s) autorizado(s)

Fecha: 12 de noviembre de 2007

La fecha de aplicación de la Regla 6.4d, esta será la fecha en la que haya sido adquirido el estatuto de
autoridad internacional de depósito.
Formulario BP 4 (página única)

1692S/IPD

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

I. DEPOSITARIO

Genios Arroyos del Valle S.A. (CARNSA)
Calle de la Libertad, C. 1 Cuatrecasas, Av. 100-2
80000 San Juan de los Rios, Barcelona

DECLARACION DE VIABILIDAD,
expedida en virtud de la Regla 10.2 por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPOSITO
identificada en la parte inferior de esta página

II. NOMBRE Y DIRECCION DE LA AGENCIA
NACIONAL DE PATENTES Y DE LA DECLARACION SOBRE
LA VIABILIDAD

1. DEPOSITANTE

Genios Arroyos del Valle S.A. (CARNSA)
Calle de la Libertad, C. 1 Cuatrecasas, Av. 100-2
80000 San Juan de los Rios, Barcelona

II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO

Numero de orden atribuido por la AUTORIDAD
INTERNACIONAL DEL DEPOSITO:

CECT 7316

Fecha del deposito o de la transferencia:

18 de Septiembre de 2007

DECLARACION DE VIABILIDAD

La viabilidad del microorganismo identificado en II ha sido controlada el 26 de Septiembre de 2007. En esa fecha el
microorganismo

es viable

es no viable

Desde la fecha del deposito inicial o, si se ha efectuado un nuevo deposito o una transferencia, la más reciente de
estas, es pertinente (fecha del nuevo deposito o fecha de la transferencia).

En los casos previstos en la Regla 10.2 a) y b) mencionese el control de viabilidad más reciente.

Marcar el cuadro correspondiente

... POSITIVAS QUE SE OBTUVIERAN ADOTAR CONTROL DE LA VIABILIDAD
... en los modelos de envasado y las temperaturas indicadas

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

... SE ANOTA DE LA ...

...
... de Valencia
... de Investigación
... de Burjassot
... de Burjassot (Valencia) ESPAÑA

Firma(s) de la(s) persona(s)
competente(s) para representar a la
autoridad internacional de depósito
o del (de los) emisor(es) autorizado(s)

Fecha: 19 de noviembre 2007

... cumplimentarse si se ha solicitado esta información y si los resultados del control fuesen negativos:

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL
PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

DESTINATARIO

Organismo Anmativas del Valles S.A
CARINSA
C/ J. L. Carles, 1 - 07100 C/ J. Cuatrecasas - Arta - 2
Baix Llobregat, del Valles (Barcelona)

RECIBO EN CASO DE DEPÓSITO INICIAL
expedido en virtud de la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL
DE DEPÓSITO
identificada en la parte inferior de esta página

NOMBRE Y DIRECCION
DEL DEPOSITANTE

IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO

Receptor de identificación asignd.
por el DEPOSITANTE
Escherichia coli F35 CARINSA

Número de orden atribuido por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE
DEPÓSITO
CECT 7315

II DESCRIPCION CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONÓMICA PROPUESTA

El microorganismo identificado en I venia acompañado:
de una descripción científica

de una designación taxonómica propuesta

(Marque lo que corresponda)

III RECEPCION Y ACEPTACION

Esta autoridad internacional de depósito acepta el microorganismo identificado en I, que ha recibido
el 18 de Septiembre de 2007 (fecha del depósito inicial)

IV RECEPCION DE UNA PETICION DE CONVERSION

Esta autoridad internacional de depósito ha recibido el microorganismo identificado en I, el
(fecha de depósito inicial) y recibió una petición de conversión del depósito inicial en
(fecha de recepción de la petición de conversión)

V AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

Nombre
COLECCIÓN ESPAÑOLA DE CULTIVOS TIPO
(CECT)
Dirección
Universidad de Valencia
Edificio de Investigación
Campus de Burjassot
46100 Burjassot (Valencia) ESPAÑA

Firma(s) de la(s) persona(s)
competente(s) para representar a la
autoridad internacional de depósito
o del (de los) empleado(s) autorizado(s)

Fecha: 12 de noviembre de 2007

(En caso de aplicación de la Regla 6.4d), esta será la fecha en la que haya sido adquirido el estatuto de
autoridad internacional de depósito.
Formulario BP/4 (página única)

