



Organización
Digitalización CSA

10-1A

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINTENDENCIA DELEGADA PARA LA
PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

PCT

SOLICITUD DE PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

08 - 129697

NÚMERO DE PCT:
PCT/SE2007/050371

PATENTE: USO DE LA BACTERIA SELECCIONADA DEL
ÁCIDO LÁCTICO PARA REDUCIR EL CÓLICO INFANTIL

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A61K 35/74 ,
A61K 47/44, A61P 1/06, C07K 14/335 , C12N
1/20, C12R 1/225

SOLICITANTE: BIOGAIA AB

DOMICILIO: Estocolmo, Suecia

APODERADO: Martha BONILLA CASTRO

Bogotá D.C., diciembre de 2008



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-129697- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 13:57:37 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 91

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA FASE NACIONAL

5 ene 2009

1

SOLICITUD DE:☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☐ Capitulo I.☒ Capitulo II.

2

SOLICITANTE
(71)**Nombre:** BIOGAIA AB**Dirección:** Kungsboplan 3A, P.O. Box 3242,
SE-103 64.**Nacionalidad o Domicilio:** Estocolmo, Suecia**Lugar de Constitución:** Suecia**Tel:****Fax:****E-mail:****IDENTIFICACIÓN**☐ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐ Otro

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE**O APODERADO****Nombre:** Martha BONILLA CASTRO**Dirección:** Calle 26 No 4A-45 Piso 11
Bogotá, Colombia**Tel:** 2864051 **Fax:****Email:** info@brlatina.com**IDENTIFICACIÓN**☒ C.C.☐ NIT☐ C.E.☐

Otro

Número: 41.566.976**T.P:** 41.527

4

INVENTOR (ES)
(72)**Nombre:** CONNOLLY, Eamonn
MÖLLSTAM, Bo**Dirección:** Kungsboplan 3A, P.O. Box 3242, SE-103 64.**Nacionalidad o Domicilio:** Estocolmo, Suecia

5

PCT (86)**Solicitud Internacional No.**
PCT/SE2007/050371**Fecha:** Mayo 30, 2007**Publicación Internacional No.**
WO/2007/142596**Fecha:** Diciembre 13, 2007

6

Título (54) USO DE LA BACTERIA SELECCIONADA DEL ÁCIDO LÁCTICO PARA
REDUCIR EL CÓLICO INFANTIL

7

Clasificación Internacional (51) A61K 35/74 , A61K 47/44 , A61P 1/06, C07K 14/335 ,
C12N 1/20, C12R 1/225

8

Prioridad☒ SI
☐ NO**(33) País de Origen**
ESTADOS UNIDOS
DE AMERICA**(32) Fecha**
Junio 5, 2006**(31) Número de
solicitud**
US11/446,628

9

Comprobante de pago No. 08- 91253

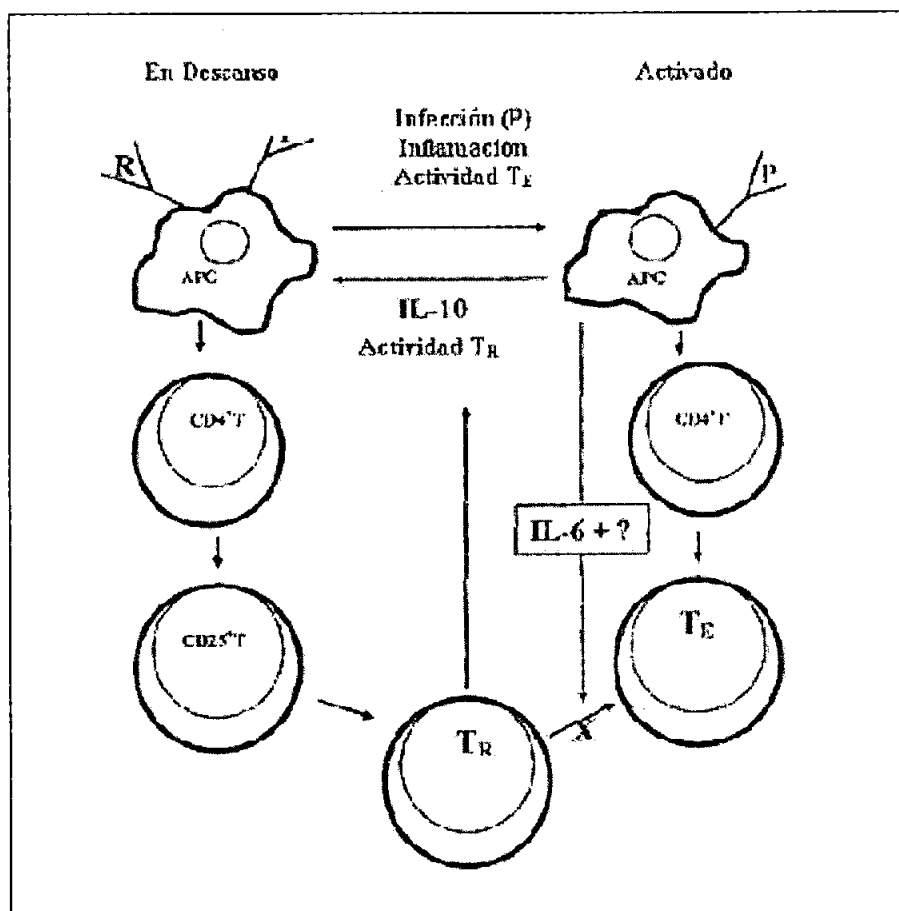
Fecha: 24/11/2008

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante es persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuera el caso
- ☒ 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 acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☒ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:



12 Solicito la concesión de la patente

Nombre: Martha BONILLA CASTRO

Firma:

C.C. 41.566.976

T.P. 41.527

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 91,253
FECHA : NOVIEMBRE 24 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-129697- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 13:57:37 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 91

***** C O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
B&R SOLUCIONES LEGALES	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	301534	20/11/2008	1,140,000.00
B&R SOLUCIONES LEGALES	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	301545	20/11/2008	22,000.00
B&R SOLUCIONES LEGALES	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	10247812	24/11/2008	335,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRASPASO, REPRESENTACION Y PODER

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales, nombres de dominio, derechos de autor y registros sanitarios.

Nosotros, abajo firmados:

CONNOLLY, Eamonn;
MÖLLSTAM, Bo;

domiciliado (s) en

Motionsvägen 3, S-181 30 Lidingö (SE);

Cederflychtsvägen 12, S-443 31 Lerum (SE).).

aquí llamados CEDENTES, propietarios de la patente

US 11/446,628 05.06.2006

En

USA

declaran por el presente instrumento que ceden dicha

patente

A

BIOGAIA AB

sociedad organizada y existente bajo las leyes de

Suecia

domiciliada en

Stockholm Suecia

Y representada por

Marionne Möllstam

domiciliado en

Stockholm Suecia

(aquí llamado el CESIONARIO)

ASSIGNMENT REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans, domain names, copyrights and health registrations.

We, the undersigned

CONNOLLY, Eamonn;
MÖLLSTAM, Bo;

Of

Motionsvägen 3, S-181 30 Lidingö (SE);

Cederflychtsvägen 12, S-443 31 Lerum (SE).).

hereinafter the ASSIGNORS owner of the patent

US 11/446,628 05.06.2006

In

USA

declares by this document that assigns the mentioned

patent

To

BIOGAIA AB

a corporation organized and existent under the laws of

Sweden

domiciled in

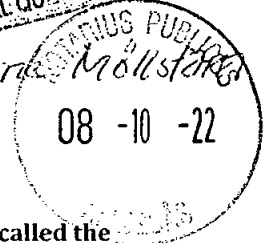
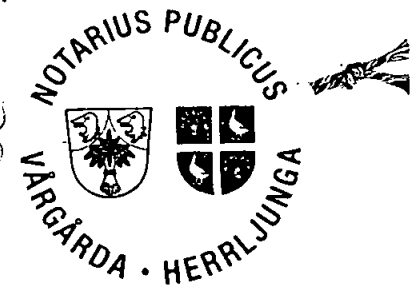
Stockholm Sweden

And represented by

domiciled in

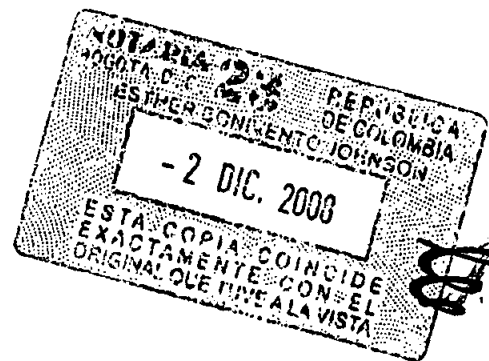
Stockholm Sweden

(which in this document will be called the ASSIGNEE)



Por el presente acto, el CESIONARIO acepta dicho traspaso y nombra a ALVARO RAMÍREZ BONILLA TP. 118.770., c.c. 79.790.039; ANDREA BONNET LOPEZ TP. 135.662., c.c. 52.700.689; MARTHA BONILLA, T.P. 41527., c.c. 41.566.976, domiciliados en la Calle 26 4ª-45 Piso 11 Edificio Torre KLM, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1 o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal, el segundo y la tercera como suplente como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el suplente

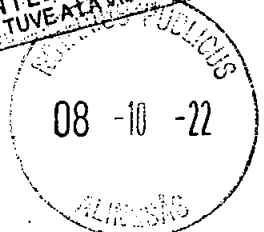
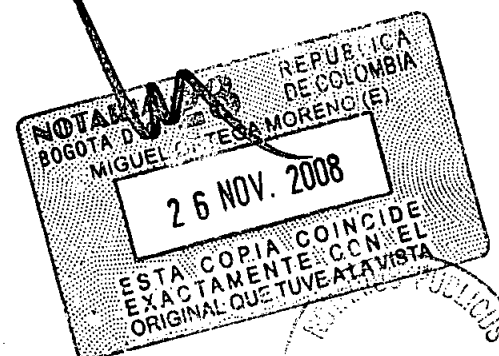
The ASSIGNEE accepts the said assignment and do hereby appoint ALVARO RAMIREZ BONILLA, TP. 118.770 C.C.79.790.039, ANDREA BONNET LOPEZ TP. 135.662., c.c. 52.700.689; MARTHA BONILLA, T.P.. 41527., c.c. 41.566.976, with domicile on Calle 26 4ª-45 Piso 11 Edificio Torre KLM, Bogota, Colombia, in due compliance with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the Commercial Code, the first as principal, the second and third as alternate, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. If any of the appointees were to be definitely absent, the alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal



468

tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o del suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otro según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el suplente en su caso. Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad intelectual, propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. c) Obtención de un número de identificación tributaria y el registro ante la cámara de comercio competente; d) Solicitud de inscripción de obras y demás actos relacionados con derechos de autor ante la Dirección Nacional de Derechos de Autor o la entidad competente. e) Obtención y demás actos relacionados con registros sanitarios ante la autoridad nacional competente. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, solicitar la revocatoria y ratificar los actos de agentes oficiosos.

representative, or of the alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal or the alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the alternates in their turn shall end at such time. In addition, we grant a Power of Attorney in favour of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) intellectual property, industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorise the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). c) Obtainment of a tax identification number and the register before the competent chamber of commerce; d) Registration and other related acts of copyrights before the competent authority. e) Obtainment and other related acts of health registrations before the competent authority. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, ask for revocation and ratify acts done by representatives without a power of attorney.



Given and signed this / Dado y firmado hoy

22nd of October 2008

in/en

Alingsås, Sweden

Signature/Firma

BioGaia AB

E Connolly

CONNOLLY, Eamonn

Möllstam, Bo

Mårten Ås Urdorn

Cesionario/Assignee

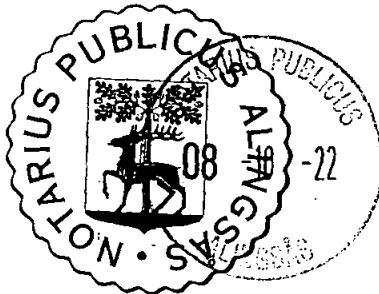
Director Patent Management, BioGaia AB

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

El señor Notario certifica (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo.

NOTARIAL CERTIFICATION

The notary public certifies (1) the legal existence of the company which grants the Power of Attorney, (2) that it is in actual exercise of its company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so



Ingemar Gross
Notarius Publicus
Alingsås



APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

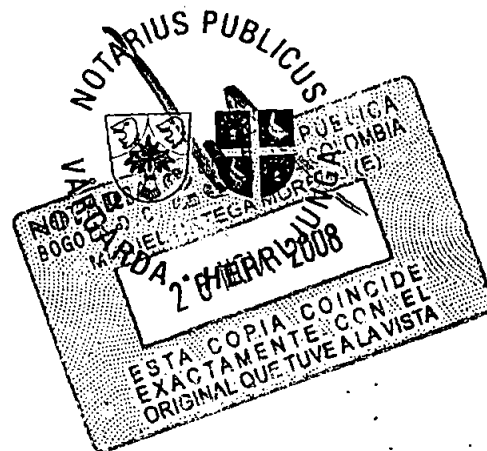
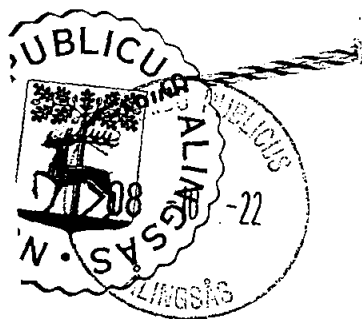
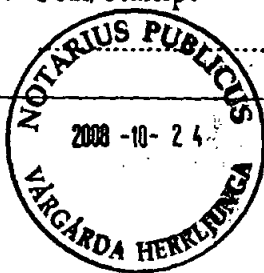
1. Country: Sweden
This public document
2. has been signed by Ingemar Gross
3. acting in the capacity of Notary Public
4. bears the seal/stamp of Notarius Publicus
in Alingsås, Sweden

Certified

5. at Vårgårda
6. the 2008-10-24
7. by Inger Sandin, Notary Public in
Vårgårda and Herrljunga, Sweden
8. N° 179
9. Seal/stamp:

10. Signature:

Inger Sandin



**TITULO: USO DE LA BACTERIA SELECCIONADA DEL ÁCIDO LÁCTICO
PARA REDUCIR EL CÓLICO INFANTIL**

RESUMEN

5

El invento que se menciona en el presente suministra ciertas cepas de bacterias de ácido láctico seleccionadas por su capacidad de promover la producción de IL-10 y consecuentemente la proliferación de células CD4+CD25+T, para la profilaxis y/o tratamiento del cólico infantil; el método de seleccionar

10

tales cepas, y productos que contienen esas cepas.

