

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21 EXPEDIENTE N°

03-66821

54 TÍTULO

"ELABORACION DE EMULSIONES POR BACTERIA Y BIFIDOBACTERIA DE ACIDO LACTICO"

61 CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K 35/74 , C12N 4/20

71 SOLICITANTE

SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S A

DOMICILIO

VEVEY, SUIZA

74 REPRESENTANTE LEGAL

JOSE ANTONIO LLORCA

T P 10 784

Código 231

22 BOGOTA, D C

5 AGO 2003

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



03 066821 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 03066821 00000000 Folios: 80
Fecha (AND): 2002-08-05 16:09:37
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2029 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

①

SOLICITUD DE:



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

②

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **SOCIETE DES PRODUITS
NESTLÉ S.A.**
Dirección: P.O. Box 353, CH-1800 Vevey
Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Vevey, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **JOSE ANTONIO LLOREDA**
Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 17.159.681 TP 10.784

④

**INVENTOR(ES)
(72)**

Nombre: **SCHIFFRIN, Eduardo y KOCIUBINSKI, Guillermo.**Dirección: Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023 Crissler y 34 Fairview St. Apt C8,
West Hartford, CT 06119.

Nacionalidad o Domicilio: Suiza y Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP02/01163Fecha: 01/02/02Publicación Internacional No. WO 02/062360 A1Fecha: 15/08/02

⑥

**Título (54) "ENLACE DE ENDOTOXINA POR BACTERIA Y BIFIDOBACTERIA DE ACIDO
LACTICO"**

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 35/74; C12N 1/20

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

(32) Fecha

06/02/01

(31) Número de Solicitud

01200436.2

⑨

Comprobante de Pago No. 03-45,599Fecha: Julio 2 de 2003

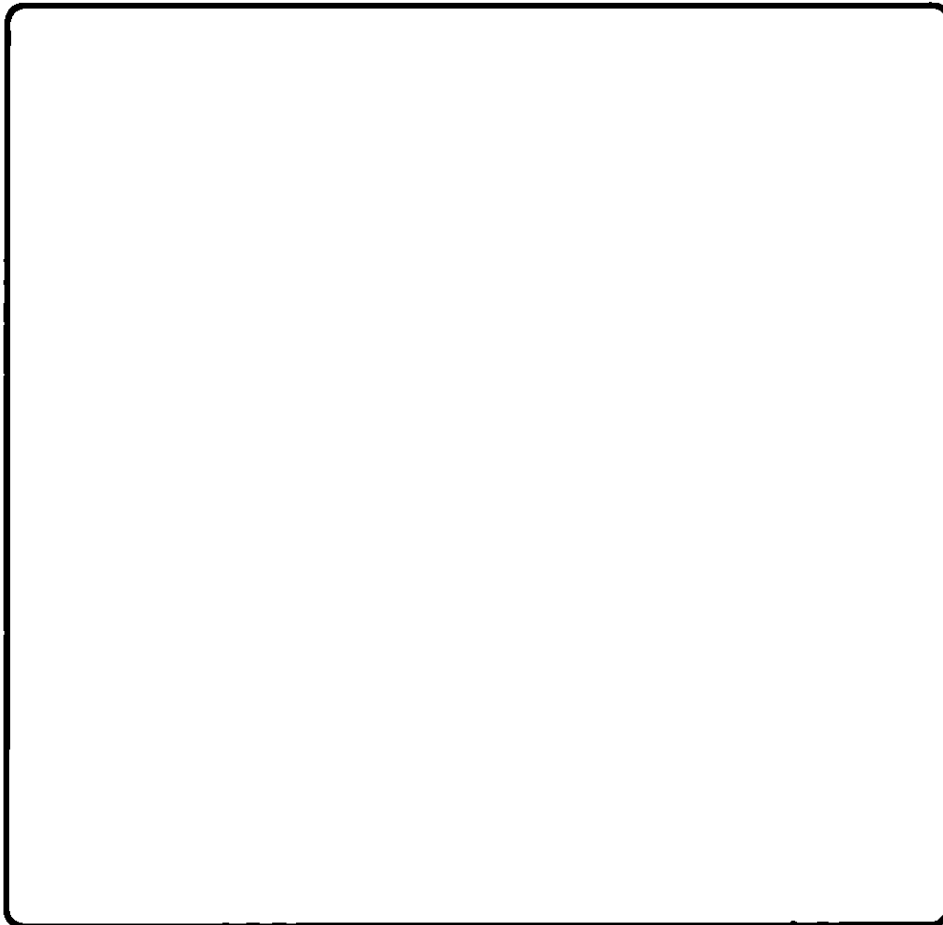
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal. Protocolizado bajo el número 11.145.
- ☐ Documento de cesión del Inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ 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 del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ 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, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción y Recibos de Depósito de Microorganismos con su traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JOSE ANTONIO LÓPEZ

FIRMA:

C.C. 17.159.681 Bg. T.P. 10.784

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 03066821 00000000 Folios: 00
Fecha (HR): 2003-06-05 16:09:37
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 45,599
FECHA : JULIO 2 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	13458901	02/07/2003	17,0 ,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 30005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	\$ 400,000.00

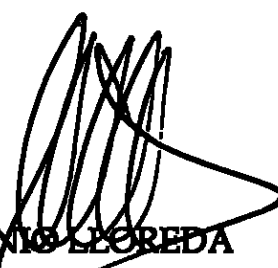
SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE ANTONIO LLOREDA y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 11.145. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. No. 10.784

Código 231

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
 PCT/EP 02/01163

85

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Octubre 1999 (1999-10) OCANA VIRGINIA S ET AL: "Características de superficie de lactobacilos aislados de vagina humana" No. de acceso a la base de datos PREV200000199558 XP002174987 resumen & JOURNAL OF GENERAL AND APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 45, no. 5, Octubre 1999 (1999-10), páginas 203-212, ISSN: 0022-1260	
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Enero 1998 (1998-01) PEREZ PABLO F ET AL: "Propiedades de superficie de cadenas bifidobacteriales de origen humano" No. de acceso a la base de datos PREV199800098644 XP002174988 resumen & APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 1, Enero 1998 (1998-01), páginas 21-26, ISSN: 0099-2240	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 02/01163

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes			Fecha de publicación
US 5413785 A	09-05-1995	NINGUNO			
EP 0555618 A	18-08-1993	IT	1254210 B		14-09-1995
		DE	69226622 D1		17-09-1998
		DE	69226622 T2		11-02-1999
		DK	555618 T3		17-05-1999
		EP	0555618 A2		18-08-1993
		ES	2120440 T3		01-11-1998
		JP	6056680 A		01-03-1994
		US	5716615 A		10-02-1998
WO 9959413 A	25-11-1999	US	2001014322 A1		16-08-2001
		AU	3995699 A		06-12-1999
		WO	9959413 A1		25-11-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 02/01163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/74 A61P31/00 C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, FSTA, MEDLINE, PASCAL, LIFESCIENCES, CHEM
ABS Data, CAB Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 413 785 A (NANJI AMIN A) 9 May 1995 (1995-05-09) column 6, line 26 -column 20, line 33	1-16
X	EP 0 555 618 A (CAVALIERE VESELY RENATA MARIA ;SIMONE CLAUDIO DE (IT)) 18 August 1993 (1993-08-18) page 2, line 24 -page 3, line 47	1-16
A	WO 99 59413 A (CHEN BINHUA ;YAO YIGIANG (CN); SHANGHAI SINE PHARMACEUTICAL C (CN)) 25 November 1999 (1999-11-25) -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- 'A' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2002

Date of mailing of the international search report

21/06/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/01163

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; October 1999 (1999-10) OCANA VIRGINIA S ET AL: "Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina." Database accession no. PREV200000199558 XP002174987 abstract & JOURNAL OF GENERAL AND APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 45, no. 5, October 1999 (1999-10), pages 203-212, ISSN: 0022-1260 ----	
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; January 1998 (1998-01) PEREZ PABLO F ET AL: "Surface properties of bifidobacterial strains of human origin." Database accession no. PREV199800098644 XP002174988 abstract & APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 1, January 1998 (1998-01), pages 21-26, ISSN: 0099-2240 -----	

INTERNATI NAL SEARCH REP RT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/01163

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5413785	A	09-05-1995	NONE	
EP 0555618	A	18-08-1993	IT 1254210 B DE 69226622 D1 DE 69226622 T2 DK 555618 T3 EP 0555618 A2 ES 2120440 T3 JP 6056680 A US 5716615 A	14-09-1995 17-09-1998 11-02-1999 17-05-1999 18-08-1993 01-11-1998 01-03-1994 10-02-1998
WO 9959413	A	25-11-1999	US 2001014322 A1 AU 3995699 A WO 9959413 A1	16-08-2001 06-12-1999 25-11-1999

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

15 de Agosto de 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional

WO 02/062360 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61P 31/00, C12N 1/20

A61K 35/74,

(84) Estados Designados (regional): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP02/01163

(22) Fecha de Registro Internacional: Febrero 1 de 2002
(01.02.2002)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
01200436.2 Febrero 6 de 2001 (06.02.2001) EP

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos): SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos solamente): SCHIFFRIN, Eduardo [CH/CH]; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023 Crissier (CH). KOCIUBINSKI, Guillermo [AR/US]; 34 Fairview St. Apt C8, West Hartford, CT 06119 (US).

(74) Representante Común: CHAUTARD, Cécile; Société des Produits Nestlé S.A., P.O. Box 353, CH-1800 Vevey (CH).

(81) Estados Designados (nacional): AU, BR, CA, CN, CO, CR, CZ, DM, EC, HU, ID, IL, IN, JP, KR, LK, MA, MX, NO, NZ, PH, PL, SG, TN, US, VN, ZA.

Declaraciones según la Regla 4.17:

- relativa al derecho del solicitante de solicitar y obtener una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes designaciones AU, BR, CA, CN, CO, CR, CZ, DM, EC, HU, ID, IL, IN, JP, KR, LK, MA, MX, NO, NZ, PH, PL, SG, TN, VN, ZA, patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- relativa al derecho del solicitante de reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii)) para las siguientes designaciones AU, BR, CA, CN, CO, CR, CZ, DM, EC, HU, ID, IL, IN, JP, KR, LK, MA, MX, NO, NZ, PH, PL, SG, TN, VN, ZA, patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- relativa a la calidad de inventor (Regla 4.17(iv)) para Estados Unidos únicamente

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional
- antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: ENDOTOXINA ENLAZADA POR BACTERIA DEL ACIDO LACTICO Y BIFIDOBACTERIA

(57) Resumen: La invención se refiere al uso de al menos una cadena de bacteria de ácido láctico y/o bifidobacteria que tiene propiedades de superficie hidrofóbicas, para la preparación de una composición destinada a la prevención o el tratamiento de desordenes asociados y/o mediados por endotoxina y composiciones alimenticias para humanos o mascotas preparadas de la misma.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/062360 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 35/74,
A61P 31/00, C12N 1/20

European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) International Application Number: PCT/EP02/01163 /

(22) International Filing Date: 1 February 2002 (01.02.2002)

Declarations under Rule 4.17:

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01200436.2 6 February 2001 (06.02.2001) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SOCI-
ETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; P.O. Box
353, CH-1800 Vevey (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCHIFFRIN,
Eduardo [CH/CH]; Chemin de Riant-Mont 17, CH-1023
Crissier (CH). KOCIUBINSKI, Guillermo [AR/US]; 34
Fairview St. Apt C8, West Hartford, CT 06119 (US).

(74) Common Representative: CHAUTARD, Cécile; Société
des Produits Nestlé S.A., P.O. Box 353, CH-1800 Vevey
(CH).