1692S/IPD

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL
DE LOS DEPOSITOS DE MICROORGANISMOS A LOS FINES DEL
PROCESO DE INVENTOS EN MATERIA DE PATENTES

FORMULARIO INTERNACIONAL

I. DATOS GENERALES

Depositar: Aromatics del Valles, S.A. (CARINSA)
Punto de contacto: C/J. Cuatrecasas (Arom) 2
8300 San Roque del Valles (Barcelona)

DECLARACION DE VIABILIDAD,
expedida en virtud de la Regla 10.2 por la
AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO
identificada en la parte inferior de esta página

II. NOMBRE Y DIRECCION DE LA PARTE
ENCARGADA DE LA DECLARACION SOBRE
LA VIABILIDAD
I. DEPOSITANTE

Depositar: Aromatics del Valles, S.A. (CARINSA)
Punto de contacto: C/J. Cuatrecasas (Arom) 2
8300 San Roque del Valles (Barcelona)

II. IDENTIFICACION DEL MICROORGANISMO

Número de orden atribuido por la AUTORIDAD
INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:

CECT 7315

Fecha del depósito o de la transferencia¹:

18 de Septiembre de 2007

III. DECLARACION DE VIABILIDAD

La muestra del microorganismo identificado en I ha sido controlada el 26 de Septiembre de 2007². En esa fecha el
microorganismo:

es viable

no es viable

En caso de que la fecha del depósito inicial no sea la más reciente de un nuevo depósito o una transferencia, la más reciente de
estos últimos (fecha del nuevo depósito o fecha de la transferencia).

En los casos previstos en la Regla 10.2 a) y iii), menciónese el control de viabilidad más reciente.

Menciónese el resultado correspondiente

CONDICIONES EN LAS QUE SE HA EFECTUADO EL CONTROL DE LA VIABILIDAD*
Cultivos en 261 medios de cultivo adecuados a las temperaturas indicadas.

AUTORIDAD INTERNACIONAL DE DEPÓSITO

CONSEJO ESPAÑOL DE CÉLULAS Y PRO
Instituto de Investigación
Cajal de Investigación
Cajal de Investigación
46100 Burjassot (Valencia) ESPAÑA

Firma(s) de las persona(s)
competente(s) para presentar a la
autoridad internacional de depósito
o del (de los) empleado(s) autorizado(s)

Fecha: 12 de febrero de 2007

Declaro cumplimentarse si se ha solicitado esta información y si los resultados del control fuesen negativos.

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: Name (LAST, First)	in relation to this international application CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(i)		CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. is entitled as employer of the inventor, MARTÍNEZ CHAMORRO, Vanesa
VIII-2-1(i)		CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. is entitled as employer of the inventor, LÓPEZ GONZÁLEZ, Quiro
VIII-2-1(ii)		an agreement between CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. and GASULL, Miquel Àngel, dated 15 February 2007 (15.02.2007)
VIII-2-1(ii)		an agreement between CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. and CUNÉ CASTELLANA, Jordi, dated 15 February 2007 (15.02.2007)
VIII-2-1(ii)		an agreement between CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. and ESPADALER MAZO, Jordi, dated 15 February 2007 (15.02.2007)
VIII-2-1(ii)		an agreement between CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. and CABRÉ GELADA, Eduard, dated 15 February 2007 (15.02.2007)
VIII-2-1(ii)		an agreement between CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. and MAÑÉ ALMERO, Josep, dated 15 February 2007 (15.02.2007)
VIII-2-1(ii)		an agreement between CARINSA. CREACIONES AROMÁTICAS INDUSTRIALES, S. A. and CALVO TORRAS, Maria de los Ángeles, dated 15 February 2007 (15.02.2007)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-077940- -00000-0000

Fecha: 2010-06-28 17:12:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 54



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
☐	Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
☐	Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
☐	Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
☐	Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
CARINSA CREACIONES AROMATICAS INDUSTRIALES S.A

REFERENCIA	Radicación No.	10 077940
	Solicitud internacional	PCT/EP2008/065950
	Fecha inicio fase nacional	29/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 10342

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...

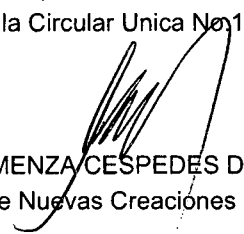


Continuación radicado No: 10 077940

56


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

13 AGO. 2010