15

20

25

30

35

DESCRIPCIÓN

ANTECEDENTES DEL INVENTO

5 Campo del Invento:

El invento en el presente suministra ciertas cepas de bacterias de ácido láctico seleccionadas por su habilidad de incrementar lo niveles de citosina IL-10, para profilaxis y/o tratamiento del cólico, un método para seleccionar esas cepas y productos que las contienen.

10

Descripción de las Técnicas Relacionadas.

- A pesar de su importancia en términos tanto de preponderancia y aflicción la naturaleza y las causas del cólico infantil han permanecido muy poco entendidas. La descripción de su condición por parte de la madre es que el bebé
- 15 quien ha estado feliz durante el día, comienza a fruncir el ceño, su cara se enrojece, dobla las piernas hacia arriba, llora entre 2 a 20 minutos después de lo cual el ataque cesa repentinamente. La controversia surge aún en los términos usados para describir la condición. Estos términos incluyen “cólico infantil”, “cólico nocturno” porque el dolor se siente principalmente en la noche, y el “cólico de los tres meses” bajo el pretexto de que este desaparece
- 20 después de cerca de los tres meses después del nacimiento (Illingsworth RS. Dificultades en la lactancia. En Ronald Illingsworth, ed. El niño normal. 10ª edn. Harcourt (India) Pvt. Ltd. 1997; 39-44). Diferentes autores han utilizado diferentes definiciones. La definición de Wessels de que el cólico son
- 25 paroxismos de llanto durante tres o mas horas por día durante tres días o más por semana durante un periodo de al menos tres semanas, es el más aceptado en la literatura (Sondergarrrd C, Skajaa E, Henriksen TB. Crecimiento fetal y cólico infantil. Arch dis Child Fetal_Neonatal Ed 2000; 83(1): F44-47).
- 30 A la fecha los factores causantes más posibles se han dividido en tres grupos: Sico-social, desórdenes gastrointestinal y del desarrollo neurológico. Los factores sico-sociales incluyen lo siguiente: Variante del llanto normal, efectos conductuales de crianza atípica, y manifestación de problemas en la interacción padres-infante.
- 35 Los desórdenes gastrointestinales se han implicado en cólico debido a la posición de las piernas del infante y los gestos durante el llanto. Los factores gastrointestinales se describen resumidamente más adelante:

Las técnicas impropias de alimentación como la alimentación con biberón, alimentación en posición horizontal y la falta de eructos después de la alimentación se han considerado como factores causantes.

Se ha hallado que la lactancia durante los primeros seis meses es el único
5 factor protector.

El riesgo de cólico infantil es 1.86 veces más alto en los infantes no lactantes (Saavedra MA Dacosta JS, garcias G, Horta BL, Tomasi E, Mendoza R. incidencia del cólico infantil y factores de riesgo asociados: Estudio posterior. *Pediatr (Rio J)* 2003; 79(2): 115-122). Lothe y otros demostró que el cólico se
10 deriva de la sensibilidad a la proteína del suero de la leche de vaca. (Lothe L, Lindberg T. La proteína del suero de la leche de vaca provoca síntomas de cólico infantil en niños alimentados con fórmula colicoide: Un estudio cruzado ciego. *Pediatrics* 1989; 83:262).

En un estudio reciente se concluyó que la hipersensibilidad al alimento se
15 podría definir como causante en solo una minoría de casos (Hill DJ, Hosking CS. Cólico infantil e hipersensibilidad al alimento. *J. Pediatr gastroenterol Nutr* 2000; 30 (Suppl): S67-76). Recientemente Buchanan ha mostrado que un ensayo de leche hipoalergénica en cólico infantil no está soportado por suficiente evidencia (Buchanan P. Efectividad del tratamiento del cólico infantil.
20 El ensayo de leche hipoalergénica no está soportado por suficiente fuerte evidencia. *BMJ* 1998; 317(7170): 1451-1452). Se pensó que los bebés con cólico infantil tienen un riesgo más alto de enfermedades alérgicas: Sin embargo, en un estudio reciente, marcadores de atopía, rinitis alérgica, asma, la variabilidad del jadeo y flujo pico, mostraron ser comprables en niños con o
25 sin cólico (Castro-Rodriguez JA, Stern DA, Jalonen M, Wright AL, Holberg CJ y otros. La relación entre el cólico infantil y asma/atopia: Un estudio prospectivo en una población no seleccionada. *Pediatrics* 2001; 108(4): 878-882).

Los autores han reportado la mala absorción de la lactosa basados en pruebas de hidrógeno en la respiración (Hyams J, Geerstama M, Etienne N, Treem W. La producción de hidrógeno colónico en niños con cólico. *J Pediatr* 1989; 115:592). No se han encontrado diferencias en concentraciones de hidrógeno en las heces entre niños con o sin cólico infantil. Sin embargo, los niños que producen niveles más altos de metano han tenido menos cólicos
35 sugiriendo esto un papel de la producción de metano en su alivio. (Belson A, Shetty AK, Yorgin PD, Bujanover Y, Peled Y, Dar MH, Riaf S. La eliminación

del hidrógeno colónico y la producción de metano en niños con y sin síndrome de cólico infantil. *Dig Dis Sci* 2003; 48(9): 1762-1766).

Las hormonas gastrointestinales (GIT sigla en Inglés) tales como motilin, péptido intestinal vaso-activo mostraron ser anormalmente altas en bebés con cólico. Lothe y otros., ha mostrado niveles elevados desde el primer día de vida en bebés quienes después desarrollaron cólicos que sugieren una fisiología GIT anormal en cólico infantil (Lothe L, Ivasson SA, Ekman R, Lindberg T, Motilin y el cólico infantil: Un estudio prospectivo. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79(4): 410-446)

- 10 Los desórdenes del desarrollo neurológico que se han colocado al frente sugieren que los retorcijones abdominales y el cólico pueden ser el resultado de hiperperistalsis. La teoría se apoya en evidencia de que el uso de agentes anticolinérgicos disminuyen los síntomas del cólico. (Gupta SK. Es el Cólico un desorden gastrointestinal? *Curr Opin Paediatr* 2002;14:588-92)
- 15 El hecho de que la mayoría de los niños desarrollan cólicos a los cuatro meses de edad le da soporte a la causa del desarrollo neurológico del cólico (Barr RG. Síndromes de cólico y llanto en infantes. *Pediatrics* 1998; 102(5 suppl E): 1282-6).

Un prebiótico, de acuerdo a la definición generalmente aceptada, es un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta de manera benéfica al animal huésped, mediante el mejoramiento de su balance microbiano intestinal. Aunque originalmente a la suplementación de alimentos de animales para animales de granja, la definición es fácilmente aplicada a la situación humana. El mayor consumo de probióticos por parte de los humanos es en la forma de alimentos de base láctea que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias. Está implícito en la definición que el consumo de probióticos afecta la composición de la micro-flora intestinal.

- Se intenta que este efecto de los probióticos sobre el ecosistema intestinal impacte de alguna manera benéfica al consumidor. Un número de potenciales beneficios que surgen de los cambios al medio ambiente intestinal a través de la agencia de probióticos se ha documentado incluyendo lo siguiente: Aumento de la resistencia a enfermedades infecciosas, particularmente del intestino, disminución en la duración de la diarrea, reducción de la presión sanguínea, reducción de la concentración de suero colesterol, reducción de alergias; estímulo de la fagocitosis por leucocitos de la sangre periférica, modulación de la expresión del gene citosina efecto adyuvante, regresión de tumores, y reducción de la producción carcinógena o co-carcinógena.

Christensen y otros fue uno de los primeros que reportaron que los lactobacilos prebióticos ejercen sus efectos inmuno-modulatorios modulando la capacidad moduladora de Th1/Th2/Th3/Tr1/ de las células dendríticas (DCs). Ellos mostraron que cuando los DCs murinos eran expuestos a co-cultivos de diferentes especies de Lactobacilos, incluyendo el *Lactobacilo reuteri*, ellos eran modulados de manera diferencial para la producción de citocinas IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α y para la lata regulación de MHC clase II y los marcadores de superficie CD86 de manera dependiente de la concentración. Todos los lactobacilos de superficie altamente regulada MHC clase II y los marcadores CD86-indicativo de maduración CD. Particularmente notable en estos estudios era que *L. reuteri* (cepa 12246) era un inductor pobre de IL-12, pero cuando se co-cultivaba con *L. johnsonii* o *L. Casei*, de manera diferencial inhibía la producción de las señales pro-inflamatorias de citocinas IL-12, IL-6 y TNF- α , las cuales fueron estimuladas por las dos últimas especies. La producción de IL-10 permaneció sin alteración bajo estas condiciones.

Estos hallazgos condujeron a sus conclusiones de que "*L. reuteri* podría contribuir a una modulación ambiental de la generación de células dendríticas del intestino favoreciendo la tolerancia a los antígenos que no tenían "señal de peligro" mientras al mismo tiempo mantenían intacta la capacidad de responder contra patógenos reconocidos a través de una señal de peligro como LPS, "que" *L. reuteri* podría ser un potencial tratamiento afinado efectivo para regular hacia abajo la producción de IL-12, y TNF- α (y IL-16) mientras inducía al anti-inflamatorio IL-10, representando así una alternativa terapéutica para contra-balancear la citosina medio ambiental intestinal pro-inflamatoria". Y así existe el riesgo potencial de que las capacidades conductoras de Th1/Th2/Th3 del intestino sean moduladas de acuerdo con la composición de la micro-flora intestinal incluyendo la ingestión de prebióticos".

(Christensen HR, Frokiare H, Testka JJ (2002) Expresión modulada diferencialmente del lactobacilo de citosina y marcadores de maduración de superficie en células dendríticas murino. *J. Immunol* 168 171-178).

Smits y otros extendió estas observaciones y mostró que *L. reuteri* tenía la habilidad de imprimir DCs para estimular la producción de células reguladoras T (TR). Ellos utilizaron tres diferentes especies de Lactobacilos co-cultivados in vitro con DCs derivados de monolitos humanos. Dos de los lactobacilos, una cepa humana *L. reuteri* (ATCC 53609) y *L. casei*, pero no una cepa *L. plantarum*, imprimaron estos DCs para estimular el desarrollo de células TR.

- Se mostró que estas células TR producían niveles incrementados de IL-10 y eran capaces de inhibir la proliferación de células T transeúntes en un estilo dependiente IL-10 (Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TMM, Zaat BAJ, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg L (2005). Las bacterias prebióticas selectivas inducen IL-10 que producen células reguladoras T in vitro modulando la función de células dendríticas a través de la molécula de adhesión inter celular específica para células dendríticas 3-grabbing nonintegrin. J. Allergy Clin Immunol 115 1260-1267)
- Una de las primeras piezas de evidencia acerca del efecto de *L. reuteri* oralmente administrado al huésped en sí fue una proporción incrementada de células T CD4+/CD8+ observadas en ileón de pichón (Walter J, Dobrogosz, NUTRA foods 2005 4(2/3) 15-28). Valeur y otros extendió recientemente esta observación para incluir el ileón humano Ellos obtuvieron evidencia directa in situ en sujetos humanos que mostraban (a) distribución de células específicamente humanas ATCC 55730 *L. reuteri* a través del intestino humano (b) Aparente relación de *L. reuteri* ATCC 55730 en el reclutamiento y/o proliferación de Células CD4+ T específicamente en las regiones ileales de los intestinos. Ellos concluyeron que "las administraciones de *L. reuteri* provocaron un reclutamiento de células ayudantes CD4+ T al epitelio humano. Este reclutamiento puede ser un factor en la explicación del efecto prebiótico de esta cepa *L. reuteri* en el hombre" (Valeur N, Engel P, Carvajal N, Connolly E, Ladefoged K (2004) Colonización e inmuno-modulación por *Lactobacilos reuteri*. ATCC 55730 en el tracto gastrointestinal humano, Appl Environ Microbiol 70 1176-1181).
- Los receptores toll-like (TLR sigla en Inglés) reconocen los motivos microbiales y activan un juego de genes que conducen a la producción de citocina. Tradicionalmente los TRL se han considerado como sensores de las infecciones microbianas y su papel es inducir una respuesta inflamatoria. Sin embargo, los motivos reconocidos por los TRL no son solo para los patógenos sino son motivos generales compartidos por clases completas de microorganismos, y no se entiende totalmente como diferencia el sistema inmune entre las bacterias comensales y patógenas vía TRL. Recientemente, los datos han mostrado que los TRL a pesar de su papel en la inducción de una respuesta inflamatoria, también juegan un papel en el mantenimiento de la homeostasis intestinal mediante el reconocimiento de micro-flora intestinal (Rakoff-Nahoum S, Plagino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R, El

reconocimiento de micro-flora comensal por receptores toll-like se requiere para la homeostasis intestinal. Cell 2004 Jul 23; 118(2):229-41).

Las cepas de una gran cantidad de especies de Lactobacilos , incluyendo el Lactobacillus reuteri se han utilizado en formulaciones probióticas. El Lactobacilo reuteri es uno de los habitantes que ocurren naturalmente en el tracto intestinal de los animales y se encuentra de manera rutinaria en los intestinos de animales saludables, incluyendo humanos. Se sabe que tiene actividad anti-microbiana. Ver, por ejemplo Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,439,678 5,458,875 ,5534,253 5,837,238 y 5,849,289.