(81) Designated States (national): AU, BR, CA, CN, ~~CO~~, CR,
CZ, DM, EC, HU, ID, IL, IN, JP, KR, LK, MA, MX, NO,
NZ, PH, PL, SG, TN, US, VN, ZA.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted
a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AU,
BR, CA, CN, CO, CR, CZ, DM, EC, HU, ID, IL, IN, JP, KR,
LK, MA, MX, NO, NZ, PH, PL, SG, TN, VN, ZA, ARIPO
patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI
patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii)) for the following desig-
nations AU, BR, CA, CN, CO, CR, CZ, DM, EC, HU, ID,
IL, IN, JP, KR, LK, MA, MX, NO, NZ, PH, PL, SG, TN, VN,
ZA, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG)

— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: ENDOTOXIN BINDING BY LACTIC ACID BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA

(57) Abstract: The invention relates to the use of at least one strain of lactic acid bacteria and/or bifidobacteria having hydrophobic surface properties, for the preparation of a composition intended for the prevention or the treatment of endotoxin mediated and/or associated disorders and human or pet food compositions prepared thereof.

WO 02/062360 A1

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL**

REIVINDICACIONES

1. El uso de al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades superficiales hidrofóbicas, para la preparación de una composición diseñada para la prevención o el tratamiento de trastornos mediados y/o asociados con endotoxina.

2. El uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde la bacteria o bifidobacteria de ácido láctico tiene una hidrofobicidad porcentual (%H) de al menos 80, y más preferentemente de 85 hasta 100%.

3. El uso de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, en donde la bacteria y bifidobacteria de ácido láctico tiene la habilidad de enlazarse a endotoxinas, o coagregarse con bacteria gram negativa.

4. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cepa de bacteria o de bifidobacteria de ácido láctico se selecciona del grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*,

AF
14

Bifidobacterium pseudolongum, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

5 El uso de conformidad con cualquiera de
5 las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cepa es NCC
2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I 2623), NCC
189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2333), NCC 235
de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2335), NCC 251 de
Bifidobacterium adolescentis (CNCM-I-2168),
10 *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).

6 El uso de conformidad con cualquiera de
las reivindicaciones 1 a 5, en donde la bacteria de
ácido láctico se utiliza de modo que la cantidad
15 disponible para el individuo es de aproximadamente
 10^3 - 10^{14} ufc/día.

7 Una cepa aislada de bacteria o
bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades
20 superficiales hidrofóbicas, que ha sido seleccionada
por su habilidad para enlazarse a endotoxinas o
coagregarse con bacteria gram negativa.

8 Una cepa de conformidad con la
25 reivindicación 7, en donde la bacteria o
bifidobacteria de ácido láctico se enlaza al menos a
30% de endotoxina de soluciones, en donde las
concentraciones son similares al contenido intestinal
de endotoxina.

18
15

9. Una cepa de conformidad con la reivindicación 7 u 8, seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

10. Una cepa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, la cual es NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I 2623), NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2333), NCC 235 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2335), NCC 251 de *Bifidobacterium adolescentis* (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).

11. Una composición alimenticia para humanos o para mascotas que contiene al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

12. Una composición de conformidad con la reivindicación 11, en donde la cepa se utiliza en su forma viable o inactivada.

17
16

13. Una composición de conformidad con la reivindicación 11 ó 12, en donde la cepa de bacteria de ácido láctico se seleccionadle grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*,
5 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*,
Lactobacillus ruminis, *Lactobacillus acidophilus*,
Lactobacillus rahmnosus, *Lactobacillus fermentum*,
Lactobacillus delbrueckii subs. *lactis*,
Bifidobacterium spp., *Bifidobacterium bifidum*,
10 *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*,
Bifidobacterium infantis, *Bifidobacterium adolescentis*.

14. Una composición de conformidad con
15 cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la cepa es NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I 2623), NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2333), NCC 235 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2335), NCC 251 de *Bifidobacterium*
20 *adolescentis* (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).

15. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde
25 la cantidad de cepa de bacteria de ácido láctico disponible para el individuo corresponde a aproximadamente 10^3 - 10^{14} ufc por día.

16. Una composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, la cual reduce, previene o trata trastornos asociados y/o mediados con endotoxina.

21
18**Claims**

1. The use of at least one strain of lactic acid bacteria and/or bifidobacteria having hydrophobic surface properties, for the preparation of a composition intended for the prevention or the treatment of endotoxin mediated and/or associated disorders.
2. The use according to claim 1, wherein the lactic acid bacteria or bifidobacteria has a percent hydrophobicity (%H) of at least 80, and more preferably from 85 to 100%.
3. The use according to claim 1 or 2, wherein the lactic acid bacteria and bifidobacteria has the ability to bind endotoxins, or co-aggregate with gram-negative bacteria.
4. The use according to any of claims 1 to 3, wherein the lactic acid bacteria strain or bifidobacteria is selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.
5. The use according to any of claims 1 to 4, wherein the strain is *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM-I 2623), *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (CNCM-I-2333), *Bifidobacterium bifidum* NCC 235 (CNCM-I-2335), *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).
6. The use according to any of claims 1 to 5, wherein the lactic acid bacteria is used so that the amount available for the individual is of about 10^3 - 10^{14} cfu per day.
7. An isolated strain of lactic acid bacteria or bifidobacteria having hydrophobic surface properties, that has been selected for its ability to bind endotoxins or co-aggregate with gram-negative bacteria.

8. A strain according to claim 7, wherein the lactic acid bacteria or bifidobacteria binds at least 30 % of endotoxin from solutions where the concentrations are similar to the intestinal content of endotoxin.

5

9. A strain according to claim 7 or 8, selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

10

10. A strain according to any of claims 7 to 9, which is *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM-I 2623), *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (CNCM-I-2333), *Bifidobacterium bifidum* NCC 235 (CNCM-I-2335), *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).

15

11. A human or pet food composition containing at least one strain of lactic bacteria and/or Bifidobacteria according to one of claims 7 to 10, associated with an ingestible support or a pharmaceutical matrix.

20

12. A composition according to claim 11, wherein the strain is used in its viable or inactivated form.

25

13. A composition according to claim 11 or 12, wherein the lactic acid bacteria strain is selected from the group consisting of *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

30

73
20

14. A composition according to any of claims 11 to 13, wherein the strain is *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM-I 2623), *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (CNCM-I-2333), *Bifidobacterium bifidum* NCC 235 (CNCM-I-2335), *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).

15. A composition according to any of claims 11 to 14, wherein the amount of lactic acid bacteria strain available for the individual is corresponding to about 10^3 - 10^{14} cfu per day.

10

16. A composition according to any of claims 11 to 15, which reduces, prevents or treats endotoxin mediated and/or associated disorders

24
21

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

(Reporte Racionalizado de acuerdo con la Noticia del Presidente de la EPO publicada en el OJ11/2001)

Registro de referencia del solicitante o agente NO 6368/WO	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA416)	
Solicitud Internacional No. PCT/EP 02/01163	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 01/02/2002	Fecha de prioridad (día/mes/año) 06/02/2001
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC A61K35/74		
Solicitante SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. et al.		

1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>2</u> hojas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de <u> </u> hojas.	
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del Reporte II ☐ Prioridad III ☐ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. IV ☐ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación. VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la demanda 30/08/2002	Fecha de terminación de este reporte 11/12/2002
Nombre y dirección de correo de la IPEA/ European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Funcionario autorizado MEYLAERTS H Tel. (+49-89) 2399 2828

25
22

I. Bases del reporte

La base de este examen preliminar internacional es la solicitud como fue presentada originalmente.

V. Declaración razonada según la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

A la luz de los documentos citados en el reporte de búsqueda internacional, se considera que la invención según lo definido en por lo menos algunas de las reivindicaciones no parece cumplir con los criterios mencionados en el Artículo 33(1) del PCT, esto es, no parece ser novedosa y/o involucrar un nivel inventivo (ver reporte de búsqueda internacional, en particular los documentos citados X y/o Y y las referencias correspondientes de la reivindicación).

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

(Rationalised Report according to the Notice of the President of the EPO published in the OJ11/2001)

Applicant's or agent's file reference NO 6368/WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP 02/ 01163	International filing date (day/month/year) 01/02/2002	Priority date (day/month/year) 06/02/2001
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K35/74		
Applicant SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. et al.		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u> 2 </u> sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consists of a total of <u> </u> sheets.
3.	This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the report II ☐ Priority III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 30/08/2002	Date of completion of this report 11/12/2002
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Authorized officer MEYLAERTS H Tel. (+49-89) 2399 2828



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No PCT/EP 02/01163

27
28

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
RELACIONADO CON EL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULA INTERNACIONAL

DESTINATARIO:

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents Department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECIBO EN CASO DE DEPOSITO INICIAL

Expedido en virtud de la norma 7.1 por la AUTORIDAD
DE DEPOSITO INTERNACIONAL identificada al final de
este formulario.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICRO-ORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: NCC 251	Número de Orden atribuido por AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL: I - 2168
II. DESCRIPCIÓN CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo el inciso I está acompañado: ☒ de una descripción científica ☒ de una designación taxonómica propuesta (Señalar el que se aplique).	
III. RECEPCION Y ACEPTACIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional acepta el microorganismo identificado bajo el inciso I el cual recibió el día 15 de Marzo 1999 (fecha del depósito inicial) ¹	
IV. RECEPCION DE UNA SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional recibió el microorganismo identificado bajo el inciso I, el (fecha del depósito inicial) y recibió una solicitud de conversión del depósito inicial en depósito conforme al tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL	
Nombre: CNCM Collection Nationale De Cultures de Microorganismos Dirección : INSTITUT PASTEUR 28, Rue Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Firma de la persona competente para representar a la autoridad de depósito internacional o del empleado autorizado: FIRMADO: Simona OZDEN Director de la CNCM. Fecha: Paris 10 de Agosto, 1999

¹ En caso de aplicación de la norma 8.4.d), esta fecha se considera la fecha en la cual se adquirió el estatuto de autoridad de depósito internacional. Formulario: BP/4 (Página única).

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE

29
26

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.
Patents department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

NOM ET ADRESSE
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT : NCC 251	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : I - 2168
II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné : ☐ d'une description scientifique ☐ d'une désignation taxonomique proposée (Cocher ce qui convient)	
III. RECEPTION ET ACCEPTATION	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 15 MARS 1989 (date du dépôt initial) ¹	
IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE	
Nom : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Adresse : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Simona OZDEN Directeur de la CNCM  Date : Paris, le 10 août 1989

¹ En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

Formula BP/4 (page unique)

30
LA

TRADUCCION OFICIAL NO. 445/2003-.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
RELACIONADO CON EL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULA INTERNACIONAL

DESTINATARIO:

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents Department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECIBO EN CASO DE DEPOSITO INICIAL

Expedido en virtud de la norma 7.1 por la AUTORIDAD
DE DEPOSITO INTERNACIONAL identificada al final de
este formulario.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICRO-ORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: NCC 189	Número de Orden atribuido por AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL: I - 2333
II. DESCRIPCIÓN CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo el inciso I está acompañado: ☐ de una descripción científica ☐ de una designación taxonómica propuesta (Señalar el que se aplique).	
III. RECEPCION Y ACEPTACIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional acepta el microorganismo identificado bajo el inciso I el cual recibió el día 12 de Octubre 1999 (fecha del depósito inicial) ¹	
IV. RECEPCION DE UNA SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional recibió el microorganismo identificado bajo el inciso I, el (fecha del depósito inicial) y recibió una solicitud de conversión del depósito inicial en depósito conforme al tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL	
Nombre: CNCM Collection Nationale De Cultures de Microorganismes Dirección : INSTITUT PASTEUR 28, Rue Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Firma de la persona competente para representar a la autoridad de depósito internacional o del empleado autorizado: FIRMADO: Simona OZDEN Director de la CNCM. Fecha: Paris, 30 de Noviembre 1999

¹ En caso de aplicación de la norma 6.4.d), esta fecha se considera la fecha en la cual se adquirió el estatuto de autoridad de depósito internacional.

Formulario: BP/4 (Página única).