- 10 Cuando las células Lactobacilo reuteri crecen bajo condiciones anaeróbicas en presencia de glicerol, ellas producen la sustancia anti-microbiana conocida como β -hydroxy-propionaldehído (3-HPA).

- Existe una clara y compleja relación entre el sistema inmune intestinal y la flora comensal. Se ha demostrado recientemente que la flora luminal endógena puede iniciar el proceso clave de la respuesta inducida por la bacteria, innata y adaptativa del huésped a través de la activación de los receptores toll-like (TLR) y receptores NOD, localizados en las células epiteliales del intestino (Haller D, Jobin C. Interacción entre bacterias lumenales residentes y el huésped: Una relación saludable se puede tornar agria? J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 38:123-36. Rakoff-Naholm S, Paglino J, Esiami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R, Se requiere el reconocimiento de micro-flora comensal por los receptores toll-like para la homeostasis intestinal Cell 2004;118:229-241). En modelos animales, las citocinas pueden iniciar una respuesta hiper-reflejo de la neuromusculatura entérica a través de interacciones neuro-y-mio inmunes (Milla PJ, Células inflamatorias y la regulación de motilidad del intestino. J. Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 39:S750).

- En estudios experimentales y clínicos se ha demostrado que las cepas probióticas específicas inhiben la proliferación de las células T y reduce la secreción tanto de citocinas Th1 como de Th2 mientras preferencialmente generan citocinas supresivas tales como IL-10 y TGF- β (Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E, Los probióticos durante el embarazo y la lactancia pueden conferir protección inmuno-modulatoria contra enfermedades atópicas en los niños. J Allergy Clin Immunol 2002; 109:119-121). Además, en voluntarios humanos, el L. reuteri coloniza el tracto gastrointestinal humano y está en capacidad de ejercer actividad inmuno-modulatoria, incluyendo el reclutamiento de células CD4+ ayudantes T en el íleon hepático humano. (Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K. Colonización e inmuno-

modulación por *Lactobacilo reuteri* ATCC 55730 en el tracto gastrointestinal humano. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1176-81).

Maduración de los DCs en el proceso que convierte DCs inmaduros en antígeno maduro que presentan células que migran a los nódulos linfáticos. Este proceso resulta en la pérdida de la capacidad de respuesta del poderoso antígeno que caracteriza al DC inmaduro y en la regulación de la expresión de moléculas co-simuladoras y de varias citocinas (Mellman I, Steinman RM: Células dendríticas: Máquinas especializadas y reguladas de procesamiento de antígenos. *Cell* 2001, 16:255-8. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Inmuno-biología de células dendríticas. *Annu Rev Immunol* 2000, 18: 767-111).

Los protocolos conocidos de maduración se basan en la creencia de que los DCs se encuentran después o durante la exposición a antígenos. El mejor ejemplo de este punto de vista es el uso de medios monocito-condicionados (MCM sigla en Inglés). El MCM se genera in vitro mediante el cultivo de monocitos y luego usando el cultivo fluido que sobrenada como fuente de factores de maduración. Los mayores componentes en MCM responsables de la maduración son las citocinas pro-inflamatorias interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6 y TNF- α (Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bharwaj N: Un medio monocito condicionado es más efectivo que las citocinas definidas en la mediación de la maduración terminal de las células dendríticas humanas. *Blood* 1997, 90:3640-46). Los DCs maduros producen una variedad de citocinas, las cuales estimulan y dirigen la respuesta de las células T. Dos de estas citocinas son IL-10 y IL-12. Estas citocinas tienen efectos opuestos sobre la dirección de la respuesta de las células T inducidas: El IL-12 induce un tipo de respuesta Th1 mientras el IL-10 inhibe esa respuesta.

De este modo, el estado de activación de las células que presentan antígenos (APC sigla en Inglés) incluyendo DCs determinan el tipo y magnitud de la respuesta de las células T CD4+. Las células que presentan antígenos que están en descanso (incluyendo las células epiteliales en el Timo) pueden promover el desarrollo de células CD4+CD25+TR. Durante la infección por patógenos el reconocimiento de las moléculas microbianas por parte del TLR produce la activación de APCs. Las APCs producen entonces IL-6 y factores adicionales solubles que en conjunto anulan los efectos supresivos de las células TR, permitiendo la suficiente generación de células TE (células T activantes) contra el patógeno. El equilibrio dinámico entre los APC en descanso

so y los activados también será influenciado por las acciones tanto de las células TR como de las TE. (Figura 1).

Pessi y otros (2000) describe la generación de IL-10 en niños atópicos después de *Lactobacilos rhamnosus* GG oral. Pero diferente al invento en el presente el estudio no describe específicamente cepas con la habilidad de producir grandes cantidades de IL-10, seleccionadas por su eficiencia contra los desórdenes de motilidad y cólico (Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generación en niños atópicos después de *Lactobacilos rhamnosus* GG oral. Clin Exp Allergy. 2000 Dec;30 (12):1804-8).

- 10 Un estudio llevado a cabo por Hermelijn y otros (2005) muestra *L. reuteri* y *Lactobacilos casei*, pero no *lactobacilos plantarum*, preparando los DCs derivados de monolitos para conducir el desarrollo de células TR. Estas células TR produjeron niveles incrementados de IL-10. Diferente al invento en el presente, los autores no conectan el IL-10 a la utilidad del intestino o al cólico.
- 15 Aún tratándose de cepas, los autores mencionan dos especies diferentes de bacterias que son eficientes en el incremento de los niveles de IL-10. Esto está en contraste con el invento en el presente donde se muestra que para que el prebiótico sea más eficiente reduciendo el cólico tiene que ser determinado y seleccionado a nivel de cepa ya que las diferentes cepas de la
- 20 misma especie tienen habilidad diferente para ser efectivas en el incremento de los niveles de IL-10.

- De momento no hay cura para el cólico. El paradigma de tratamiento actual para el cólico consiste de métodos sean farmacológicos o no, que suministran la mejor reducción marginal de síntomas. Las intervenciones terapéuticas típicas para el cólico que se ofrecen a los padres están dentro de cuatro
- 25 categorías, incluyendo la alimenticia, física, conductual, y farmacológica. Las manipulaciones alimenticias incluyen el consejo profesional sobre diferentes técnicas de alimentación o el uso de leche hipoalergénica, soya o fórmulas libres de lactosa, y un comienzo rápido con alimentos sólidos ((Lothe, L., y
 - 30 otros. La fórmula de leche de vaca como causa del cólico infantil: Un estudio doble ciego. Pediatrics 1982;70:7-10; Forsyth BWC. El cólico y el efecto del cambio de formulas: Un estudio doble ciego, de múltiples estilos diferentes. J Pediatr 1989; 115,521-6; Treem WR, y otros. Evaluación del efecto de una fórmula enriquecida con fibra sobre el cólico infantil. J Pediatr 1991; 119:695-
 - 35 701). Sin embargo ni el uso de las fórmulas de soya ni los cambios en las técnicas de alimentación trabajan efectivamente para cada caso de cólico. Una revisión de los datos estudiando estas recomendaciones mostró que el

uso de fórmulas hipoalergénicas tales como las hidrolizadas parcialmente o las basadas en amino ácidos, pueden beneficiar solo el 25% de los infantes (Lucassen P L B J y otros: Cólico infantil: Reducción del tiempo de llanto con con un suero hidrolizado: Un ensayo doble ciego, al azar controlado con placebo: *Pediatrics* 2000; 106:1349-54; Estep, DC, y otros. Tratamiento del cólico infantil con fórmula infantil basada en amino-ácidos: Un estudio preliminar. *Acta Paediatr* 2000; 89:22-7).

Las estrategias físicas para el manejo del cólico incluyen movimientos físicos de las posiciones del cuerpo para aliviar la producción de gases/reflujo, transporte, vestido, colocando presión abdominal o masajeando el bebé. Otros métodos incluyen la creación de métodos de distracción para minimizar la conciencia de cólico tales como dar un paseo con el bebé en el carro, utilizar un simulador de carro, una cuna vibradora, o mecer el bebé (Lipton EL. Práctica con los pañales y el cuidado del bebé: Observaciones históricas, culturales y experimentales. *Pediatrics* 1965;35:521-67; Byrne JM, Horowitz FD, El mecer como intervención tranquilizadora: La influencia de la dirección y el tipo de movimiento: *Infant Behav Dev* 1981;4:207-18).

Otra forma es hacer sonar grabaciones de sonidos que supuestamente tranquilicen el bebé. Sin embargo, existe evidencia en la literatura médica que estos métodos no trabajan. (Parkin PC, Schwartz CJ, Manuel BA, Ensayo controlado al azar de tres intervenciones en el manejo del llanto persistente de la infancia. *Pediatrics* 1993;92(2): 197-201). Estas estrategias a lo mejor son solo marginalmente efectivas en el abatimiento de los síntomas del cólico.

Las recomendaciones de las intervenciones conductuales para el tratamiento del cólico son las terapias disponibles más inconsistentes. Algunos autores abogan por la creciente estimulación sensorial, mientras que otros abogan por la disminución de tal estimulación. (Balon AJ, Manejo del cólico infantil. *Amer Fam Physician* 1997;55:235-242; Lucassen P B L J, Gubbels JW, van Eijk TM, van Geldrop WJ, Efectividad de los tratamientos para el cólico infantil: Revisión sistemática. *BMJ* 1998;316(5):1563-9; y Carey WB, "Cólico"-llanto primario excesivo como una interacción infante-medio ambiente. *Pediatr Clin North Am* 1984;31:993-1005). Otras recomendaciones incluyen respuesta temprana al llanto o permitir que el niño llore, ofreciendo un tranquilizador, implementación de un programa rutinario de alimentación, usando contacto visual y jugando interactivamente.

La intervención farmacológica para el tratamiento del cólico a conducido al uso de medicinas prescritas y no-prescritas. Los medicamentos prescritos actualmente incluyen al alcaloide belladona y opiáceos (calmantes), los cuales pueden aliviar, pero pueden ser peligrosos con riesgos que incluyen síntomas extra piramidales, depresión respiratoria, y constipación. Por ejemplo las drogas anticolinérgicas similares en su efecto a la atropina, tales como Hiosiamina (LEVISINE® o GASTROSED®) y Disiclomina, dilatan las pupilas, incrementan los latidos cardiacos, disminuyen la producción de saliva, alivian los espasmos de los tractos gastrointestinales y urinarios, y también los bronquios. Aunque las drogas anticolinérgicas son las únicas medicaciones prescritas en el mercado de los Estados Unidos que han mostrado de manera consistente tratar efectivamente el cólico infantil, desafortunadamente hasta el 5% de los infantes tratados pueden desarrollar efectos laterales, incluyendo dificultades respiratorias, apnea, síncope, asfixia, coma e hipotonía muscular (Williams J, Watkin-Jones R, Dicitlomina: Síntomas preocupantes asociados con su uso en algunos bebes pequeños (BMJ 1984;288:901: Myers HJ, Moro-Suthernald D, Shook JE. Envenenamiento anticolinérgico en infantes colicoides tratados con sulfato de Hiosciamine. Am J Emerg Med 1997;15:532-5).

Además se han reportado varios casos de muerte en infantes que tomaron dicitlomine (Garito JC, Rodríguez R, Norton LE. Dos casos de muerte que involucran dicitlomine en infantes. Clinical Toxicol 1984;22(5):455-462).

Las medicinas no prescritas que se han reportado como tratamiento efectivo para el cólico infantil incluyen varias drogas sedativas o que inducen sueño, incluyendo el difrenidramine (BENADRYL®) supra-fisiológico (alta dosis), fenobarbital, hidrato cloral, y aún el alcohol. Sin embargo, existe el potencial de efectos laterales serios asociados con varios de estos agentes en niños con enfermedad respiratoria, limitando su amplio uso en el tratamiento del cólico (Balon AJ, Manejo del cólico infantil. AMER Pham Physician 1997;55:235-242; Hurí D. Cólico infantil. Australian Pham Phys 1994;23(3):337-34632).

Un medicamento no prescrito más seguro para el tratamiento del cólico ha incluido largamente la administración de simeticona o dimetilpolisiloxane, una droga no absorbible que se vende en mostrador, la cual reduce el tamaño de las burbujas de gas intestinales. La simeticona tiene un perfil muy seguro y es frecuentemente recomendada a pesar de varios estudios que demuestran que su efectividad en el cólico infantil no es mejor que el placebo. (Metcalf,

TJ y otros. *Pediatrics* 1994 July; 94(1):29-34. Sferra TJ, y otros, *Pediatr Clin North Am* 1996 April;43(2):489-510. Danielson B y otros, *Acta Pediatr Scand* 1985 May; 74(3):446-50. Colon AR y otros, *Am Fam Physician* 1989 December: 40(6): 122-4). Como resultado, el tratamiento actual más común para el cólico es simplemente esperar a que el bebé crezca y salga de esta condición.

Por lo tanto, existe actualmente la necesidad de componentes y composiciones seguros y efectivos y técnicas que demuestren ser útiles para el tratamiento del cólico en infantes y niños pequeños. La composición y métodos de este invento, responden a esta necesidad, suministrando un producto que puede tratar de manera segura y efectiva los síntomas asociados con el cólico en infantes. La solicitud de Patente No. EP1364483A10 describe probióticos para el tratamiento de las anormalidades neuromusculares del intestino, tales como el cólico en los bebés. Los solicitantes mencionan varias especies diferentes de bacterias como prebióticos. Esto está en contraste con el invento en el presente donde el probiótico que va a ser el más efectivo reduciendo el cólico es una cepa de bacterias ácidas lácticas específicas seleccionadas para ser efectivas en el incremento de los niveles de IL-10 y no una especie completa de bacterias, como lo han mostrado los inventores de este invento que hay diferencias sustanciales en la estimulación de la producción de IL-10 entre cepas también de la misma especie.

En el 2005 Savino demostró que la suplementación con *L. reuteri* ATCC 55730 mejoraba de manera significativa los síntomas colicoides en infantes lactantes comparados con la terapia estándar con Simeticona a los 7 días del tratamiento. La tasa de respuesta al tratamiento con *L. reuteri* fue de 95% mientras solo 7% de los infantes respondieron a la Simeticona. Él presentó los resultados a la Sociedad Europea para Investigación Pediátrica (ESPR sigla en Inglés), Reunión de Agosto 31 de 2005 a Septiembre 3 de 2005 en Siena, Italia (*Pediatr Res.* 2005;58(2):411). Aunque los resultados de Savino mostraban resultados benéficos él no se enteró de la conexión entre ciertas cepas que promueven la producción de IL-10 y la reducción de la motilidad del intestino y consecuentemente el cólico. El invento en el presente suministra un método para seleccionar la mejor de tales cepas.

Collins describió que las molestias de la función motora producen una variedad de síntomas que pueden surgir en el contexto de inflamación o activación inmune en varias regiones del intestino y adopta tales entidades comunes como la esofaguitis, gastritis y enfermedad idiopática inflamatoria del

- intestino grueso (IBD sigla en Inglés). Estas observaciones sugieren que la motilidad del intestino también está sujeta a la influencia del sistema inmune. En este contexto el sistema motor puede jugar un papel importante para defender el intestino contra estímulos nocivos presentes en el lumen (Collins S,
- 5 La inmuno-modulación de la Función Entérica Neuromuscular: Implicaciones de la Motilidad y Desórdenes Inflamatorios. Gastroenterología 1996;111:1683-1699). Esta noción se refleja, por ejemplo, por la observación de Vantrappen y otros quienes mostraron que el sobrecrecimiento bacterial en el intestino pequeño está acompañada por un trastorno del patrón normal
- 10 cíclico de la motilidad interdigestiva en el intestino pequeño (Vantrappen G, Jannssens J, Hellemans J, Ghooys Y. El Complejo motor Inter.-digestivo de sujetos normales y pacientes con sobre-crecimiento bacterial del intestino pequeño. J Clin Invest 1977;1158-1168).
- Se ha sabido muy bien durante muchos años que los elevados niveles de IL-
- 15 10 reprimen los sistemas inmunes sobre-activados. También se ha demostrado previamente que la motilidad del intestino está controlada por señales neurológicas que están conectadas al sistema inmune intestinal y que el cólico es una consecuencia del incremento de la motilidad del intestino, por ejemplo, debido al sobre-crecimiento bacterial.
- 20 En los países industrializados, las medidas de higiene comienzan al momento del nacimiento, el cual interrumpe la capacidad del neonato de tomar la microflora intestinal de la madre. Como consecuencia, se establece una microflora diferente en el infante. En lugar de alojándose por ejemplo la *Escherichia coli* y los *Lactobacilos* de los recién nacidos se colonizan con mas frecuencia con *Staphylococcus aureus* y otras bacterias de la piel.
- 25 Los inventores de este invento han hecho el hallazgo inesperado que mientras el sobre-crecimiento de bacterias de la piel sobre-activa el sistema inmune del bebé, lo que conlleva a la motilidad sobre-activada del intestino y el cólico como consecuencia, un número más alto de bacterias específicas del
- 30 intestino, tales como *L. reuteri* DSM 17938, con capacidad de promover la producción de IL-10, conduce a la maduración del sistema TR, por ejemplo la proliferación de células CD4+CD25+TR. La regulación de las células Cd4+CD25+ conduce a calmar la motilidad del intestino y como consecuencia a beneficiar los efectos sobre los bebés con cólico.
- 35 A cuenta de estos hallazgos, se seleccionaron cepas bacterianas no patogénicas para incrementar las propiedades de IL-10, y de manera sorprendente, se halló que esta propiedad de las cepas están correlacionadas con el decre-

cimiento del cólico infantil. El invento consecuentemente se refiere al uso de *L. reuteri* DSM 17938 para la fabricación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento del cólico, y otras cepas seleccionadas de la misma manera.

- 5 Un objetivo futuro del invento es suministrar productos que contengan tales cepas y para la administración a animales, incluyendo humanos. Otros objetivos y ventajas serán más completamente aparentes de la siguiente divulgación y reivindicaciones adjuntas.

10

RESUMEN DEL INVENTO

El invento que se menciona en el presente suministra ciertas cepas de bacterias de ácido láctico seleccionadas por su capacidad de promover la producción de IL-10 y consecuentemente la proliferación de células CD4+CD25+TR, para la profilaxis y el tratamiento del cólico, el método para seleccionar tales cepas y los productos que contienen tales cepas.

15

Otros objetivos y características del invento serán más completamente aparentes de la siguiente divulgación y reivindicaciones adjuntas.

20

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS PLANOS

Figura 1. Papel propuesto para ciertas cepas de bacterias de ácido láctico seleccionadas para promover el desarrollo de células CD4+CD25+TR.

Figura 2a. Producción de IL-10 por las células DC en forma de gráfico de barras; Figura 2b. Producción de IL-10 por células DC en una Tabla.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO E INCLUSIONES PREFERIDAS DEL MISMO

30

La colonización de bacterias de la piel en el intestino y la deficiencia de células TR sobre-activan el sistema inmune del bebé recién nacido, lo que produce sobre-activación de la motilidad del intestino y consecuentemente el cólico. Un número mayor de células específicas de bacterias del intestino, tales como *L. reuteri* DSM 17938, con capacidad de promover la producción de IL-10, produce la maduración del sistema TR. Ejemplo: Proliferación de las células CD4+CD25+TR. Se ha reportado por parte de varios investigadores que

35

otras cepas de lactobacilos inducen la producción de IL-10 por ejemplo *Rautava* y otros (anterior).

La supra-regulación de las células CD4+CD25+calma la motilidad y beneficia en consecuencia el cólico. Sorpresivamente se encontró que las cepas que producen un incremento en los niveles de citosina IL-10 son las mismas cepas con capacidad para disminuir el tiempo promedio de llanto (Ejemplo 2).

Este invento, que se menciona en el presente comprende cepas de bacterias de ácido láctico las cuales han sido seleccionadas por su capacidad de reducir el cólico, incluyendo la *L. reuteri* DSM 17938. Los productos tales como comidas, aditivos y fórmulas, dispositivos farmacéuticos o médicos que contienen células completas o componentes derivados de estas cepas se pueden formular como se sabe, y generalmente incluyen un apoyo ingerible mas la cepa-*Lactobacillus* o su componente derivado.

Se puede utilizar un estudio in vitro como método para seleccionar las cepas de lactobacilos por su capacidad de estimular la producción de IL-10 en DCs monolito-derivados y su capacidad de inducir el desarrollo de células CD4+CD25+TR (Ejemplo No. 1). Los datos muestran un indicio de una simulación poderosa de IL-10 por la cepas específicas *L. reuteri* ATCC 55730 y *L. reuteri* DSM 17938, y que esta regulación se transmite por una sustancia liberada dentro del medio de crecimiento por estas dos cepas específicas durante la última fase de crecimiento registro/estacionario. Por el contrario las otras dos cepas de *L. reuteri* no estuvieron en capacidad de estimular producción relevante de IL-10.

Para confirmar la relevancia clínica de las cepas seleccionadas para prevenir el cólico tratado se han llevado a cabo estudios posteriores en niños lactantes con diagnóstico de cólico infantil.-

Las características de este invento se entenderán más claramente consultando los ejemplos siguientes los cuales no se deben interpretar como limitantes del invento.

30

EJEMPLO No. 1

El estudio de de la habilidad de las cepas probióticas para promover la expresión IL-10 mediante el DC monolito-derivado:

Los DCs inmaduros se generan de los monolitos de la sangre periférica (Hilkins C. M. U. P. kalinski M de Boer, y Kapsenberg 1997. Las células dendríticas humanas requieren factores exógenos interleukin-12-inducen para dirigir el desarrollo de de células T ayudantes simples hacia el fenotipo Th-1.

Blood 90:1920) cultivadas en IMDM (Life Technologies Paisley UK) que contienen 10% de FCD HyClone, Logan, UT), recombinante humano (rh)gm-CSF (500 U/ml; Schering-Plough, Uden, Países Bajos) (Kalinski P, J.H.N. Schuite-maker, C. M. U. Hilkens, E.A. Wierenga, y M.L. Kapsenberg 1999. La madu-
 5 ración final de las células dendríticas está asociada con la con la receptividad afectada a IFN y a los inductores bacteriales IL-12: Habilidad disminuida de las células dendríticas maduras para producir IL-12 durante la interacción con células Th. J. Immunol. 162:3231)

Las cepas a ser probadas en este ejemplo son la *Lactobacillus reuteri* ATCC
 10 55730, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 4660 y *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 4964 que se puede obtener de ATCC (manassas VA USA y DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las cepas se culti-
 van sobre agar Columbia (Oxoid, Basignstoke, Reino Unido) que contiene 6.25% de sangre de oveja. Los lactobacilos se incuban a 37°C en una atmós-
 15 fera 5% CO₂. Después de tres días se determina el número de bacterias mi-
 diendo la densidad óptica a 620nm (OD₆₂₀). Típicamente, un OD₆₂₀ de 0.35 correspondió a 1x10⁸ de unidades que forman colonias (cfu) para todas las cepas probadas.

En el día 6, se induce la maduración de las DC inmaduras por LPS (*E. Coli*;
 20 Sigma Aldrich, St. Louis, Mo) y los Lactobacilos de prueba en presencia de la combinación de citocinas IL-1 β (25ng/mL) y TNF- α (50 ng/mL) todas juntas usadas como factor de maduración (citocinas compradas a Peprotech, Rocky Hill NJ).

La producción de citosina IL-12, IL-10 e IL-16 mediante la maduración de
 25 DCs se determina por medio de una estimulación de 24 horas con células ligand-expressing de plasmacitoma de ratón (J558) como lo ha descrito Viera PL y otros (Viera PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Kalinski P. El desarrollo de la capacidad de inducción Th1 en células mieloides dendríticas requiere instrucción ambiental. J. immunol 2000;164:4507-12).

30 Los supernatantes se cosechan después de 24 horas y las concentraciones de IL-10 se miden por ELISA: Ver la Fig. 2 para los resultados. Como se puede ver de los resultados existe una diferencia sustancial en la influencia de las diferentes cepas de Lactobacilos en su capacidad de promover la producción de IL-10 por los DCs.

EJEMPLO 2

Las cepas probióticas seleccionadas contra la Simeticonaa en el tratamiento del cólico infantil.

- 5 Los niños lactantes con diagnóstico de cólico infantil se reclutan en el Departamento de Pediatría y Ciencia Adolescente (Drottning Silvias University Hospital, Goteborg). Los pacientes con edades entre 21-90 días, con adecuada edad gestacional con peso al nacer entre 2500 y 4000 gr, con síntomas de cólico que satisfacen los criterios de Wessel, los cuales surgieron
10 casi entre 6 ± 1 días antes del enrolamiento se consideran para ser incluidos en el estudio (Wessel MA, Cobb JC, Jackson EB, Harris GS, Detwiler AC. Inquietudes paroxísticas en la infancia, algunas veces llamado "cólico". Pediatrics 1954;14:421-35). Todos los infantes enrolados son alimentados exclusivamente con seno materno con el fin de reducir la variabilidad en la mi-
15 cro-flora intestinal debido a las variaciones en la dieta, las cuales a su vez pueden influenciar la respuesta al probiótico. Se excluyen los infantes si han tenido evidencia clínica de enfermedades crónicas o desórdenes gastrointestinales o si han recibido antibióticos o prebióticos en la semana del reclutamiento.
20 En este estudio los infantes colicoides se toman al azar para recibir el probiótico o la Simeticona en los siguientes tratamientos:
(P1) Cepa de Lactobacillus reuteri ATCC 55730 llamada también SD2112
(P2) Cepa de Lactobacillus reuteri DSM 17938 (depositada en DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (Mascherioder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) el 6 de Febrero de 2006 bajo el Tratado de Budapest.
25 (P3) Cepa de Lactobacillus reuteri ATCC PTA 4660
(S) Simeticona
El L. reuteri se administra a una dosis de 108 de unidades que forman colonia (CFU sigla en Inglés) en 5 gotas de un aceite comercialmente disponible
30 MCT (aceite triglicérido cadena media) suspensión, 30 minutos después de comer una vez al día durante 28 días. Los aceites MTC ocurren naturalmente, y la fuente más abundante es el aceite de coco. La mayoría de los aceites MCT se refinan del aceite de coco. El aceite MCT es un líquido de color ligero sin sabor y de baja viscosidad. Esta suspensión de aceite es estable du-
35 rante 21 meses a 2-8°C (como lo documenta el fabricante BioGaia AB Estocolmo, Suecia) (fuente alterna del aceite MCT es Akomed R, por Karlshamns

AB, Karlshamn, Suecia). Durante el estudio se instruyen los padres para guardar el producto en el refrigerador cuando no se esté usando. La Simeticona (s) se suministra a una dosis de 620 mg/día en 3 mL de una solución comercialmente disponible (Milicon Infants Gas Relief Drops, J&J, 7050 Camp Hill Road, Fort Wshington, Pennsylvania, 19034-2210, USA) después de comer, 2 veces al día durante 28 días. Cuando se enrolan se le solicita a todas las madres seguir una dieta libre de leche de vaca: Evitar la leche, yogurt, queso fresco y fuerte, crema, mantequilla, galletas. La adherencia a la dieta se monitorea con una dieta de lácteos mantenida durante todo el periodo del tratamiento. En los días 7, 14, 21 y 28 uno de los investigadores examina el cumplimiento de la dieta. El Comité Ético de la Institución aprobó el protocolo de estudio y se matricularon los infantes en el estudio solo después de haber obtenido el consentimiento escrito de los padres.