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents department
Avenue Nestlé 85
CH-1800 Vevey

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT : NCC 189	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : I - 2333
II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :	
☒ d'une description scientifique	
☐ d'une désignation taxonomique proposée	
(Cocher ce qui convient)	
III. RECEPTION ET ACCEPTATION	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 12 OCTOBRE 1989 (date du dépôt initial) ¹	
IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE	
Nom : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Simone OZDEN Directeur de la CNCM 
Adresse : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Date : Paris, le 30 novembre 1989

¹ En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

Formule BP/4 (page unique)

37
29

TRADUCCION OFICIAL NO. 445/2003-.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
RELACIONADO CON EL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULA INTERNACIONAL

DESTINATARIO:

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents Department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECIBO EN CASO DE DEPOSITO INICIAL

Expedido en virtud de la norma 7.1 por la AUTORIDAD
DE DEPOSITO INTERNACIONAL identificada al final de
este formulario.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICRO-ORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: NCC 200	Número de Orden atribuido por AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL: I - 2334
II. DESCRIPCIÓN CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo el inciso I está acompañado: ☒ de una descripción científica ☒ de una designación taxonómica propuesta (Señalar el que se aplique).	
III. RECEPCION Y ACEPTACIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional acepta el microorganismo identificado bajo el inciso I el cual recibió el día 12 de Octubre 1999 (fecha del depósito inicial) ¹	
IV. RECEPCION DE UNA SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional recibió el microorganismo identificado bajo el inciso I, el (fecha del depósito inicial) y recibió una solicitud de conversión del depósito inicial en depósito conforme al tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL	
Nombre: CNCM Collection Nationale De Cultures de Microorganismos Dirección : INSTITUT PASTEUR 28, Rue Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Firma de la persona competente para representar a la autoridad de depósito internacional o del empleado autorizado: FIRMADO: Simona OZDEN Director de la CNCM. Fecha: Paris, 30 de Noviembre 1999

¹ En caso de aplicación de la norma 6.4.d), esta fecha se considera la fecha en la cual se adquirió el estatuto de autoridad de depósito internacional.
Formulario: BP/4 (Página única).

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE

30

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT : NCC 200	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : I - 2334
II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné : ☒ d'une description scientifique ☐ d'une désignation taxonomique proposée (Cocher ce qui convient)	
III. RECEPTION ET ACCEPTATION	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 12 OCTOBRE 1999 (date du dépôt initial) ¹	
IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le _____ (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le _____ (date de réception de la requête en conversion)	
V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE	
Nom : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Adresse : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Simone OZDEN Directeur de la CNCM Date : Paris, le 30 novembre 1999

¹ En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

31

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
RELACIONADO CON EL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULA INTERNACIONAL

DESTINATARIO:

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents Department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECIBO EN CASO DE DEPOSITO INICIAL

Expedido en virtud de la norma 7.1 por la AUTORIDAD
DE DEPOSITO INTERNACIONAL identificada al final de
este formulario.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICRO-ORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: NCC 235	Número de Orden atribuido por AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL: I - 2335
II. DESCRIPCIÓN CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo el inciso I está acompañado: ☒ de una descripción científica ☒ de una designación taxonómica propuesta (Señalar el que se aplique).	
III. RECEPCION Y ACEPTACIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional acepta el microorganismo identificado bajo el inciso I el cual recibió el día 12 de Octubre 1999 (fecha del depósito inicial) ¹	
IV. RECEPCION DE UNA SOLICITUD DE CONVERSIÓN	
La presente autoridad de depósito internacional recibió el microorganismo identificado bajo el inciso I, el (fecha del depósito inicial) y recibió una solicitud de conversión del depósito inicial en depósito conforme al tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL	
Nombre: CNCM Collection Nationale De Cultures de Microorganismos Dirección : INSTITUT PASTEUR 28, Rue Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Firma de la persona competente para representar a la autoridad de depósito internacional o del empleado autorizado: FIRMADO: Simona OZDEN Director de la CNCM. Fecha: Paris, 30 de Noviembre 1999

¹ En caso de aplicación de la norma 6.4.d), esta fecha se considera la fecha en la cual se adquirió el estatuto de autoridad de depósito internacional.
Formulario: BP/4 (Página única).

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE

35
32

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX FINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

NOM ET ADRESSE
DU DEPOSANT

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME	
Référence d'identification donnée par le DEPOSANT : NCC 235	Numéro d'ordre attribué par l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE : I - 2335
II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE	
Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné : ☒ d'une description scientifique ☐ d'une désignation taxonomique proposée (Cocher ce qui convient)	
III. RECEPTION ET ACCEPTATION	
La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous chiffre I, qu'elle a reçu le 12 OCTOBRE 1999 (date du dépôt initial) ¹	
IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION	
La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous chiffre I le (date du dépôt initial) et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de Budapest le (date de réception de la requête en conversion)	
V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE	
Nom : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Adresse : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) de la (des) personne(s) compétente(s) pour représenter l'autorité de dépôt internationale ou de l'(des) employé(s) autorisé(s) : Simon OZEN Directeur de la CNCM  Date : Paris, le 30 novembre 1999

¹ En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

Formule BP/4 (page unique)

36
33

TRADUCCION OFICIAL NO. 445/2003-.

TRATADO DE BUDAPEST SOBRE RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPOSITO DE MICROORGANISMOS
RELACIONADO CON EL PROCEDIMIENTO EN MATERIA DE PATENTES

FORMULA INTERNACIONAL

DESTINATARIO:

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents Department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECIBO EN CASO DE DEPOSITO INICIAL

Expedido en virtud de la norma 7.1 por la AUTORIDAD
DE DEPOSITO INTERNACIONAL identificada al final de
este formulario.

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICRO-ORGANISMO	
Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: NCC2483	Número de Orden atribuido por AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL: I - 2823
II. DESCRIPCIÓN CIENTIFICA Y/O DESIGNACION TAXONOMICA PROPUESTA	
El microorganismo identificado bajo el inciso I está acompañado: ☐ de una descripción científica ☐ de una designación taxonómica propuesta (Señalar el que se aplique).	
III. RECEPCION Y ACEPTACION	
La presente autoridad de depósito internacional acepta el microorganismo identificado bajo el inciso I el cual recibió el día 2 de Febrero 2001 (fecha del depósito inicial) ¹	
IV. RECEPCION DE UNA SOLICITUD DE CONVERSION	
La presente autoridad de depósito internacional recibió el microorganismo identificado bajo el inciso I, el (fecha del depósito inicial) y recibió una solicitud de conversión del depósito inicial en depósito conforme al tratado de Budapest el (fecha de recepción de la solicitud de conversión).	
V. AUTORIDAD DE DEPOSITO INTERNACIONAL	
Nombre: CNCM Collection Nationale De Cultures de Microorganismes Dirección : INSTITUT PASTEUR 28, Rue Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Firma de la persona competente para representar a la autoridad de depósito internacional o del empleado autorizado: FIRMADO: Georges WAGENER. Fecha: París 2 de Marzo, 2001

¹ En caso de aplicación de la norma 6.4.d), esta fecha se considera la fecha en la cual se adquirió el estatuto de autoridad de depósito internacional. Formulario: BP/4 (Página única).

LA TRADUCTORA OFICIAL

HELENA URIBE DE LEMOINE

37
34

TRAITE DE BUDAPEST SUR LA RECONNAISSANCE
INTERNATIONALE DU DEPOT DES MICRO-ORGANISMES
AUX VINS DE LA PROCEDURE EN MATIERE DE BREVETS

FORMULE INTERNATIONALE

DESTINATAIRE :

Société des Produits Nestlé S.A.
Patents Department
Avenue Nestlé 55
CH-1800 Vevey

RECEPISSE EN CAS DE DEPOT INITIAL,
délivré en vertu de la règle 7.1 par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE
identifiée au bas de cette page

**NOM ET ADRESSE
DU DEPOSANT**

I. IDENTIFICATION DU MICRO-ORGANISME

Référence d'identification donnée par le
DEPOSANT :

NCC2483

Numéro d'ordre attribué par
l'AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE :

I - 2623

II. DESCRIPTION SCIENTIFIQUE ET/OU DESIGNATION TAXONOMIQUE PROPOSEE

Le micro-organisme identifié sous chiffre I était accompagné :



d'une description scientifique



d'une désignation taxonomique proposée

(Cocher ce qui convient)

III. RECEPTION ET ACCEPTATION

La présente autorité de dépôt internationale accepte le micro-organisme identifié sous
chiffre I, qu'elle a reçu le **02 février 2001** (date du dépôt initial)¹

IV. RECEPTION D'UNE REQUETE EN CONVERSION

La présente autorité de dépôt internationale a reçu le micro-organisme identifié sous
chiffre I le (date du dépôt initial)
et a reçu une requête en conversion du dépôt initial en dépôt conforme au Traité de
Budapest le (date de réception de la requête en conversion)

V. AUTORITE DE DEPOT INTERNATIONALE

Nom :

CNCM

Collection Nationale
de Cultures de Microorganismes

Adresse :

INSTITUT PASTEUR
28, Rue du Docteur Roux
F-75724 PARIS CEDEX 15

Signature(s) de la (des) personne(s)
compétente(s) pour représenter l'autorité
de dépôt internationale ou de l'(des)
employé(s) autorisé(s) : **Georges WAGENER**

Date : **Paris, le 02 mars 2001**

¹ En cas d'application de la règle 6.4.d), cette date est la date à laquelle le statut
d'autorité de dépôt internationale a été acquis.

**ENLACE DE ENDOTOXINA POR BACTERIA Y BIFIDOBACTERIA DE
ÁCIDO LÁCTICO**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La invención se refiere al uso de al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades superficiales hidrofóbicas, para la preparación de una composición
10 diseñada para la prevención o el tratamiento de trastornos mediados y/o asociados con endotoxina y a las composiciones alimenticias para humanos o para mascotas, preparadas a partir de las mismas.

15

20

25

30

37
36

ENLACE DE ENDOTOXINA POR BACTERIA Y BIFIDOBACTERIA DE ÁCIDO LÁCTICO

La presente invención se refiere al uso de
5 bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que son
hidrofóbicas para la preparación de una composición
alimenticia diseñada para la prevención o el
tratamiento de desórdenes mediados y/o asociados con
endotoxina. La invención también se refiere a la
10 composición preparada a partir de éstas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha encontrado que las toxinas que inducen
15 sepsis están asociadas con bacterias, virus, plantas,
patógenos y veneno. Entre las toxinas bacterianas
bien descritas están las endotoxinas o
lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram
negativas. Estas moléculas son glucolípidos que son
20 ubicuos en la membrana exterior de todas las
bacterias gram negativas, las cuales se cree son
responsables de la sepsis gram negativa. Este tipo
de sepsis es una condición extremadamente común y
frecuentemente es fatal.

25 Han sido intentados diversos procedimientos
para el tratamiento de sepsis. Éstos incluyen el uso
de anticuerpos para LPS, el uso de anticuerpos para
el factor de necrosis tumoral, el uso de un receptor
soluble de TNF, el uso de un receptor de interleucina
30 1 soluble (IL-1), por nombrar unos pocos. Mientras

que cada procedimiento tiene algo de eficacia, los resultados totales han sido frustrantes.

Otros se han intentado para diseñar y estudiar proteínas que se enlacen a LPS/endotoxinas, y los reportes ilustrativos de estos intentos aparecen en Rustici, A. et al. Science (1993) 259:361-364; Matsuzaki, K. et al. Biochemistry (1993) 32:11704-11710; Hoess, A. et al. EMBO J (1993) 12:3351-3356; y Elsbach, P. et al. Current Opinion in Immunology (1993) 5:103-107. De hecho, después de la introducción de LPS en la sangre, éste puede enlazarse a una proteína denominada proteína de enlace a lipopolisacárido (LBP). La inhibición de LBP, por ejemplo, con un anticuerpo anti-LBP, ha sido sugerida como terapéuticamente útil para el tratamiento de sepsis mediada por endotoxina (Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US90/04250, presentada el 30 de Julio de 1990). También, el trabajo de varios laboratorios ha mostrado que las lipoproteínas plasmáticas, particularmente lipoproteínas de alta densidad (HDL), enlazan y neutralizan LPS (Skarnes et al., 1968, J. Bacteriology 95:2031; Flegel et al., 1993, Infect. Immunol. 61(12):5140) y que estas partículas pueden constituir la actividad neutralizante de LPS en plasma.

Tratamientos previos para enfermedades asociadas y/o mediadas por endotoxinas han sido retrospectivos (por ejemplo, después del desarrollo de enfermedad clínica) y han estado limitados a

intervención quimioterapéutica. Las medidas de prevención no se lograron con tales tratamientos.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica para un agente efectivo para neutralizar endotoxina gram negativa (por ejemplo, LPS), con el fin de prevenir o aliviar síntomas de sepsis y choque séptico.

La bacteria y bifidobacteria de ácido láctico, hidrofóbicas, de la presente invención proporcionan compuestos adicionales que son capaces de enlazar endotoxinas y mejorar/prevenir sus efectos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15

De este modo, la presente invención se refiere al uso de al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades superficiales hidrofóbicas, para la preparación de una composición diseñada para la prevención o el tratamiento de trastornos mediados y/o asociados con endotoxina.

De hecho, se ha encontrado sorprendentemente que algunas bacterias y bifidobacterias de ácido láctico, particularmente aquéllas con superficie hidrofóbica, tienen la habilidad de enlazar endotoxinas. Por lo tanto, se permite su uso como agentes eficientes para la prevención de choque endotóxico y sepsis de origen intestinal, traslocación bacteriana, enterocolitis necrosante, enfermedad inflamatoria del intestino, infecciones

intestinales, endotoxemia crónica asociada o para promover inflamación catabólica y sistémica.

Preferentemente, la bacteria o bifidobacteria de ácido láctico, hidrofóbica tiene una hidrofobicidad porcentual (%H) de al menos 80, y más preferentemente desde 85 hasta 100%H.

En una modalidad preferida, las cepas se seleccionan del grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

En otro aspecto, la invención se refiere a una cepa aislada de bacteria o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades hidrofóbicas superficiales, que ha sido seleccionada por su habilidad para enlazar endotoxinas o congregarse con bacterias gram negativas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición alimenticia humana o para mascotas, para prevenir o tratar trastornos asociados y/o mediados con endotoxina, la cual contiene al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que tiene los rasgos anteriores, asociada con un soporte digerible o una matriz farmacéutica.

AB
40

Esta composición presenta la ventaja de disminuir el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado y disminuir la fuga de endotoxina proveniente del intestino al medio interno, un
5 trastorno frecuente encontrado en mascotas que puede provocar episodios de diarrea, mala nutrición e inflamación sistémica e intestinal, por ejemplo.

En un último aspecto, la invención se refiere a un método para prevenir o tratar los
10 trastornos mediados y/o asociados con endotoxina, que comprende el paso de alimentar a un humano o animal con una composición que contiene al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades superficiales hidrofóbica, asociada
15 con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Dentro de la siguiente descripción, "NCC"
20 designa la colección del cultivo Nestlé (Nestlé Research Centre, Vers-chez-les-Blanc, Lausana, Suiza).

Con respecto al primero objetivo de la presente invención, se refiere el uso de al menos una
25 cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades hidrofóbicas superficiales, para la preparación de una composición diseñada para la prevención o el tratamiento de trastornos mediados y/o asociados con endotoxina.

30 De hecho, se ha encontrado sorprendentemente que algunas bacterias y bifidobacterias de ácido

láctico, particularmente aquellas con superficie hidrofóbica, tienen la habilidad de enlazar endotoxinas.

Por supuesto, la cepa bacteriana de acuerdo a la invención tiene la habilidad de enlazar endotoxinas sobre la pared celular hidrofóbica y por lo tanto de depurar este producto proinflamatorio de bacteria gram negativa que de otro modo puede trastocar desde el lumen del intestino hacia la sangre y mediante esto ocasionar reacciones inflamatorias y, en muchos casos serios, choque endotóxico.

La bacteria o bifidobacteria de ácido láctico de acuerdo a la invención ha sido seleccionada entre cepas adecuadas para el consumo animal, con respecto a su hidrofobicidad porcentual (%H), como se describe en A.G. Zavaglia et al., *Journal of Food protection*, Vol. 61, No. 7, 1998, páginas 865-873.

Preferentemente, la cepa bacteriana de acuerdo a la invención tiene un %H de al menos 80, y más preferentemente desde 85 hasta 100%H.

La determinación de la hidrofobicidad superficial fue dada mediante el uso del método MATH como se describió previamente (Pérez, P.F. et al., 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 21-26). En resumen, 2 ml de suspensión bacteriana (aproximadamente 10^8 UFC/ml, PBS) se extrajeron con 0.4 ml de xileno por agitación en vórtice durante 120 segundos. Las fases se dejaron separar mediante decantación y se midió A_{600} de la fase acuosa. La

hidrofobicidad superficial celular (%H) se calculó con la fórmula $H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$, en donde A_0 y A son las absorbancias antes y después de la extracción con xileno, respectivamente.

5 En una modalidad preferida, la cepa bacteriana puede ser seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

10

15

 En una modalidad más preferida, la cepa puede ser *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 (CNCM-I 2623), *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 (previamente CIDCA 536, CNCM-I-2333), *Bifidobacterium bifidum* NCC 235 (previamente CIDCA 533, CNCM-I-2335), *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 (CNCM I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536), por ejemplo.

20

 Entre las diversas cepas seleccionadas de acuerdo con la presente invención, las siguientes cepas se depositaron a manera de ejemplo bajo el Tratado de Budapest en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM), Instituto Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, Francia, *Lactobacillus acidophilus* NCC 2463 el 2.02.2001 bajo la referencia CNCM I-2623, y *Bifidobacterium bifidum* NCC 189 y NCC 235 el 12.10.99

25

30

46
43

bajo las referencias CNCM-I-2333 y CNCM I-2335, respectivamente. *Bifidobacterium adolescentis* NCC 251 se depositó el 15.03.99 bajo la referencia CNCM I-2168.

5 La cepa de *Bifidobacterium lactis* (Bb12) (ATCC27536) se proporcionó por Hansen (Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, P.O. Box 407, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca). Ésta tiene una hidrofobicidad de 89%_H.

10 La cepa bacteriana de acuerdo a la presente invención puede ser utilizada para la preparación de composiciones diseñadas para mejorar la salud humana o animal, particularmente para la prevención o tratamiento de trastornos relacionados a endotoxinas
15 en humanos y mascotas. La cepa bacteriana puede ser utilizada como agente eficiente para la prevención de choque endotóxico y sepsis de origen intestinal, traslocación bacteriana, enterocolitis necrosante, enfermedad inflamatoria del intestino, infecciones
20 intestinales, y endotoxemia crónica asociada o para promover la inflamación catabólica y sistémica, por ejemplo.

La cepa bacteriana de acuerdo a la invención puede ser utilizada en su forma viable o inactivada.

25 En una modalidad preferida, la cepa de bacteria láctica es utilizada en presencia de su medio de crecimiento fermentado. El medio puede ser esterilizado solo o con un alimento, extruido o secado por rocío, enfriado o estable en anaquel, por
30 ejemplo.

La cepa bacteriana puede ser utilizada de modo que la cantidad disponible para el individuo puede corresponder a aproximadamente 10^3 - 10^{14} ufc por día. Esta cantidad depende del peso individual, y es preferentemente de aproximadamente 10^9 - 10^{12} ufc/día para los humanos y de 10^7 - 10^{10} ufc/día para las mascotas.

De acuerdo a otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa aislada de bacteria o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades superficiales hidrofóbicas y que tiene la habilidad de enlazarse a endotoxinas o coagregarse con bacterias gram negativas.

La habilidad de la cepa bacteriana de la presente invención para enlazarse a endotoxinas puede ser medida fácilmente utilizando endotoxinas marcadas con FITC, midiendo la asociación de endotoxinas radiomarcadas a células bacterianas, en este caso la estructura molecular de la endotoxina no se altera en comparación con las modificaciones posibles que puede sufrir la molécula después de la conjugación con el FITC (ver ejemplos).

Preferentemente, se mide la capacidad de la cepa bacteriana para eliminar endotoxina de una solución que imita la cantidad de endotoxinas encontradas en el intestino humano. Por ejemplo, los niveles de endotoxina se eliminaron con el microensayo para la detección del grupo 2-ceto-3-desoxioctonato en el lipopolisacárido de bacteria gram negativa (Karkhanis Y D, et al., *Analytical Chemistry* (1978) 85: 595-601). Se seleccionaron

48
45

preferentemente bacterias que eliminaron más del 30% del contenido de endotoxina de esta solución. Las bacterias no hidrofóbicas, probadas en este ensayo no fueron capaces de modificar el contenido inicial de endotoxina (ver ejemplos).

Tal cepa bacteriana puede ser utilizada como se describe anteriormente, y particularmente como agente eficiente para la prevención de choque endotóxico y sepsis de origen intestinal, traslocación bacteriana, enterocolitis necrosante, enfermedad inflamatoria del intestino, infecciones intestinales, endotoxemia crónica asociada o que promueve la inflamación catabólica y sistémica, por ejemplo.

De acuerdo a un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición alimenticia para humanos o para mascotas, que contiene al menos una cepa aislada de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico, la cepa tiene los rasgos anteriores, asociados con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

La cepa puede ser seleccionada como se describe anteriormente.

Preferentemente, la bacteria o bifidobacteria de ácido láctico puede ser administrada como un suplemento a la dieta normal o como un componente de un alimento nutricionalmente completo para humano o para mascota.

La composición alimenticia para humano o para mascota puede comprender al menos la cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico, como se

49
40

describe anteriormente, de modo que la cantidad disponible puede corresponder a aproximadamente 10^3 - 10^{14} ufc por día. Esta cantidad depende del peso individual, y es preferentemente de aproximadamente
5 10^9 - 10^{12} ufc/día para los humanos y de 10^7 - 10^{10} ufc/día para las mascotas.

El alimento humano puede estar en la forma de una fórmula nutricional, una fórmula para
10 infantes, productos basados en leche, productos lácteos, productos basados en cereales, por ejemplo. Para preparar tal producto o composición alimenticia, la cepa bacteriana como se describe anteriormente puede ser incorporada en un alimento, tal como polvo de cereal, leche en polvo, un yogurt, durante su
15 fabricación, por ejemplo.

En una modalidad, se puede preparar una fórmula nutricional que comprende una fuente de proteína y al menos una cepa bacteriana de acuerdo a la invención. Las proteínas dietéticas son
20 preferentemente utilizadas como una fuente de proteína. Las proteínas dietéticas pueden ser cualquier proteína dietética adecuada, por ejemplo proteínas animales (tales como proteínas de leche, proteínas de carne y proteínas de huevo), proteínas
25 vegetales (tales como proteínas de soya, de trigo, de arroz o de guisante), mezclas de aminoácidos libres, o combinación de los mismos. Las proteínas de leche tales como caseína, proteínas de suero de leche y proteínas de soya son particularmente preferidas. La
30 composición también puede contener una fuente de carbohidratos y una fuente de grasa.

Si la fórmula nutricional incluye una fuente de grasa, la fuente de grasa preferentemente proporciona aproximadamente 5% hasta aproximadamente 55% de la energía de la fórmula nutricional; por ejemplo desde aproximadamente 20% hasta aproximadamente 50% de la energía. Los lípidos que constituyen la fuente de grasa pueden ser cualquier grasa adecuada o mezclas de grasas. Las grasas vegetales son particularmente adecuadas; por ejemplo aceite de soya, aceite de palma, aceite de coco, aceite de cártamo, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de canola, lecitina, y similares. Las grasas animales tales como grasas de leche también pueden ser agregadas si se desea.