15 **Visitas de Seguimiento**

El día en el cual el pediatra vió el infante por primera vez se define como Día 1. En esta ocasión cada infante pasó por un examen médico y se entrevistaron los padres con el fin de obtener datos de antecedentes concernientes al tipo de parto, peso al nacer y edad gestacional, historia familiar de enfermedades gastrointestinales y atopia. En particular la última se considera positiva si los infantes tuvieron uno o más miembros de la familia con eczema atópico (madre, padre, y/o hermanos) rinitis alérgica o asma. Aún más, se registró cualquier signo y síntoma de enfermedad atópica durante el estudio. También se invitó a los padres para registrar datos concernientes al promedio diario de tiempo de llanto y el número de episodios de cólicos en el día después del reclutamiento. (Día 0). El Doctor asignó al azar el niño a cualquiera de los grupos de estudio. La administración de los productos del estudio comenzó el Día 1.

Se les suministró a los padres información escrita acerca del estudio y se les solicitó que registraran diariamente el número de episodios de llanto inconsolable y su duración, la consistencia y frecuencia de las deposiciones como también cualquier efecto lateral observado (constipación, vómito, reacciones cutáneas, etc.) a partir del Día 0 hasta el Día 28, utilizando un diario estructurado. Con el fin de asegurarse que todos los padres anotaran el tiempo de llanto de manera uniforme para asegurar que a los infantes se les estaba dando la medicación correctamente, uno de los investigadores está siempre disponible para ayudar a los padres por teléfono.

Cada paciente es re-examinado por el mismo Pediatra en los días 1, 7, 14, 21 y 28.

Resultados

- 5 De los 120 infantes lactantes colicoides enrolados, se asignan 30 al azar para tratamiento con L. reuteri ATCC 5573 (P1); 30 fueron asignados al azar para tratamiento con L. reuteri DSM 17938 (P2); 3º fueron asignados al azar para tratamiento con L. reuteri ATCC PTA 4660 (P3) y 30 asignados para tratamiento con Simeticona (S). No se retiró ningún bebé debido a efectos laterales relacionados con el ensayo. Los grupos son similares con respecto al peso, género, tipo de parto, historia familiar de atopia o enfermedades gastrointestinales y exposición al humo.

El promedio de tiempo de llanto por día es similar en los grupos de tratamiento en el Día 0 y en el Día 1: Los infantes que recibieron L. Reuteri ATCC 15 55730 (P1) y DSM 17938 (P2), mostraron una reducción significativa en el tiempo diario de llanto en el Día 7 comparados con los infantes con ATCC PTA 4660 y Simeticona (S). En el Día 14, 21 y 28 el tiempo de llanto es significativamente diferente entre los cuatro grupos de tratamiento. La diferencia entre P1 y S en el tiempo de llanto por día del comienzo a fin del estudio es 20 de 82 minutos y la diferencia entre P2 y S en promedio de tiempo de llanto por día de principio a fin del estudio es de 83 minutos en el Día 28 (Tabla 1). Como se puede ver de los resultados los cuatro grupos de tratamiento están razonablemente empatados antes de la administración de los productos de prueba. Ya después de 7 días existe una diferencia clara a favor de las cepas 25 de L. reuteri ATCC 55730 y DSM 17938 sobre las otras dos alternativas. Después de 28 días las diferencias se han hecho mayores.

30

35

Tabla 1. Tiempo de llanto (media de minutos por día) en los grupos de L. reuteri y Simeticona

Infantes Coli- coides N=120	L. reuteri ATCC55730 N=30	L reuteri DSM 17938 N=30	L. reuteri ATCC PTA 4660 N=30	Simeticona N=30
Día 0	206	203	204	205
Día 1	191	190	198	194
Día 7	147	148	171	172
Día 14	98	100	156	155
Día 21	75	77	150	148
Día 28	58	59	145	141

Mientras el invento se ha descrito con referencia a personificaciones específicas, se apreciará que numerosas variaciones, modificaciones y personificaciones son posibles, y de acuerdo con esto, todas esas variaciones, modificaciones y personificaciones se relacionan como estando dentro del espíritu y alcance del invento.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938
- 5 2. Una composición que comprende un cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938
3. Un método para reducir el cólico infantil que comprende la selección de
- 10 una cepa bacteriana de ácido láctico que promueve la expresión IL-10 en humanos y que administra la cepa bacteriana a infantes diagnosticados con el cólico infantil.
4. El método en la reivindicación 3, en el cual la cepa bacteriana de ácido
- 15 láctico es una cepa de *Lactobacillus reuteri*
5. El método de la reivindicación 4, la cepa bacteriana de ácido láctico es *Lactobacillus reuteri* DSM 17938
- 20 6. Un producto para reducir el cólico infantil, que comprende una cepa de bacterias de ácido láctico seleccionada por su habilidad de incrementar los niveles de IL-10
7. El producto de la reivindicación 6, en el cual la cepa bacteriana de ácido
- 25 láctico es una cepa de *Lactobacillus reuteri*
8. El producto de la reivindicación 7, en el cual la cepa bacteriana de ácido láctico es *Lactobacillus reuteri* 17938
- 30 9. El producto de la reivindicación 7, que comprende además un aceite triglicérido de cadena media

Figura 1

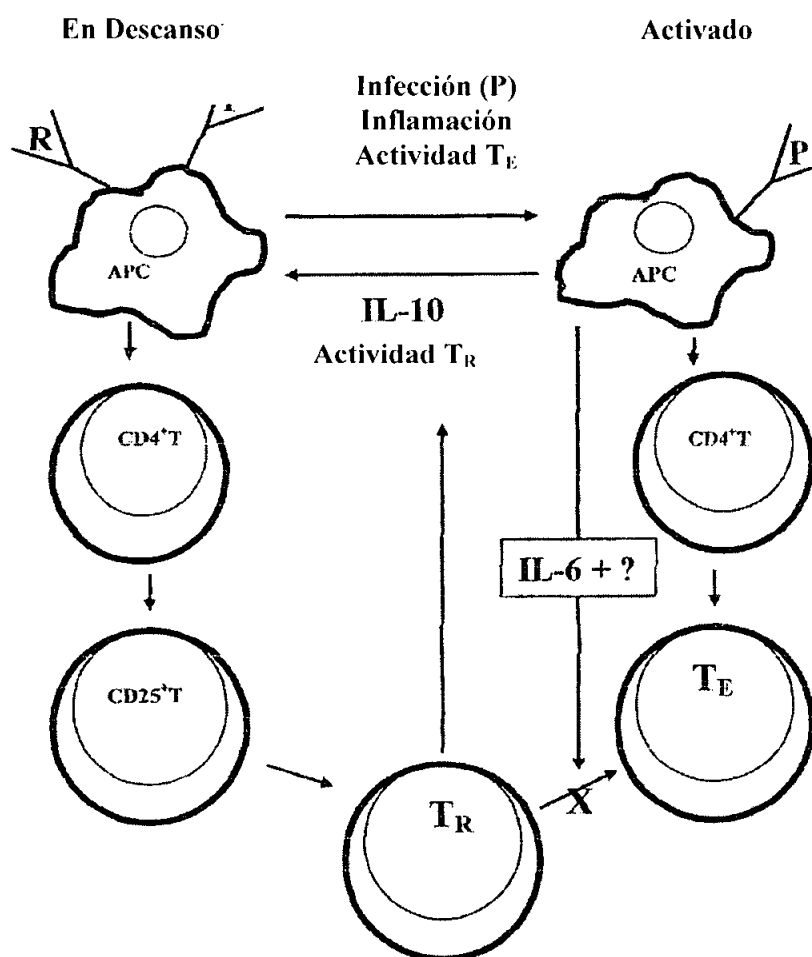


Figura 2a

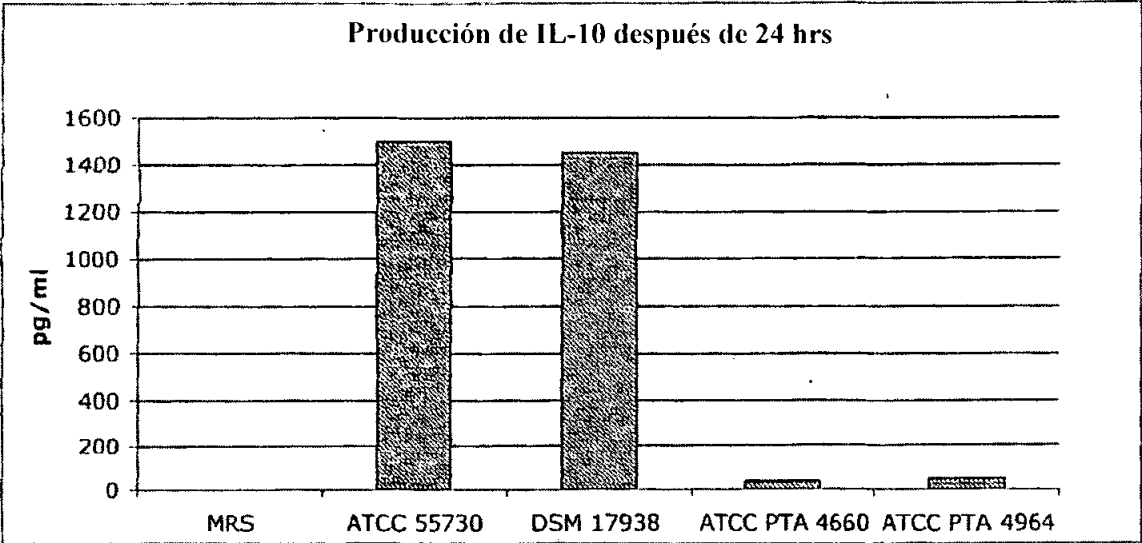


Figura 2b

	Producción de IL-10 (pg/ml)
MRS	
ATCC 55730	1500
DSM 17938	1450
ATCC PTA 4660	35
ATCC PTA 4964	47

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 December 2007 (13.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/142596 A1

(51) International Patent Classification:

A61K 35/74 (2006.01) A61K 47/44 (2006.01)
A61P 1/06 (2006.01) C07K 14/335 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/SE2007/050371

(22) International Filing Date: 30 May 2007 (30.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

11/446,628 5 June 2006 (05.06.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **BIO-GAIA AB** [SE/SE]; P.O. Box 3242, Tegnergatan 15, S-103 64 Stockholm (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **CONNOLLY, Eamonn** [GB/SE]; Motionsvägen 3, S-181 30 Lidingö (SE). **MÖLLSTAM, Bo** [SE/SE]; Cederflychtsvägen 12, S-443 31 Lerum (SE).(74) Agents: **Albihns AB** et al.; P.O. Box 5581, S-114 85 Stockholm (SE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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
- with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description

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

(54) Title: USE OF SELECTED LACTIC ACID BACTERIA FOR REDUCING INFANTILE COLIC

(57) Abstract: The invention herein provides certain strains of lactic acid bacteria selected for their capability of promoting production of IL-10 and consequently proliferation of CD4+CD25+ TR cells, for prophylaxis and/or treatment of infant colic, a method of selecting such strains, and products containing such strains.

WO 2007/142596 A1

USE OF SELECTED LACTIC ACID BACTERIA FOR REDUCING INFANTILE COLIC

BACKGROUND OF INVENTION

5 Field of the Invention

The invention herein provides certain strains of lactic acid bacteria selected for their ability of increasing cytokine IL-10 levels, for prophylaxis and/or treatment of colic, a method of selecting such strains, and products containing such strains.

10 Description of the Related Art

Despite its salience in terms of both prevalence and distress the nature and causes of infantile colic have remained poorly understood. A mother's description of this condition is a baby who has been happy during the day, begins to frown, his face becomes red, he draws up his legs, screams and continues to cry for about 2-20 min
15 after which the attack ends suddenly. Controversy arises even in the terms used to describe the condition. These terms include, "infantile colic", "evening colic" because the pain is mainly confined to evening, and "three months colic" under the pretext that it disappears after about three months from birth (Illingworth RS. Difficulties in breastfeeding. In Ronald S. Illingworth, ed. The Normal Child. 10th edn. Harcourt
20 (India) Pvt. Ltd. 1997; 39-44). Different authors have used different definitions. The definition of Wessels that colic is paroxysms of crying for three or more hours per days for three days or more per week during a period of at least three weeks, is mostly accepted in the literature (Sondergaard C, Skajaa E, Henriksen TB. Fetal growth and infantile colic. Arch Dis Child Fetal-Neonatal Ed 2000; 83 (1): F44-47).
25 To date, the main possible causative factors has been divided into three groups: psychosocial, gastrointestinal and neuro-developmental disorders.

Psychosocial factors include: variant of normal crying, behavioral effects of atypical parenting, and manifestation of problems in parent-infant interaction.

Gastrointestinal disorders have been implicated in colic because of the infant's
30 leg position and grimacing during a crying spell. The gastrointestinal factors are briefly reviewed below:

Improper feeding techniques like bottle feeding, feeding in a horizontal

position and lack of burping post-feeding have been considered as causative factors. Breast-feeding in the first six months has been found to be a sole protective factor. The risk of infantile colic is 1.86 times higher among non-breast fed infants (Saavedra MA, Dacosta JS, Garcias G, Horta BL, Tomasi E, Mendoca R. Infantile colic incidence and associated risk factors: a cohort study. *Pediatr (Rio J)* 2003; 79(2): 115-122). Lothe et al. showed that colic is from sensitivity to cow's milk whey protein (Lothe L, Lindberg T. Cow's milk whey protein elicits symptoms of infantile colic in colicky formula -fed infants: A double -blind cross over study. *Pediatrics* 1989; 83: 262).