Si la fórmula nutricional incluye una fuente de carbohidratos, la fuente de carbohidratos preferentemente proporciona aproximadamente 40% hasta aproximadamente 80% de la energía de la fórmula nutricional. Pueden ser utilizados cualesquiera carbohidratos adecuados, por ejemplo sucrosa, lactosa, glucosa, fructosa, sólidos de jarabe de maíz, y maltodextrinas, y mezclas de los mismos.

También puede ser agregada fibra dietética si se desea. Están disponibles numerosos tipos de fibra dietética. Las fuentes de fibra dietética adecuada, entre otros, pueden incluir soya, guisante, avena, pectina, goma guar, y goma arábica. Si se utiliza, la fibra dietética preferentemente comprende hasta aproximadamente 5% de la energía de la fórmula nutricional. Las vitaminas y minerales adecuados pueden ser incluidos en la fórmula nutricional de la

ST
43

manera acostumbrada para cumplir los lineamientos apropiados. Uno o más emulsificantes grado alimenticio pueden ser incorporados en la fórmula nutricional si se desea; por ejemplo ésteres diacetílicos de ácido tartárico de monodiglicéridos, 5 lecitina y mono- y di-glicéridos. Pueden ser incluidas sales y estabilizantes similarmente adecuados.

La fórmula nutricional es preferentemente 10 administrable enteralmente; por ejemplo en la forma de un polvo, un concentrado líquido, o una bebida lista para beber.

La fórmula nutricional puede ser preparada de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, la 15 fórmula nutricional puede ser preparada al mezclar conjuntamente la fuente de proteína dietética, la fuente de carbohidrato, y la fuente de grasa en proporciones adecuadas. Si se utilizan, los emulsificantes pueden ser incluidos en la mezcla. 20 Las vitaminas y minerales pueden ser agregados en este punto, pero son usualmente agregados después, para evitar la degradación térmica. Cualesquiera vitaminas lipofílicas, emulsificantes y similares pueden ser disueltos en la fuente de grasa antes de 25 la mezcla. El agua, preferentemente agua que ha sido sometida a ósmosis inversa, puede entonces ser mezclada para formar una mezcla líquida. La temperatura del agua es convenientemente de aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 80°C para 30 ayudar a la dispersión de los ingredientes. Los licuadores comercialmente disponibles pueden ser

52
49

utilizados para formar la mezcla líquida. La mezcla líquida es posteriormente homogeneizada; por ejemplo en dos etapas.

La mezcla líquida puede entonces ser
5 térmicamente tratada para reducir las cargas bacterianas. Por ejemplo, la mezcla líquida puede ser rápidamente calentada hasta una temperatura en el intervalo de aproximadamente 80°C hasta aproximadamente 150°C por aproximadamente 5 segundos
10 hasta aproximadamente 5 minutos. Esto puede ser efectuado mediante inyección de vapor, autoclave o por intercambiador de calor; por ejemplo un intercambiador de calor por placa. La mezcla líquida puede entonces ser enfriada hasta aproximadamente
15 60°C o hasta aproximadamente 85°C; por ejemplo por enfriamiento instantáneo. La mezcla líquida puede posteriormente ser nuevamente homogeneizada; por ejemplo en dos etapas a aproximadamente 7 MPa hasta aproximadamente 40 MPa en la primera etapa y
20 aproximadamente 2 MPa hasta aproximadamente 14 MPa en la segunda etapa. La mezcla homogeneizada puede entonces ser enfriada adicionalmente para agregar cualesquiera componentes sensibles al calor; tales como vitaminas y minerales. El pH del contenido de
25 sólidos de la mezcla homogeneizada es convenientemente estandarizado en este punto.

Si se desea producir una fórmula nutricional en polvo, la mezcla homogeneizada es transferida a un aparato de secado adecuado tal como un secador por
30 rocío o liofilizador y convertida en polvo. El polvo

83
50

debe tener un contenido de humedad menor de aproximadamente 5% en peso.

Si se desea producir una fórmula líquida, la mezcla homogeneizada es preferentemente asépticamente
5 llenada en recipientes adecuados. El llenado aséptico de los recipientes se puede efectuar mediante precalentamiento de la mezcla homogeneizada (por ejemplo a aproximadamente 75 hasta 85°C) y luego inyección de vapor en la mezcla homogeneizada para
10 elevar la temperatura hasta aproximadamente 140 hasta 160°C; por ejemplo a aproximadamente 150°C. La mezcla homogeneizada puede entonces ser enfriada, por ejemplo por enfriamiento instantáneo, a una temperatura de aproximadamente 75 hasta 85°C. La
15 mezcla homogeneizada puede entonces ser homogeneizada, enfriada adicionalmente hasta aproximadamente la temperatura ambiente y llenada en recipiente. El aparato adecuado para llevar a cabo el llenado aséptico de esta naturaleza es
20 comercialmente disponible. La fórmula líquida puede estar en la forma de una fórmula lista para alimentar que tiene un contenido de sólidos de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 14% en peso o puede estar en la forma de un concentrado; usualmente de contenido
25 de sólidos de aproximadamente 20 hasta 26% en peso. Pueden ser agregados sabores a las fórmulas líquidas, de modo que las fórmulas se proporcionan en la forma de bebidas listas para beber, con algo de sabor, convenientes.

30 En otra modalidad, un producto alimenticio usual puede ser enriquecido con la cepa bacteriana de

acuerdo a la presente invención. Por ejemplo, una leche fermentada, yogurt, un queso fresco, una leche cuajada, una barra de confitería, hojuelas o barras de cereal para desayuno, bebidas, polvos de leche, productos basados en soya, productos o suplementos nutricionales fermentados no de leche para la nutrición clínica.

En una modalidad adicional, puede ser preparada una composición alimenticia para mascotas, nutricionalmente completa. Ésta puede estar en producto alimenticio para mascotas, estable, en polvo, en forma seca, semihúmeda o húmeda, enfriada o estable en anaquel. Ésta puede también ser suplementos dietéticos para mascotas o composiciones farmacéuticas. Estos alimentos para mascotas pueden ser producidos como es conveniente. Aparte de la cepa bacteriana, estos alimentos para mascotas pueden incluir cualquiera de uno o más de tal fuente de almidón, una fuente proteica y una fuente de lípido.

Las fuentes de almidón adecuadas son, por ejemplo, granos y leguminosas tales como maíz, arroz, trigo, cebada, avena, soya, y mezclas de los anteriores. Las fuentes proteicas adecuadas pueden ser seleccionadas de cualquier fuente proteica animal o vegetal adecuada; por ejemplo carne y harina, harina de aves de corral, harina de pescado, concentrados proteicos de soya, proteínas de leche, gluten, y similares. Para animales de edad avanzada, se prefiere para la fuente proteica que contenga una proteína de alta calidad. Las fuentes lipídicas adecuadas incluyen carnes, grasas animales y grasas

52

vegetales. Además, otros diversos ingredientes, por ejemplo, azúcar, sal, especias, sazónadores, vitaminas, minerales, agentes saborizantes, grasas y similares también pueden ser incorporados en el alimento para mascotas, como se desee.

Para alimentos secos para mascotas, un proceso adecuado es el cocinado por extrusión, aunque el horneado y otros procesos adecuados también pueden ser utilizados. Cuando es cocinado por extrusión, el alimento para mascotas, seco se proporciona usualmente en la forma de una croqueta. Si se utiliza un prebiótico, el prebiótico puede ser mezclado con los otros ingredientes del alimento seco para mascotas, antes del procesamiento. Un proceso adecuado se describe en la Solicitud de Patente Europea No. 0850569; la descripción de la cual se incorpora por referencia. Si se utiliza un microorganismo prebiótico, el organismo es recubierto mejor sobre llenado en el alimento seco para mascotas. Un proceso adecuado se describe en la Solicitud de Patente Europea No 0862863; la descripción de la cual se incorpora por referencia.

Para alimentos húmedos, los procesos descritos en las Patentes Norteamericanas US 4,781,939 y 5,132,137 pueden ser utilizados para producir productos que simulan carne. Las descripciones de estas patentes se incorporan por referencia. Otros procedimientos para producir productos tipo trozo pueden también ser utilizados; por ejemplo cocinando en un horno al vapor. Alternativamente, los productos tipo hogaza pueden

86
53

ser producidos mediante emulsificación de un material de carne, adecuado para producir una emulsión de carne, agregar un agente gelificante adecuado, y calentar la emulsión de carne antes de llenarla en latas u otros recipientes.

La cantidad de prebiótico en el alimento para mascotas se encuentra preferentemente en aproximadamente 20% en peso; especialmente aproximadamente 10% en peso. Por ejemplo, el prebiótico puede comprender aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 5% en peso del alimento para mascotas. Para los alimentos para mascotas que utilicen achicoria como el prebiótico, la achicoria puede ser incluida para comprender aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 10% en peso de la mezcla de alimento; más preferentemente aproximadamente 1% hasta aproximadamente 5% en peso.

Si se utiliza un microorganismo probiótico, el alimento para mascotas preferentemente contiene 10^4 hasta aproximadamente 10^{10} células del microorganismo probiótico por gramo del alimento para mascotas; más preferentemente desde aproximadamente 10^6 hasta aproximadamente 10^8 células del microorganismo probiótico por gramo. El alimento para mascotas puede contener desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 20% en peso de la mezcla del microorganismo probiótico; preferentemente desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 6% en peso; por ejemplo desde aproximadamente 3% hasta aproximadamente 6% en peso.

Los alimentos para mascotas pueden contener otros agentes activos tales como ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga, adecuados incluyen ácido alfa-linoleico, ácido gamma-linoleico, ácido linoleico, ácido eicosapentanoico, y ácido docosahexanoico. Los aceites de pescado son una fuente adecuada de ácido eicosapentanoico y ácido docosahexanoico. El aceite de borraja, aceite de semilla de casis y el aceite de hierba del asno son fuentes adecuadas de ácido gamma-linoleico. Los aceites de cártamo, aceites de girasol, aceites de maíz y aceites de soya, son fuentes adecuadas de ácido linoleico. Si es necesario, los alimentos para mascotas son suplementados con minerales y vitaminas, de modo que éstos sean nutricionalmente completos.

Además, si se desea, la cepa bacteriana puede ser encapsulada; por ejemplo en una matriz de azúcar, matriz de grasa o matriz de polisacárido.

La cantidad del alimento para mascotas a ser consumida por la mascota, para obtener un efecto benéfico, dependerá del tamaño o de la mascota, el tipo de mascota, y la edad de la mascota. Sin embargo, una cantidad del alimento para mascotas para proporcionar una cantidad diaria de aproximadamente 10^3 - 10^{14} ufc de al menos una cepa de bacteria o bifidobacteria de ácido láctico, usualmente podría ser adecuada. Preferentemente aproximadamente 10^9 - 10^{10} ufc/día para perros o 10^7 - 10^{10} ufc/día para gatos, se administran, por ejemplo.

La composición de acuerdo a la invención está diseñada particularmente para la profilaxis o el

58
5

tratamiento de infecciones relacionadas a bacterias gram negativas, bacteria que producen endotoxina tales como *Helicobacter spp*, *Salmonella spp*, y también para sobrecrecimiento bacteriano en el

5 intestino delgado (SIBO) todas ellas pueden manifestarse clínicamente con diarrea, condiciones inflamatorias intestinales o sistémicas, o catabolismo y mala nutrición.

De acuerdo a un último aspecto, la invención

10 proporciona un método para prevenir o tratar trastornos asociados y/o mediados con endotoxina, que comprende el paso de alimentar a un humano o animal, una composición que contiene al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que

15 tiene propiedades superficiales hidrofóbicas, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

Este método puede ser particularmente diseñado para la profilaxis o el tratamiento de

20 infecciones relacionadas a bacteria gram negativa, bacteria productora de endotoxina tal como *Helicobacter spp*, *Salmonella spp*, y también al desarrollo excesivo de bacterias en el intestino delgado (SIBO) todas las cuales pueden manifestarse

25 clínicamente con diarrea, condiciones inflamatorias intestinales o sistémicas, o catabolismo y mala nutrición.