10 In a recent study, it was concluded that food hypersensitivity could be defined as causative in only a minority of cases of infantile colic (Hill DJ, Hosking CS. Infantile colic and food hypersensitivity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30 (Suppl): S67-76). Recently Buchanan has shown that a trial of hypoallergenic milk in infantile colic is not supported by enough evidence (Buchanan P. Effectiveness of treatment for infantile colic. Trial of hypoallergenic milk is not supported by strong enough evidence. *BMJ* 1998; 317(7170): 1451-1452). Babies with infantile colic are thought to be at higher risk of allergic diseases. However, in a recent study, markers of atopy, allergic rhinitis, asthma, wheezing and peak flow variability, are shown to be comparable in infants with or without infantile colic (Castro- Rodriguez JA, Stern DA, Halonen M, Wright AL, Holberg CJ et al. Relationship between infantile colic and Asthma/ atopy: A prospective study in an unselected population. *Pediatrics* 2001; 108(4): 878-882).

Lactose malabsorption has been reported by authors based on breath hydrogen tests (Hyams J, Geerstama M, Etienne N, Treem W. Colonic hydrogen production in infants with colic. *J Pediatr* 1989; 115: 592). No differences have been found in stool hydrogen concentrations between infants with or without infantile colic. However, infants producing higher methane levels have been found to have decreased colic suggesting a role of methane production in its alleviation (Belson A, Shetty AK, Yorgin PD, Bujanover Y, Peled Y, Dar MH, Riaz S. Colonic hydrogen elimination and methane production in infants with and without infantile colic syndrome. *Dig Dis Sci* 2003; 48(9): 1762-1766).

Gastrointestinal (GIT) hormones such as motilin, vasoactive intestinal peptide have been shown to be abnormally high in babies with colic. Lothe et al. have shown

elevated levels from first day of life in babies who later developed colic suggesting an abnormal GIT physiology in infantile colic (Lothe L, Ivasson SA, Ekman R, Lindberg T. Motilin and infantile colic: A prospective study. *Acta Paediatr Scand* 1990; 79(4): 410-416).

5 Neuro-developmental disorders that have been put forward suggest that abdominal cramping and colic may be a result of hyperperistalsis. The theory is supported by evidence that the use of anticholinergic agents decreases colic symptoms (Gupta SK. Is colic a gastrointestinal disorder? *Curr Opin Paediatr* 2002;14:588-92).

10 The fact that most infants outgrow colic by four months of age lends support to a neurodevelopmental cause of colic (Barr RG. Colic and crying syndromes in infants. *Pediatrics* 1998;102(5 suppl E):1282-6).

15 A probiotic, by the generally accepted definition, is a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance. Although originally referring to the supplementation of animal feeds for farm animals, the definition is easily applied to the human situation. The major consumption of probiotics by humans is in the form of dairy-based foods containing intestinal species of lactobacilli and bifidobacteria. It is implicit in the definition that consumption of the probiotic affects the composition of the intestinal microflora.

20 It is proposed that this effect of the probiotic on the intestinal ecosystem impacts in some beneficial way on the consumer. A number of potential benefits arising from changes to the intestinal milieu through the agency of probiotics have been documented including: increased resistance to infectious diseases, particularly of the intestine, decreased duration of diarrhea, reduction in blood pressure, reduction in serum cholesterol concentration, reduction in allergy, stimulation of phagocytosis by peripheral blood leucocytes, modulation of cytokine gene expression, adjuvant effect, regression of tumors, and reduction in carcinogen or co-carcinogen production.

30 Christensen et al. was one of the first reporting that probiotic lactobacilli exerted their immunomodulatory effects by modulating the Th1/Th2/Th3/Tr1/Treg-promoting capacity of dendritic cells (DCs). They showed that when murine DCs were exposed to co-cultures of different *Lactobacillus* species, including *Lactobacillus reuteri*, they were differentially modulated for production of cytokines IL-6, IL-10, IL-12, and TNF- α , and for up-regulation of MHC class II and CD86 surface markers in a

concentration dependent manner. All lactobacilli upregulated surface MHC class II and CD86 markers - indicative of DC maturation. Particularly notable in these studies was that *L. reuteri* (strain 12246) was a poor IL-12 inducer, but when co-cultured with *L. johnsonii* or *L. casei*, it differentially inhibited production of the
5 proinflammatory cytokine signals IL-12, IL-6 and TNF- α , which were stimulated by the latter two species. IL-10 production remained unaltered under these conditions.

These findings led to their conclusions that "*L. reuteri* may contribute to an environmental modulation of the intestinal dendritic cell generation favoring tolerance toward antigens bearing no 'danger signal' while at the same time keeping
10 intact the capacity to respond against pathogens recognized via a danger signal like LPS," that "*L. reuteri* might be a potential fine-targeted treatment effective for downregulating production of IL-12 and TNF- α (and IL-6) while inducing the anti-inflammatory IL-10, thus representing an alternative therapeutic approach to counterbalance the pro-inflammatory intestinal cytokine milieu," and thus "the
15 potential exists for Th1/Th2/Th3 driving capacities of the gut to be modulated according to composition of gut microflora, including ingested probiotics."
(Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ (2002) Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. J Immunol 168 171-178).

20 Smits et al. extended these observations and showed that *L. reuteri* has the ability to prime DCs to stimulate T regulatory (TR) cell production. They used three different *Lactobacillus* species co-cultured in vitro with human monocyte-derived DCs. Two of the lactobacilli, a human *L. reuteri* strain (ATCC 53609) and *L. casei*, but not a *L. plantarum* strain, primed these DCs to stimulate development of TR cells.
25 These TR cells were shown to produce increased levels of IL-10 and were able to inhibit proliferation of bystander T cells in an IL-10-dependent fashion (Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TMM, Zaat BAJ, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg L (2005) Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating
30 dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J Allergy Clin Immunol 115 1260-1267).

One of the first pieces of evidence concerning an effect of orally administered *L. reuteri* on the host per se was an increased CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio observed in the

chick ileum (Walter J. Dobrogosz, NUTRAfoods 2005 4(2/3) 15-28). Valeur et al. recently extended this observation to include the human ileum. They obtained direct *in situ* evidence in human subjects showing (a) distribution of individual human-specific *L. reuteri* ATCC 55730 cells throughout the human gut and (b) apparent
5 involvement of *L. reuteri* ATCC 55730 in the recruitment and/or proliferation of CD4+ T cells specifically in the ileal regions of the intestines. They concluded that “*L. reuteri* administrations elicited a recruitment of CD4+ T-helper cells to the human epithelium. This recruitment may be one factor in explaining the probiotic effect of this *L. reuteri* strain in man” (Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged
10 K (2004) Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract, *Appl Environ Microbiol* 70 1176-1181).

Toll like receptors (TLRs) recognize microbial motifs and activate a set of genes that lead to cytokine production. Traditionally, TLRs have been regarded as sensors of microbial infections, and their role is to induce an inflammatory response.
15 However, the motifs recognized by TLRs are not unique to pathogens but are general motifs shared by entire classes of microorganisms, and it is not fully understood how the immune system differentiates between commensal and pathogenic bacteria via the TLRs. Recently, data have shown that TLRs, despite their role in induction of the inflammatory response, also play a role in maintaining intestinal homeostasis by
20 recognizing the commensal microflora (Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004 Jul 23;118(2):229-41).

Strains of a wide variety of *Lactobacillus* species, including *L. reuteri* have
25 been used in probiotic formulations. *L. reuteri* is one of the naturally occurring inhabitants of the gastrointestinal tract of animals, and is routinely found in the intestines of healthy animals, including humans. It is known to have antimicrobial activity. See, for example U.S. Patent Nos. 5,439,678, 5,458,875, 5,534,253, 5,837,238, and 5,849,289. When *L. reuteri* cells are grown under anaerobic conditions
30 in the presence of glycerol, they produce the antimicrobial substance known as β -hydroxy-propionaldehyde (3-HPA).

There is a clear and complex relationship between the intestinal immune system and the commensal flora. Recently it has been demonstrated that the luminal

endogenous flora can initiate the key process of bacteria-induced innate and adaptive host response through the activation of toll-like receptors (TLRs) and NOD-receptors, located on the intestinal epithelial cells (Haller D, Jobin C. Interaction between resident luminal bacteria and the host: can a healthy relationship turn sour? J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 38: 123-36. Rakoff-Naholm S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell 2004; 118: 229-241). In animal models, cytokines can initiate a hyper-reflex response of the enteric neuromusculature through neuro- and myo-immune interactions (Milla PJ. Inflammatory cells and the regulation of gut motility. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 39: S750.).

In experimental and clinical studies it has been demonstrated that specific probiotic strains inhibit proliferation of the T cells and reduce secretion of both Th1 and Th2 cytokines while preferentially generating suppressive cytokines such as IL-10 and TGF- β (Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infants. J Allergy Clin Immunol 2002; 109: 119-121). Further, in human volunteers, *L. reuteri* colonizes the human gastrointestinal tract and is able to exert immunomodulatory activity, including recruitment of CD4+ T-helper cells at the human ileum epithelium (Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 1176-81). Maturation of DCs is the process that converts immature DCs to mature antigen presenting cells that migrate to lymph nodes. This process results in the loss of the powerful antigen uptake capacity that characterizes immature DC and in the upregulation of co-stimulatory molecule expression and of various cytokines (Mellman I, Steinman RM: Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. Cell 2001, 106:255-8. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K: Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol 2000, 18:767-811).

Known maturation protocols are based on the environment that DCs are believed to encounter after or during exposure to antigens. The best example of this approach is the use of monocyte-conditioned media (MCM). MCM is generated in vitro by culturing monocytes and then using the culture supernatant fluid as a source

of maturation factors. The major components in MCM responsible for maturation are the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-6 and TNF- α (Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N: A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997, 90:3640-6.). Mature DCs produce a variety of cytokines, which stimulate and direct the T cell response. Two of these cytokines are IL-10 and IL-12. These cytokines have opposing effects on the direction of the induced T cell response: IL-12 induces a Th1 type response whereas IL-10 inhibits such response.

Thus, the activation state of APCs (antigen presenting cells), including DCs, determines the type and magnitude of the CD4⁺T cell response. Resting APCs (including epithelial cells in the thymus) may promote the development of CD4⁺CD25⁺TR cells. During infection by pathogens, recognition of microbial molecules by TLRs results in activation of APCs. The APCs then produce IL-6 and additional soluble factors that together override the suppressive effects of TR cells, allowing efficient generation of T_E (T effector cells) cells against the pathogen. The dynamic equilibrium between resting and activated APCs will also be influenced by the actions of both TR and TE cells (Figure 1).

Pessi et al. (2000) describe IL-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. But unlike the invention herein the study does not describe specifically strains with the ability of producing high amounts of IL-10, selected for their efficiency against motility disorders and colic (Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus*. GG. *Clin Exp Allergy*. 2000 Dec;30(12):1804-8).

A study by Hermelijn et al. (2005) shows *L. reuteri* and *Lactobacillus casei*, but not *Lactobacillus plantarum*, priming monocyte-derived DCs to drive the development of TR cells. These TR cells produced increased levels of IL-10. Unlike the invention herein, the authors do not connect the IL-10 elevation to gut motility or colic. Even when it comes to strains, the authors mention two different bacterial species being efficient in increasing IL-10 levels. This is in contrast to the invention herein where it is showed that the probiotic to be most effective reducing colic has to be determined and selected at the strain level as the different strains of the same species have a different ability to be effective in increasing IL-10 levels.

At present there is no cure for colic. The current treatment paradigm for colic consists of either pharmacological and/or non- pharmacological methods, providing at best marginal reduction of symptoms. Typical therapeutic interventions for colic offered to parents fall within four categories, including, dietary, physical, behavioral
 5 and pharmacological. Dietary manipulations include professional advice on various feeding techniques, or the use of hypoallergenic milk, soy or lactose free formulas, and an early introduction to solids (Lothe, L., et al. cow's milk formula as a cause of infantile colic: a double-blind study. *Pediatrics* 1982; 70:7-10; Forsyth B W C. Colic and the effect of changing formulas: a double- blind multiple-crossover study. *J*
 10 *Pediatr* 1989;115,521- 6; Treem, W R, et al. Evaluation of the effect of a fiber-enriched formula on infant colic. *J Pediatr* 1991; 119:695-701). However, neither the use of soy formulas, or changes in feeding techniques works effectively for every case of colic. A review of the data studying these recommendations showed that use of hypoallergenic formulas, such as partially hydrolyzed or amino acid-based, may
 15 benefit only about 25% of infants (Lucassen, P L B J, et al. Infantile colic: crying time reduction with a whey hydrolysate: a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Pediatrics* 2000;106:1349-54; Estep, D C, et al. Treatment of infant colic with amino acid-based infant formula: a preliminary study. *Acta Paediatr* 2000;89:22- 7).

Physical strategies for the management of colic include physical movement of
 20 body positions to alleviate gas production/reflux, carrying, swaddling, applying abdominal pressure, or massaging the baby. Other methods include creating a sense of distraction to minimize infant awareness of colic such as taking an infant for a car ride, use of a car ride simulator, crib vibrator, or infant swings (Lipton E L. Swaddling and child care practice: historical, cultural and experimental observations.
 25 *Pediatrics* 1965;35:521-67; Byrne J M, Horowitz F D. Rocking as a soothing intervention: the influence of direction and type of movement. *Infant Behav Dev* 1981;4:207-18).

Another approach is to play recordings of sounds that supposedly soothe the baby. However, there is evidence in the medical literature that these methods do not
 30 work (Parkin P C, Schwartz C J, Manuel B A. Randomized controlled trial of three interventions in the management of persistent crying of infancy. *Pediatrics* 1993;92(2): 197- 201). These strategies, at best, are only marginally effective in abatement of colic symptoms.

Recommendations for behavioral interventions for the treatment of colic are the most inconsistent therapies available. Some authors advocate increasing sensory stimulation, while others advocate decreasing such stimulation (Balon A J. Management of infantile colic. *Amer Fam Physician* 1997; 55:235-242; Lucassen P L B J, Assendelft W J J, Gubbels J W, van Eijk T M, van Geldrop W J, Effectiveness of treatments for infantile colic: systematic review. *BMJ* 1998;316(5): 1563-9; and Carey W B, "Colic"--primary excessive crying as an infant-environmental interaction. *Pediatr Clin North Am* 1984;31:993-1005). Other recommendations include early response to crying, or allowing the infant to cry, offering a pacifier, implementation of a routine feeding schedule, using eye contact and interactive playing.

Pharmacologic intervention for the treatment of colic has led to the use of prescription and non-prescription medications. Currently employed prescription medications include belladonna alkaloids and opiates (paregoric), which may provide relief, but are fraught with risks including extra pyramidal symptoms, respiratory depression, and constipation. For example, anticholinergic drugs, similar in their effect to atropine, such as, Hyoscyamine (LEVISINE®, or GASTROSED®) and Dicyclomine dilate pupils, increase heart rate, decrease production of saliva, relieve spasms of gastrointestinal and urinary tracts, as well as bronchi. Although the anticholinergic drugs are the only prescription medications on the U.S. market that consistently have been shown to effectively treat infantile colic, unfortunately, up to 5% of treated infants may develop side effects, including breathing difficulties, apnea, seizures, syncope, asphyxia, coma and muscular hypotonia (Williams J, Watkins-Jones R. Dicyclomine: worrying symptoms associated with its use in some small babies (*BMJ* 1984;288:901; Myers J H, Moro-Sutherland D, Shook J E. Anticholinergic poisoning in colicky infants treated with hyoscyamine sulfate. *Am J Emerg Med* 1997;15:532-5). In addition, several cases of death have been reported in infants taking dicyclomine (Garriott J C, Rodriguez R, Norton L E. Two cases of death involving dicyclomine in infants. *Clinical Toxicol* 1984;22(5) :455-462).

Non-prescription medications that have been reported as effective treatment for infantile colic include several sedative or sleep- inducing drugs, including supraphysiologic (high dose) diphenhydramine (BENADRYL®), phenobarbital, chloral hydrate, and even alcohol. However, there is the potential for serious side effects associated with several of these agents in children with respiratory disease,

thus limiting their widespread use in treating colic (Balon A J. Management of infantile colic. *Amer Fam Physician* 1997;55:235-242; Gurry D. Infantile colic. *Australian Fam Phys* 1994;23(3):337-34632).

5 A safer non-prescription medication for treatment of colic has largely included the administration of simethicone or dimethylpolysiloxane, a non-absorbable, over-the-counter drug, which reduces the size of intestinal gas bubbles. Simethicone has a very safe profile and is frequently recommended, despite several studies demonstrating that effectiveness of simethicone on infantile colic is no better than placebo (Metcalf, T J, et al., *Pediatrics* 1994 July; 94(1) :29-34. Sferra, T J, et al.,
10 *Pediatr Clin North Am* 1996 April; 43(2):489-510. Danielson, B. et al., *Acta Paediatr Scand* 1985 May; 74(3):446-50. Colon, A R, et al., *Am Fam Physician* 1989 December; 40(6):122-4.). As a result, the most common treatment for colic today is to simply wait for the baby to grow out of the condition.

Therefore, there currently is a need for safe and effective compounds and
15 compositions and techniques that prove useful for treating colic in infants and young children. The compositions and methods of the present invention, respond to this need, providing product that can safely and effectively treat the symptoms associated with colic in infants. Patent application EP1364483A10 describes probiotics for treatment of gut- neuromuscular abnormalities, such as colic in babies. As a probiotic
20 the applicants mention several different bacterial species. This is in contrast to the invention herein where the probiotic to be most effective reducing colic is a specific lactic acid bacteria strain selected to be effective in increasing IL-10 levels and not a whole bacterial species, as the inventors of the present invention has showed that there are substantial differences in stimulation IL-10 production between strains also
25 of the same species.

In 2005 Savino demonstrated that supplementation with *L. reuteri* ATCC 55730 significantly improved colicky symptoms in breast-fed infants compared to the standard therapy with Simethicone within 7 days of treatment. The response rate to the treatment with *L. reuteri* was 95% while only 7% of infants responded to Simethicone. He presented results at the European Society for Pediatric Research (ESPR), Meeting August 31, 2005 - September 3, 2005, Siena, Italy (*Pediatr Res.* 2005;58(2): 411). Though Savino's results showed beneficial effects, he was not aware of the connection between certain strains promoting the production of IL-10 and the reduction of gut motility and consequently colic. The invention herein provides a method for selecting such best strains.

Collins described that disturbances of motor function produce a variety of symptoms that can arise in the context of inflammation or immune activation in various gut regions and embrace such common entities as esophagitis, gastritis, and idiopathic inflammatory bowel disease (IBD). These observations suggest that motility of the gut is also subject to the influence of the immune system. In this context, the motor system may play an important role in defending the gut against noxious stimuli present in the lumen (Collins S., *The Immunomodulation of Enteric Neuromuscular Function: Implications for Motility and Inflammatory Disorders.* Gastroenterology 1996;111:1683-1699). This notion is reflected, for example, by the observation of Vantrappen et al., who showed that bacterial overgrowth in the small intestine is accompanied by disruption of the normal cyclic pattern of interdigestive motility in the small intestine (Vantrappen G, Jannssens J, Hellemans J, Ghoois Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest* 1977; 9:1158-1168).

It has been well known for many years that elevated IL-10 levels suppress over-activated immune systems. It has also previously been demonstrated that gut motility is controlled by neurological signals, that are connected to the intestinal immune system and that colic is a consequence of increased gut motility, for example, due to bacterial overgrowth.

In industrialized countries, hygienic measures begin as early as the birthing process, which disrupts the neonates capacity to uptake the mother's gut microflora. As a consequence, different microflora are established in the infant. Instead of

harboring for example *Escherichia coli* and Lactobacilli the newborns are more often colonized with *Staphylococcus aureus* and other skin bacteria.

The inventors of the present invention has made the unexpected finding that while over-growth of skin bacteria over-activates the baby's immune system, leading to over-activated gut motility and colic as a consequence, a higher number of specific gut bacteria, such as *L. reuteri* DSM 17938, with capacity of promoting IL-10 production, leads to maturation of the TR system i.e. proliferation of CD4+CD25+TR cells. Up-regulation of CD4+CD25+ cells leads to calmed gut motility and consequently to beneficial effects on babies with colic.

On account of these findings, nonpathogenic bacterial strains were selected for IL-10 increasing properties, and surprisingly, this property of the strains were found to correlate with a decrease in infantile colic. The invention consequently refers to the use of *L. reuteri* DSM 17938 for the manufacture of a medicament for the prophylaxis and/or treatment of colic, and other strains selected the same way.

It is a further object of the invention to provide products containing said strains and for the administration to animals, including humans. Other objects and advantages will be more fully apparent from the following disclosure and appended claims.

SUMMARY OF THE INVENTION

The invention herein provides certain strains of lactic acid bacteria selected for their capability of promoting production of IL-10 and consequently proliferation of CD4+CD25+ TR cells, for prophylaxis and/or treatment of colic, a method of selecting such strains, and products containing such strains.

Other objects and features of the invention will be more fully apparent from the following disclosure and appended claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1. Proposed role for certain selected lactic acid bacteria strains in promoting the development of CD4⁺CD25⁺TR cells.

Figure 2a. IL10 production by DC cells in bar-graph form; **Figure 2b.** IL10 production by DC cells in a table.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION AND PREFERRED
EMBODIMENTS THEREOF

Colonization of skin bacteria in the gut and deficiency of TR-cells over-
5 activate the immune system of the new-born baby, leading to over-activated gut
motility and consequently colic. A larger number of specific gut bacteria cells, such as
L. reuteri DSM 17938, with capacity of promoting IL-10 production, leads to
maturation of the TR system i.e. proliferation of CD4+CD25+TR cells. Other
lactobacilli strains have previously been reported by many researchers to induce
10 production of IL-10 for example Rautava et al (above). Up-regulation of
CD4+CD25+ cells leads to calmed gut motility and consequently beneficial effects on
colic. Surprisingly the strains that bring about an increase in cytokine IL-10 levels
were found to be the same strains being able to decrease the average crying time
(Example 2).

15 The present invention herein comprises strains of lactic acid bacteria which
have been selected for their capability of reducing colic, including *L. reuteri* DSM
17938. Products such as foods, nutritional additives and formulations,
pharmaceuticals or medical devices containing whole cells or components derived
from these strains may be formulated as is known in the art, and generally include an
20 ingestible support as known plus the *Lactobacillus*-strain, or its derived component.

An *in vitro* study may be used as a method for selecting strains of lactobacilli
for their capability of stimulating the production of IL10 in monocyte-derived DCs
and thereby capacity to induce the development of CD4+CD25+TR cells (Example
1).

25 Data disclose an indication of a powerful stimulation of IL-10 by the specific
strains *L. reuteri* ATCC 55730 and *L. reuteri* DSM 17938, and that this regulation is
mediated by a substance released into the growth medium by these two specific
strains during late log/stationary growth phase. On the contrary, the two other strains
of *L. reuteri* were unable to stimulate relevant IL-10 production.

30 To confirm the clinical relevance of the selected strains for preventing or
treating colic further studies are performed in breast-fed infants with a diagnosis of
infantile colic.

The features of the present invention will be more clearly understood by

reference to the following examples, which are not to be construed as limiting the invention.

EXAMPLE 1.

5 Study of probiotic strains ability to promote IL-10 expression by monocyte-derived DC:

Immature DCs are generated from peripheral blood monocytes (Hilkens, C. M. U., P. Kalinski, M. de Boer, and Kapsenberg. 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-
10 helper cells toward the Th1 phenotype. Blood 90:1920) cultured in IMDM (Life Technologies, Paisley, U.K.) containing 10% FCS HyClone, Logan, UT), recombinant human (rh)GM-CSF (500 U/ml; Schering-Plough, Uden, The Netherlands), and rhIL-4 (250 U/ml; Pharma Biotechnologie Hannover, Hannover, Germany) (Kalinski, P., J. H. N. Schuitemaker, C. M. U. Hilkens, E. A. Wierenga,
15 and M. L. Kapsenberg. 1999. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. J. Immunol. 162:3231).

Strains to be tested in this example are *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730,
20 *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 4660 and *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 4964 obtainable from ATCC (Manassas, VA, USA and DSMZ, Braunschweig, Germany). Strains are cultured on Columbia agar (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) containing 6.25% sheep blood. Lactobacilli are incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 3 days, the number of bacteria is
25 determined by measuring the optical density at 620 nm (OD₆₂₀). Typically, an OD₆₂₀ of 0.35 corresponded to 1x10⁸ colony-forming units (cfu) for all test strains.

On day 6, maturation of immature DCs is induced by LPS (E coli; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) and the test *lactobacilli* in the presence of the combination of the cytokines IL-1 β (25 ng/mL) and TNF- α (50 ng/mL), together all used as
30 maturation factors (cytokines purchased from Peprotech, Rocky Hill, NJ).

IL-12, IL-10, and IL-6 cytokine production by mature DCs is determined by means of a 24-hour stimulation with CD40 ligand-expressing mouse plasmacytoma cells (J558), as described by Vieira PL, et. al. (Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA,

Kapsenberg ML, Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol* 2000;164:4507-12). Supernatants are harvested after 24 h, and the concentrations of IL-10 are measured by ELISA. For results see Figure 2. As can be seen from the results, there is a substantial difference in influence by different *Lactobacillus* strains in their ability to promote IL-10 production by the DCs.

EXAMPLE 2

Selected probiotic strains versus Simethicone in the treatment of infantile colic

Breast-fed infants with a diagnosis of infantile colic are recruited in the Department of Pediatric and Adolescence Science (Drottning Silvias University Hospital, Göteborg). Patients aged 21-90 days, adequate for gestational age with a birth weight between 2500 and 4000g, with colic symptoms satisfying the Wessel's criteria, and arisen almost 6 ± 1 days before the enrollment, are considered for inclusion in the study (Wessel MA, Cobb JC, Jackson EB, Harris GS, Detwiler AC. Paroxysmal fussing in infancy, sometimes called "colic". *Pediatrics* 1954; 14: 421-35). All infants enrolled are exclusively breast-fed in order to reduce variability in the intestinal microflora due to variations in the diet, which may in turn have influenced the response to the probiotic. Infants are excluded if they had clinical evidence of chronic illness or gastrointestinal disorders or if they had received either antibiotics or probiotics in the week preceding recruitment.

In this study, colicky infants are randomized to receive the probiotic or Simethicone in the following treatments:

(P1) *Lactobacillus reuteri* strain ATCC 55730 also called SD2112,

(P2) *Lactobacillus reuteri* strain DSM 17938 (deposited at DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig) on February 6, 2006, under the Budapest Treaty)

(P3) *Lactobacillus reuteri* strain ATCC PTA 4660 and

(S) Simethicone

L. reuteri is administered at a dose of 10^8 colony forming units (CFU) in 5 drops of a commercially available MCT-oil (medium chain tri-glyceride oil) suspension 30 min after feeding, once a day for 28 days. MCT oils occur naturally, and the most abundant source is coconut oil. Most MCT oil is refined from coconut

oil. MCT oil is a clear light colored liquid with no flavor and low viscosity. This oil suspension is stable for 21 months at 2-8°C (as documented by the manufacturer, BioGaia AB, Stockholm, Sweden) (alternative source of MCT oil is Akomed R, by Karlshamns AB, Karlshamn, Sweden). During the study, parents are instructed to

5 keep the product in the refrigerator when not in use. Simethicone (S) was given at a dose of 60 mg/day in 3mL of a commercially available solution (Mylicon Infants Gas Relief Drops, J&J, 7050 Camp Hill Rd., Fort Washington, Pennsylvania, 19034-2210, USA) after feeding, twice a day for 28 days. At the enrollment, all mothers are asked to follow a cows' milk-free diet as reported: avoidance of milk, yogurt, fresh and

10 strong cheese, cream, butter, biscuits. Adherence to the diet is monitored with a diet diary maintained for all the treatment period. At day 7, 14, 21 and 28 one of the researches examined the compliance to this diet.