Los siguientes ejemplos se dan a manera de ilustración únicamente y no deben ser contruidos de

30 ninguna manera como limitantes de la materia de interés de la presente solicitud. Todos los

porcentajes se dan en peso, a no ser que se indique de otro modo. Los ejemplos están precedidos por una breve descripción de las figuras.

5

FIGURAS

Figura 1: Gráficas de histograma para cepa NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (previamente CIDCA 536, CNCM I-2333) que muestra enlace de FITC-LPS. A: control sin FITC-LPS. B: incubación con 50 μ l/ml de FITC-LPS. Al menos se analizaron 16,000 eventos.

Figura 2: Efecto de albúmina sobre FITC-LPS que se enlaza por bacteria y bifidobacteria de ácido láctico. A: cepa NCC 200 de *Bifidobacterium bifidum* (previamente CIDCA 538, CNCM I-2334). B: cepa NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM I-2623). C: cepa NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (previamente CIDCA 536, CNCM I-2333).

20

Figura 3: Cinética de crecimiento y enlace de FITC-LPS para cepa 189 de *Bifidobacterium bifidum* (previamente CIDCA 536, CNCM I-2333). Los valores son las medias de dos experimentos independientes.

25

Figura 4: Enlace de LPS por cepa de *Bifidobacterium*, detectado por el microensayo para determinar 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) en lipopolisacárido. La concentración inicial de la solución fue de 100 μ g/ml. Las barras muestran la concentración final después de la incubación de la

30

68
57

solución con cepas bifidobacterianas hidrofóbicas NCC 189 y NCC 251 (CNCM I-2168) en comparación con una cepa no hidrofóbica de bifidobacteria (NCC 200 (CNCM I-2334)).

5

Figura 5: Actividad proinflamatoria (IL-8 (ng/ml)) de solución de LPS preincubada con bacteria hidrofóbica sobre células epiteliales humanas HT-29.

Muestras control de DMEM, leche Humana (HM) 2%, LPS (2.5 µg/ml) solo, cepa NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (1.5e8 ufc/ml) sola, se probaron para la actividad estimuladora anterior. Soluciones de prueba de LPS + leche humana (fuente de sCD14) se compararon con solución que contenía LPS 2.5 µg/ml + HM 2% preincubado con cepa NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (1.5e8 ufc/ml).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Selección de cepa de bacteria de ácido láctico, hidrofóbica, de acuerdo a la invención:

La selección de bacteria hidrofóbica estuvo inicialmente basada en el porcentaje de división de células bacterianas entre una fase orgánica (hidrofóbica) y una acuosa. La determinación de la hidrofobicidad superficial se realizó mediante la utilización del método MATH como se describe previamente (Pérez, P.F. et al., 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:21-26). En resumen, 2 ml de

61
98

suspensión bacteriana (aproximadamente 10^8 UFC/ml, PBS) se extrajeron con 0.4 ml de xileno por agitación en vórtice durante 120 segundos. Las fases se dejaron separar mediante decantación y se midió A_{600} de la fase acuosa. La hidrofobicidad superficial celular (%H) se calculó con la fórmula $H\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$ en donde A_0 y A son las absorbancias antes y después de la extracción con xileno, respectivamente.

Subsecuentemente la bacteria o la bifidobacteria de ácido láctico se seleccionaron por su capacidad para eliminar endotoxina de una solución que imita la cantidad de endotoxina encontrada en el intestino humano. Los niveles de endotoxina se examinaron con el microensayo para la detección del grupo 2-ceto-3-desoxioctonato en el lipopolisacárido de bacteria gram negativa (Karkhanis Y D, et al., *Analytical Chemistry* (1978) 85:595-601).

Se seleccionaron las bacterias que eliminan más del 30% del contenido de endotoxina de estas soluciones. Las bacterias no hidrofóbicas probadas en este ensayo no fueron capaces de modificar el contenido inicial de endotoxina.

Ejemplo 2: Efecto *in vitro* de bacteria de ácido láctico como depurador de endotoxina

Se estudió la interacción entre LPS de *Escherichia coli* y bacteria de ácido láctico que lleva diferentes propiedades superficiales, habiendo seleccionado bacterias con más de 80%H y algunos

62
59

controles "negativos" no hidrofóbicos, la interacción con endotoxina marcada fluorescente se realizó con citometría de flujo.

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

10

La cepa NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM I-2623) fue adquirida de la colección Nestec (Lausana, Suiza). Las cepas NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (previamente CIDCA 536, I-2333) y NCC 200 de *Bifidobacterium bifidum* (previamente CIDCA 538, (CNCM I-2334)) se adquirieron de la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (la Plata, Argentina). Suspensiones congeladas (-80°C) preservadas con 10% (vol/vol) de glicerol se reactivaron una vez en caldo de MRS antes de los experimentos. Todos los cultivos se condujeron a 37°C en condiciones anaeróbicas (BBL GasPak Plus).

15

20

Enlace de FITC-LPS

25

30

El lipopolisacárido y el lipopolisacárido marcado con FITC fueron provenientes del serotipo de *Escherichia coli* O111:B4 (Skelly, R.R et al., 1979, *Infect. Immun.* 23: 287-293) y se adquirieron de Sigma. Soluciones de reserva que contienen 1000

63
60

$\mu\text{l/ml}$ se prepararon en agua destilada y se diluyeron adecuadamente.

Los cultivos bacterianos se lavaron tres veces con PBS y las suspensiones se estandarizaron hasta 10^7 UFC/ml. 400 μl se mezclaron con cantidades diferentes de FITC-LPS o LPS para obtener concentraciones en el intervalo de 0 hasta 50 $\mu\text{g/ml}$ en la mezcla de reacción. Las incubaciones se efectuaron a 4°C o 37°C durante minutos y posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 1% de paraformaldehído (vol/vol) durante 30 minutos a 4°C . El análisis citométrico de flujo se realizó utilizando una luz de excitación azul-verde (FACScan^{MR}).

15

Hidrofobicidad superficial

La determinación de hidrofobicidad superficial se realizó mediante el uso del método MATH como se describió previamente (Pérez, P.F. et al., 1998, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 21-26). En resumen, 2 ml de suspensión bacteriana (aproximadamente 10^8 UFC/ml, PBS) se extrajeron con 0.4 ml de xileno por agitación en vórtice durante 120 segundos. Las fases se dejaron separar por decantación y se midió A_{600} de la fase acuosa. La hidrofobicidad superficial celular (%H) se calculó con la fórmula $H\% = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$ en donde A_0 y A son las absorbancias antes y después de la extracción con xileno, respectivamente.

30

RESULTADOS

Las hidrofobicidades superficiales de las cepas bajo estudio se muestran en la Tabla 1. Los valores fueron 93 y 96% para las cepas NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM I-2623) y NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM I-2333) respectivamente, mientras que la cepa NCC 200 de *Bifidobacterium infantis* (CNCM I-2334) no fue hidrofóbica y mostró valores de aproximadamente 3%.

Tabla 1: Hidrofobicidades de cepas bajo estudio. Los valores son las medias de al menos 3 determinaciones.

Cepa	% de hidrofobicidad
NCC 2463 (CNCM I-2623)	93 ± 3
NCC 189 (CNCM I-2333)	96 ± 3
NCC 200 (CNCM I-2334)	3 ± 2

15

La incubación de la cepa NCC 189 con 50 µg/ml de LPS marcada con FITC, claramente desplaza la población bacteriana en una zona fluorescente. Los eventos situados en el lado derecho de la gráfica (marcador M1) representan 90% de la población pasada (figura 1B). Para las suspensiones incubadas sin FITC-LPS, únicamente 2% de los eventos se situaron en capacidad de enlace diferente.

La tabla 2 (siguiente) muestra que el enlace de FITC-LPS es dependiente de la dosis. 5 y 15% de células FITC (+) se encontraron para las cepas NCC 200. Por otro lado, la cepa NCC 189 muestra

25



aproximadamente 95% de células FITC (+). La saturación ocurre aproximadamente a 10 µg/ml de FITC-LPS. La adición de albúmina, un aglutinante lipídico, reduce claramente la proporción de FITC (+) en todas las cepas bajo estudio (figura 2). Sin embargo, la cepa CIDCA 536 muestra aproximadamente 30% de células FITC (+) en presencia de 0.4% de albúmina y 50 µg/ml de FITC-LPS (figura 2C). Además para esta cepa, 10% de células FITC (+) se encontraron con concentraciones de albúmina tan altas como de 3%. Los cationes divalentes (Ca^{2+} 0.9 mM y Mg^{2+} 0.5 mM) no modificaron el enlace (datos no mostrados).

Tabla 2: Por ciento de bacterias FITC (+) a concentraciones diferentes de FITC-LPS. Al menos se analizaron 30,000 eventos.

FITC-LPS (µg/ml)	Cepa	
	NCC 189	NCC 200
0	0.1	0.2
1	88.1	0.7
10	92.1	5.2
20	92.8	5.9
30	93.9	3.7
40	94.7	4.6
50	94.8	4.6

El enlace de FITC-LPS para la cepa NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (previamente CIDCA 536, CNCM I-2333) fue fuertemente dependiente de la fase

bb
2

del crecimiento (figura 3). La bacteria cosechada en la fase estacionaria muestra una gran proporción de células FITC (+). Estos valores caen dramáticamente durante la fase de retraso y se restauraron progresivamente durante el desarrollo. No se encontraron diferencias entre el enlace a 4°C y a 37°C.

En resumen, las cepas fuertemente hidrofóbicas muestran células FITC (+) que alcanzan aproximadamente 95% para la cepa NCC 189. Ninguna cepa hidrofóbica NCC 200 alcanza valores mayores del 5%. Estos resultados muestran que el enlace de LPS correlaciona con la hidrofobicidad superficial.

Estos resultados indican claramente que la bacteria hidrofóbica se enlaza a la endotoxina marcada con FITC y por lo tanto se vuelve fluorescente. A una concentración de 10 µg/ml de endotoxina, más de 90% de los cultivos celulares hidrofóbicos se vuelven fluorescentes como se detectó con citometría de flujo; en contraste, menos de 10% de células bacterianas no hidrofóbicas se volvieron positivas bajo concentraciones similares de endotoxina.

Cuando los cultivos hidrofóbicos se introdujeron en medios que contenían endotoxina a concentración en el intervalo de entre 30 y 90 µg/ml, los cultivos bacterianos a la concentración de 10^7 hasta 10^8 bacterias por ml, eliminaron al menos 20% de la endotoxina presente. Este dato se confirmó utilizando endotoxina radiomarcada.

67
64

Ejemplo 3: Experimentos sobre células humanas inmunocompetentes

Se estudió la abrogación de la reacción proinflamatoria en células inmunocompetentes humanas inducidas por endotoxina por la presencia en el sistema de cultivo de cepas hidrofóbicas en comparación con bacterias no hidrofóbicas.

NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* hidrofóbica (CNCM I-2333) y NCC 200 de *Bifidobacterium infantis* no hidrofóbica (CNCM I-2334) se incubaron en una solución que contenía una cantidad definida de endotoxina como se determinó por el método de KDO (ver ejemplo 1) (figura 4).

La presencia de endotoxina después de la incubación con suspensión bacteriana se disminuyó claramente por la cepa hidrofóbica, mientras que no se observaron cambios para la cepa no hidrofóbica.

Ejemplo 4: Estudios funcionales para bacteria hidrofóbica

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias lavadas se resuspendieron en DMEM con alto contenido de glucosa (AMIMED) y se preincubaron con LPS de *Escherichia coli* O111: B4 (Sigma) a una concentración final de 2.5 µg/ml. Después de centrifugación, 200 µl del sobrenadante o del botón bacteriano resuspendido se utilizaron para estimular células epiteliales HT-29.

68
65

Después de 20 horas de cultivo a 37°C, el sobrenadante de cultivo de células HT-29 se examinó para la presencia de IL-8 utilizando una técnica de ELISA.

5

RESULTADOS

Los resultados se presentan en la figura 5. La actividad proinflamatoria de LPS se redujo significativamente cuando una solución de LPS se preincubó con bacteria hidrofóbica. Después de la centrifugación, el sobrenadante agregado a un cultivo celular epitelial humano (en presencia de leche humana, ya que la estimulación de LPS es dependiente de la presencia de sCD14) se redujo significativamente con respecto al sobrenadante que no había sido preincubado con la bacteria hidrofóbica.

20

Ejemplo 5: Fórmula infantil

Para obtener una fórmula infantil se preparó la siguiente mezcla que contiene para 100 ml de fórmula: 0.5 a 5%, preferentemente 2% de péptidos; 0.2 a 10%, preferentemente 4% de grasa; 1 a 25%, preferentemente 8% de carbohidratos no levanos (incluyendo lactosa 65%, maltodextrina 20%, almidón 15%), y al menos 10⁶ ufc/ml de las siguientes cepas: NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM I-2623), NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM I-2333), CNCM I-2335 de *Bifidobacterium bifidum*, CNCM I-2168

30

69
66

de *Bifidobacterium adolescentis*, en combinación con trazas de vitaminas y oligoelementos para cumplir los requerimientos diarios, y 0.01 a 2%, preferentemente 0.3%, de minerales, y 50 a 90%, preferentemente 75% de agua.

Ejemplo 6: Uso de bacteria de ácido láctico hidrofóbica de acuerdo a la invención en productos lácteos

10

Una o más cepas de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM I-2333), NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM I-2623), NCC 235 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM I-2335) o NCC 251 de *Bifidobacterium adolescentis* (CNCM I-2168), de acuerdo a la presente invención, pueden ser utilizadas para la fabricación de productos de leche, similares a yogurt, fermentados.

Para hacer esto, se preparó 1 litro de un producto lácteo que contiene 2.8% de grasas y se suplementó con 2% de leche en polvo descremada y 6% de sucrosa, se pasteurizó a 96°C por 30 minutos y su temperatura se disminuyó a 42°C. Los precultivos de una cepa no espesa de *Streptococcus thermophilus* y de una cepa no viscosa de *Lactobacillus bulgaricus* se reactivaron en un medio de cultivo MSK estéril que contenía 10% de leche en polvo reconstituida y 0.1% de extracto de levadura comercial.

Un precultivo de una o más de las cepas también se reactivó en un medio que contenía 10% de leche en polvo reconstituida y 0.1% de extracto de

70
67

levadura comercial con 1% de sucrosa. El producto de leche pasteurizada es luego inoculado con 1% de cada uno de estos precultivos reactivados y este producto lácteo se deja fermentar a 32°C hasta que el pH alcanza un valor de 4.5. Los productos similares a yogurt, de leche, fermentados, son producidos de esta manera y almacenados a 4°C.

Ejemplo 7: Alimento seco para perros

10

Una mezcla alimenticia se constituyó de aproximadamente 58% en peso de maíz, aproximadamente 5.5% en peso de gluten de maíz, aproximadamente 22% en peso de carne de pollo, 2.5% de achicoria seca, leche fermentada por cepas de NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I 2623)), de modo que la cantidad correspondiente para el perro es de aproximadamente 10^9 - 10^{10} ufc/día, y sales, vitaminas y minerales que constituyeron el remanente.

20

La mezcla de alimento es introducida en un preacondicionador y humedecida. El alimento humedecido es entonces alimentado en un horno extrusor y gelatinizado. La matriz gelatinizada que sale del extrusor es forzada a través de un troquel y extruida. El extruido es cortado en piezas adecuadas para alimento de perros, secado a aproximadamente 110°C por aproximadamente 20 minutos, y enfriado para formar pellas.

25

Este alimento seco para perros es capaz de mejorar la salud de las mascotas, y particularmente

30

71
68

previene trastornos relacionados a endotoxinas en mascotas.

REIVINDICACIONES

1. Al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades
5 superficiales hidrofóbicas, útil para la preparación de una composición diseñada para la prevención o el tratamiento de trastornos mediados y/o asociados con endotoxina.

10 2. La cepa de conformidad con la reivindicación 1, en donde la bacteria o bifidobacteria de ácido láctico tiene una hidrofobicidad porcentual (%H) de al menos 80, y más preferentemente de 85 hasta 100%.

15 3. La cepa de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, en donde la bacteria y bifidobacteria de ácido láctico tiene la habilidad de enlazarse a endotoxinas, o coagregarse con bacteria gram negativa.

20 4. La cepa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cepa de bacteria o de bifidobacteria de ácido láctico se selecciona del grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*,
25 *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*,
Lactobacillus animalis, *Lactobacillus ruminis*,
Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus rahmnosus*,
Lactobacillus fermentum, *Lactobacillus delbrueckii subs.*
lactis, *Bifidobacterium spp.*, *Bifidobacterium bifidum*,
30 *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*,
Bifidobacterium infantis, *Bifidobacterium adolescentis*.

73
70

5. La cepa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la cepa es NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I 2623), NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2333), NCC 235 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2335), NCC 251 de *Bifidobacterium adolescentis* (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).

6. la cepa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la bacteria de ácido láctico de utiliza de modo que la cantidad disponible para el individuo es de aproximadamente 10^3 - 10^{14} ufc/día.

7. Una cepa aislada de bacteria o bifidobacteria de ácido láctico que tiene propiedades superficiales hidrofóbicas, que ha sido seleccionada por su habilidad para enlazarse a endotoxinas o coagregarse con bacteria gram negativa.

8. Una cepa de conformidad con la reivindicación 7, en donde la bacteria o bifidobacteria de ácido láctico se enlaza al menos a 30% de endotoxina de soluciones, en donde las concentraciones son similares al contenido intestinal de endotoxina.

9. Una cepa de conformidad con la reivindicación 7 u 8, seleccionada del grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*,

74
71

Lactobacillus delbrueckii subs. lactis, *Bifidobacterium* spp., *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*.

5

10. Una cepa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, la cual es NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I 2623), NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2333), NCC 235 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2335), NCC 251 de *Bifidobacterium adolescentis* (CNCM-I-2168), *Bifidobacterium lactis* (ATCC27536).

11. Una composición alimenticia para humanos o para mascotas que contiene al menos una cepa de bacteria y/o bifidobacteria de ácido láctico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, asociada con un soporte ingerible o una matriz farmacéutica.

12. Una composición de conformidad con la reivindicación 11, en donde la cepa se utiliza en su forma viable o inactivada.

13. Una composición de conformidad con la reivindicación 11 ó 12, en donde la cepa de bacteria de ácido láctico se selecciona el grupo que consiste de *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuterii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rahmnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii subs. lactis*, *Bifidobacterium*

75
72

spp., *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*,
Bifidobacterium pseudolongum, *Bifidobacterium infantis*,
Bifidobacterium adolescentis.

5 14. Una composición de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la
cepa es NCC 2463 de *Lactobacillus acidophilus* (CNCM-I
2623), NCC 189 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2333),
NCC 235 de *Bifidobacterium bifidum* (CNCM-I-2335), NCC 251
10 de *Bifidobacterium adolescentis* (CNCM-I-2168),
Bifidobacterium lactis (ATCC27536).

15 15. Una composición de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la
cantidad de cepa de bacteria de ácido láctico disponible
para el individuo corresponde a aproximadamente 10^3 - 10^{14}
ufc por día.

20 16. Una composición de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, la cual
reduce, previene o trata trastornos asociados y/o
mediados con endotoxina.

25

30

76
23

W7 02/06/1960

PCT7EP020116J

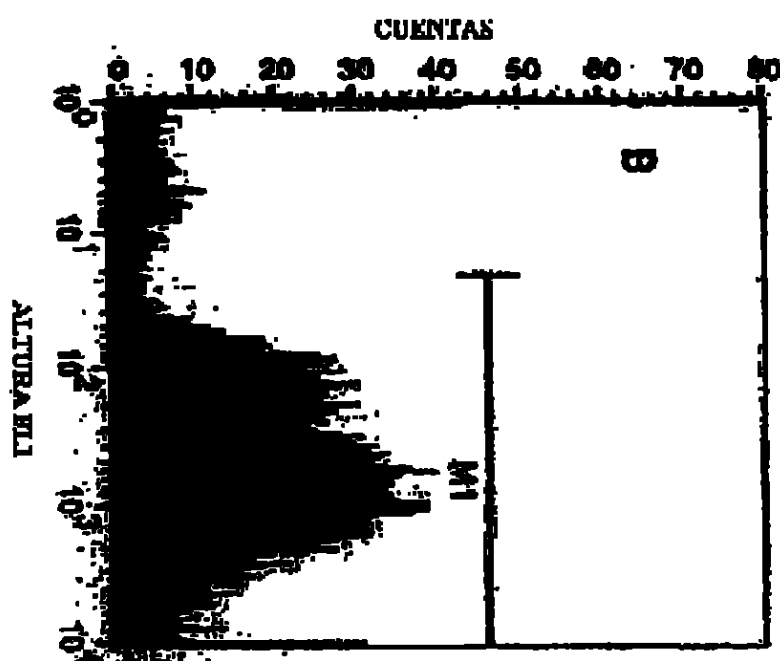
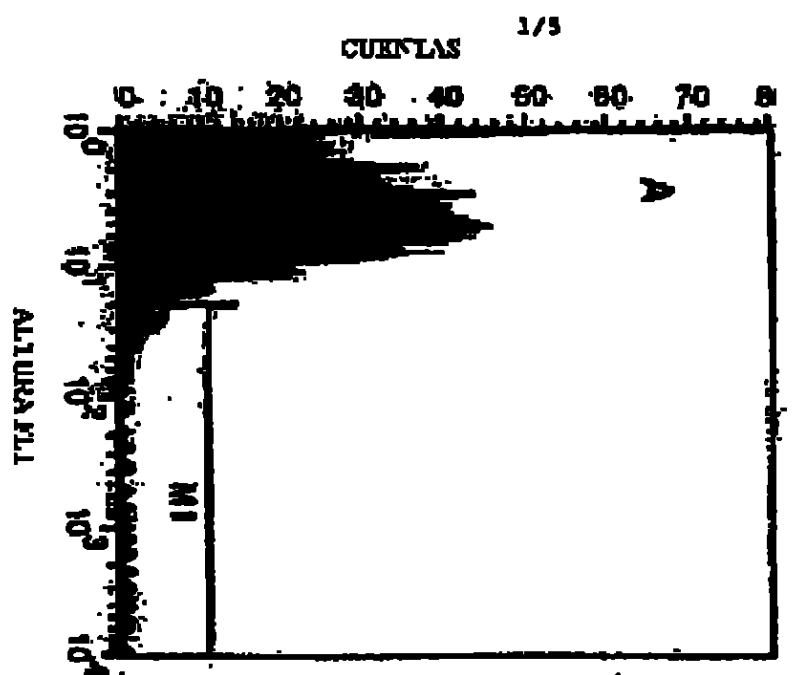
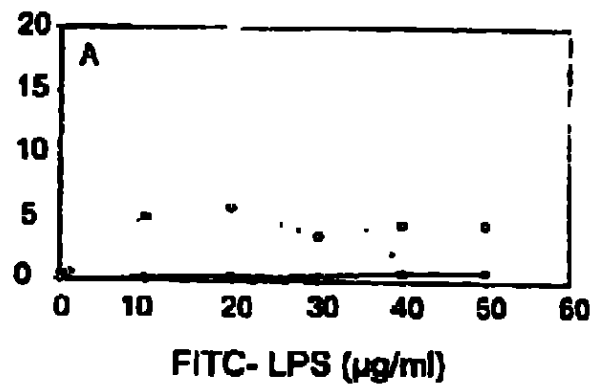


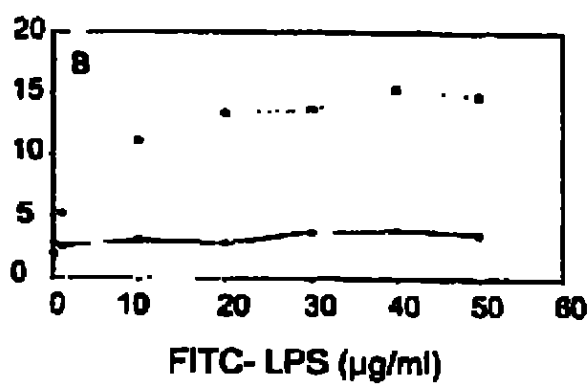
FIGURA 1

77
24

Por ciento de células FITC (+)



Por ciento de células FITC (+)



Por ciento de células FITC (+)

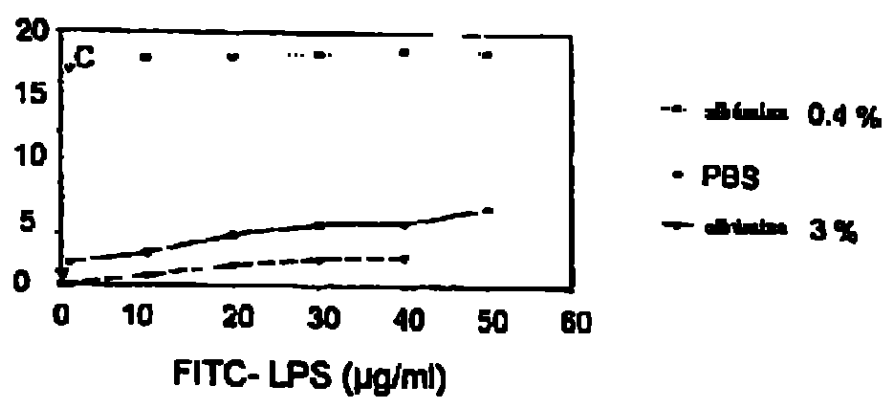


FIGURA 2

78
75

WU 02/06/2001

PTT/EP02/01161

3/5

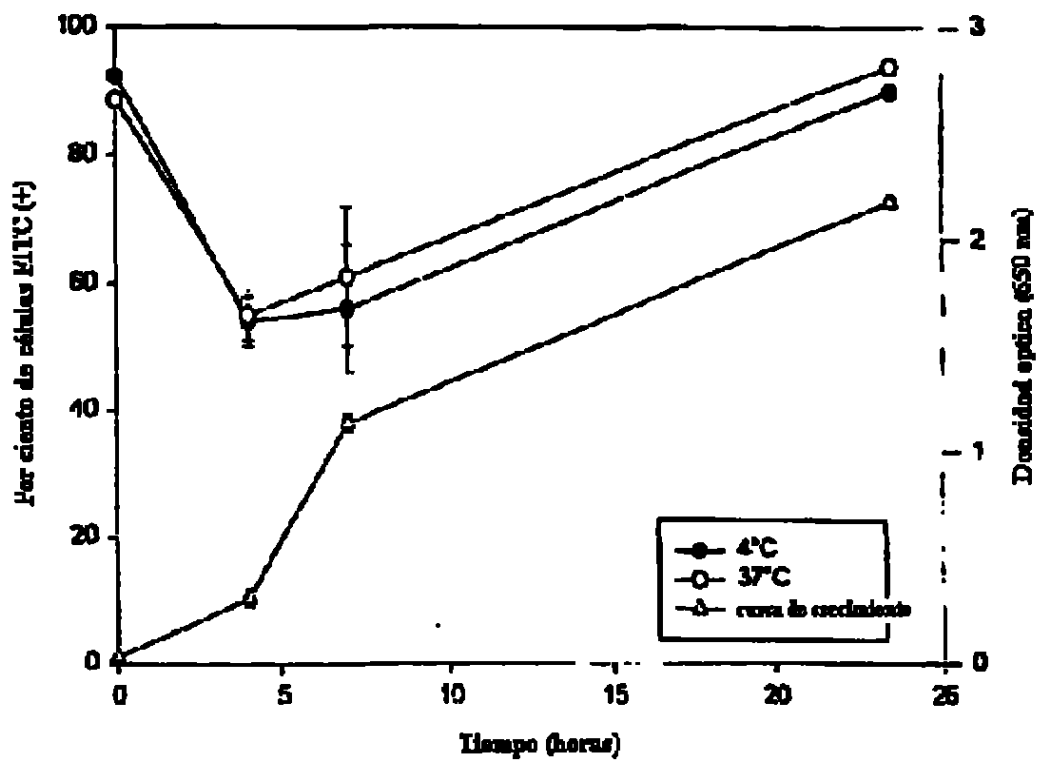


FIGURA 3

79
76

W D 02/06/2000

PCT/EP02/01163

4/5

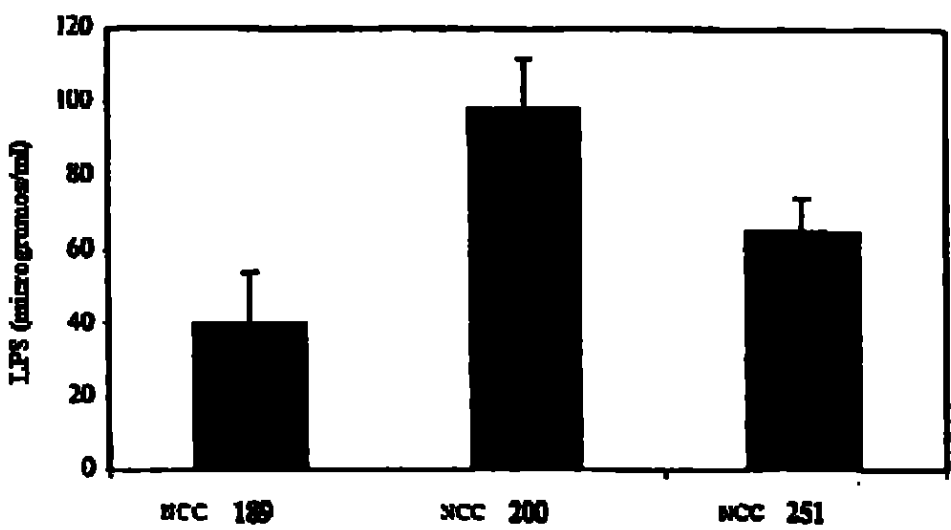


FIGURE 4

80
77

5/5

IL-8 (ng/ml)

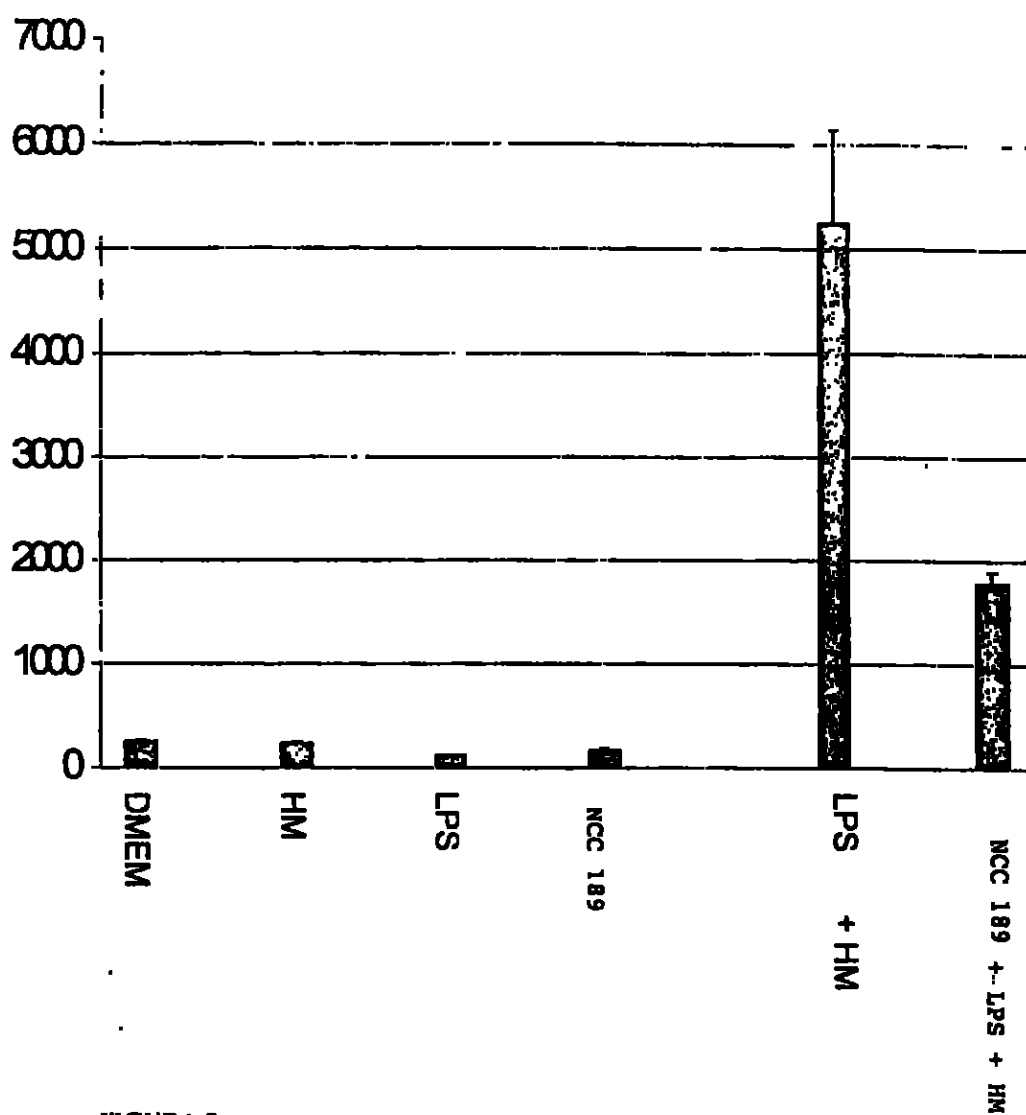


FIGURA 5

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- | | | |
|---|-----|----|
| ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente | [X] | 1 |
| ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [X] | 1 |
| ♦ Descripción de la invención | [X] | 38 |
| ♦ Dibujos de ser estos pertinentes | [X] | 76 |
| ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [X] | 2 |

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- | | |
|---|-----|
| ♦ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- | | |
|---|-----|
| ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado | [] |
| ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud | [] |
| ♦ Representación gráfica del esquema trazado | [] |
| ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas | [] |

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha _____

**Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia**

+-----+ ACCION: Consultar Siguiente Anterior Ir al detalle Primero ... Seleccionar un(os) Registros +-----+	
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO SISTEMA DE REGISTRO Fecha 11/09/2003 +-----+	
MANTENIMIENTO DE PROTOCOLOS Numero : 11145 Fecha : 05/09/1986 Conferido: SOCIETEDS PRODUITS NESTLE S.A. +-----+	
Pais : CH SUIZA Ciudad : 5 VEEVEY, CANTON DE VAUD Represent: S Sustituir: S Desistir: S No. Radicacion: Clase: Seev: Seac: +-----+	
Escencia Codigo Ctr Nombre 1 231 A LLOREDA CAMACHO JOSE 2 231 B LLOREDA JOSE ANTONIO 3 231 C LLOREDA LUIS FERNANDO Encontrados (1/1) registro(s) +-----+	



2020
Bogotá, D.C.,

08432

Doctor:
José Antonio Lloreda
Apoderado
SOCIETE DES PRODUITS NESTLE

ASUNTO:	Radicación N°	03-66821
	Solicitud Internacional	PCT/EP2002/01163
	Fecha inicio fase nacional	06/09/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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:

- ☐ 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. (Art. 26-k) Decisión 486).

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.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

10 OCT. 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.