The Ethical Committee at the Institution approved the study protocol and infants are enrolled in the study only after written informed consent was obtained

15 from the parents.

Follow-up visits

The day on which the pediatrician saw the infant for the first time is defined as Day -1. On this occasion each infant underwent a medical examination and the

20 parents were interviewed in order to obtain background data concerning type of delivery, birth weight and gestational age, family history of gastrointestinal disease and atopy. In particular, the last one is considered positive if the infants had one or more family members (mother, father and /or older sibling) with atopic eczema, allergic rhinitis or asthma. Moreover, any signs and symptoms of atopic disease

25 during the study period were recorded. Parents were also invited to record data concerning daily average crying time and number of colic episodes on the day after the recruitment (Day 0). The doctor randomly assigned the child to any of the study groups. Administration of study products began on Day 1.

Parents are given written information about the study and are asked to record

30 daily number of inconsolable crying episodes and their duration, stool consistency and frequency as well as any observed side effects (constipation, vomiting, cutaneous reactions, etc) starting from Day 0 up to Day 28, using a structured diary. In order to ensure that all the parents noted crying time in a uniform way and to ensure that the

infants are given the medication correctly, one of the researchers is always available by phone to help parents.

Each patient is re-examined by the same pediatrician on Days 1, 7, 14, 21 and 28.

5 Results

Of the 120 breast-fed colicky infants enrolled, 30 are randomly assigned to treatment with *L. reuteri* ATCC 55730 (P1), 30 are randomly assigned to treatment with *L. reuteri* DSM 17938 (P2), 30 are randomly assigned to treatment with *L. reuteri* ATCC PTA 4660 (P3) and 30 to Simethicone (S). No babies are withdrawn
10 because of any side effect related to the trial. The groups are similar with respect to age, birth weight, gender, type of delivery, family history of atopy or gastrointestinal diseases, and exposure to smoking.

The average crying time per day is similar in the treatment groups on Day 0, and on Day 1. Infants receiving *L. reuteri* ATCC 55730 (P1) and DSM 17938 (P2)
15 showed a significant reduction in daily crying time by Day 7 compared to infants treated with ATCC PTA 4660 and Simethicone(S). On Day 14, 21 and 28 crying time is significantly different between the four treatment groups. The difference between (P1) and (S) in average crying time per day from the beginning to the end of the study is 82 minutes, and the difference between (P2) and (S) in average crying time per day
20 from the beginning to the end of the study is 83 minutes on Day 28 (Table 1). As can be seen from the results are the four treatment groups fairly even before the administration of the test products. Already after 7 days there is a clear difference in favor of *L.reuteri* strains ATCC 55730 and DSM 17938 over the two other alternatives. After 28 days the difference has grown larger.

25

Table 1. Crying time (mean minutes per day) in *L. reuteri* and Simethicone groups.

Colicky infants N=120	<i>L. reuteri</i> ATCC55730 N= 30	<i>L. reuteri</i> DSM 17938 N= 30	<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 4660 N= 30	Simethicone N=30
--------------------------	---	---	--	---------------------

Day 0	206	203	204	205
Day 1	191	190	198	194
Day 7	147	148	171	172
Day 14	98	100	156	155
Day 21	75	77	150	148
Day 28	58	59	145	141

While the invention has been described with reference to specific embodiments, it will be appreciated that numerous variations, modifications, and embodiments are possible, and accordingly, all such variations, modifications, and embodiments are to be regarded as being within the spirit and scope of the invention.

What is Claimed Is:

1. A biologically pure culture of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
- 5 2. A composition comprising a biologically pure culture of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
3. A method of reducing infantile colic, comprising selecting a lactic acid bacterial strain that promotes IL-10 expression in humans, and
10 administering the bacterial strain to infants diagnosed with infantile colic.
4. The method of claim 3, wherein the lactic acid bacterial strain is a strain of *Lactobacillus reuteri*.
- 15 5. The method of claim 4, wherein the lactic acid bacterial strain is *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
6. A product for reducing infantile colic, comprising a strain of lactic acid bacteria selected for the ability to increase IL-10 levels.
- 20 7. The product of claim 6, wherein the lactic acid bacterial strain is a strain of *Lactobacillus reuteri*.
8. The product of claim 7, wherein the lactic acid bacterial strain is
25 *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
9. The product of claim 7, further comprising a medium chain tri-glyceride oil.

Figure 1

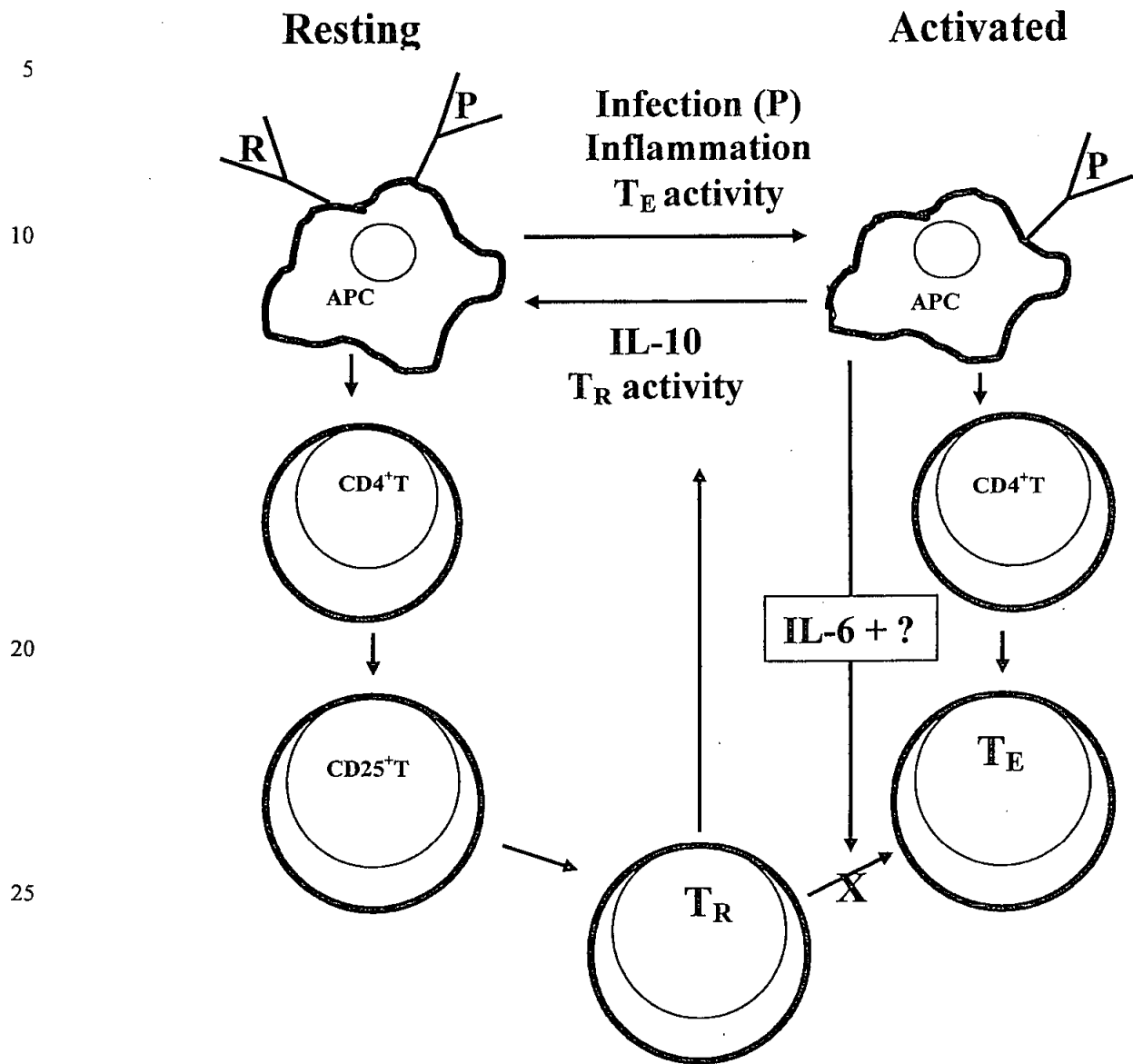
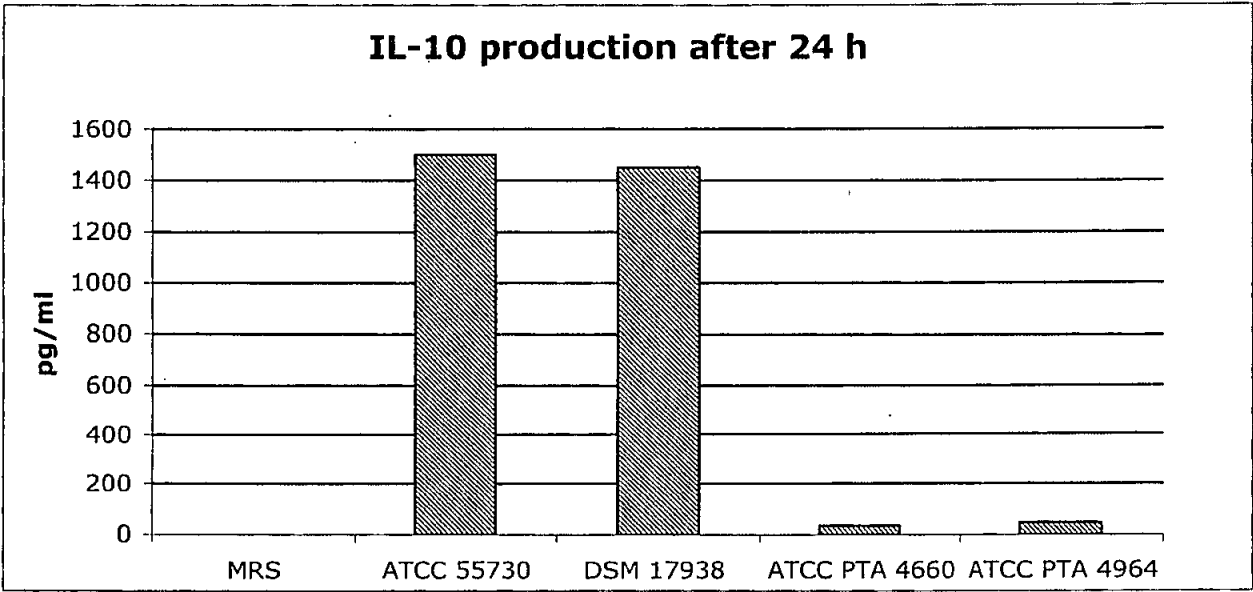


Figure 2a.



5

Figure 2b.

	IL-10 production (pg/ml)
MRS	
ATCC 55730	1500
DSM 17938	1450
ATCC PTA 4660	35
ATCC PTA 4964	47

PCT/SE2007/050371

PCT

Print Out (Original in Electronic Form)

0-1	Form PCT/RO/134 (SAFE) Indications Relating to Deposited Microorganism(s) or Other Biological Material (PCT Rule 13bis)	
0-1-1	Prepared Using	PCT Online Filing Version 3.5.000.193 MT/FOP 20020701/0.20.5.9
0-2	International Application No.	PCT/SE2007/050371
0-3	Applicant's or agent's file reference	204556
1	The indications made below relate to the deposited microorganism(s) or other biological material referred to in the description on:	
1-1	page	12
1-2	line	6
1-3	Identification of deposit	
1-3-1	Name of depositary institution	DSMZ DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroor- ganismen und Zellkulturen GmbH
1-3-2	Address of depositary institution	Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Germany
1-3-3	Date of deposit	30 January 2006 (30.01.2006)
1-3-4	Accession Number	DSMZ 17938
1-5	Designated States for Which Indications are Made	all designations

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

0-4	This form was received with the international application: (yes or no)	
0-4-1	Authorized officer	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

0-5	This form was received by the international Bureau on:	
0-5-1	Authorized officer	

IPRP Ch. 2

5119

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Albihns AB
P.O. Box 5581
114 85 STOCKHOLM

08 08. 08

PNA
Fa

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

07-08-2008

Applicant's or agent's file reference

204556

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/SE2007/050371

International filing date (day/month/year)

30-05-2007

Priority date (day/month/year)

05-06-2006

Applicant

BIOGAIA AB
et al

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. **REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the *PCT Applicant's Guide*.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see Also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the IPEA/

Patent- och registreringsverket
Box 5055
S-102 42 STOCKHOLM
Facsimile No. 08-667 72 88Telex
17978
PATOREG-S

Authorized officer

Monica Norlin

Telephone No. 08-782 25 00

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 204556	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/IPEA/416	
International application No. PCT/SE2007/050371	International filing date (day/month/year) 30-05-2007	Priority date (day/month/year) 05-06-2006
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC See Supplemental Box		
Applicant BIOGAIA AB et al		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>1</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) _____, containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 04-04-2008	Date of completion of this report 06-08-2008	
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 667 72 88	Authorized officer Nora Bucht/ELY Telephone No. +46 8 782 25 00	

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet) (April 2007)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/SE2007/050371

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: Cover sheet

International patent classification (IPC)

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 1/06 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 47/44 (2006.01)

C07K 14/335 (2006.01)

C12R 1/225 (2006.01)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/SE2007/050371

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the elements of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

- ☐ the international application as originally filed/furnished
- ☒ the description:
- pages 1 - 18 as originally filed/furnished
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the claims:
- pages _____ as originally filed/furnished
- pages* _____ as amended (together with any statement) under Article 19
- pages* 1 received by this Authority on 03.07.2008
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☒ the drawings:
- pages 1 - 2 as originally filed/furnished
- pages* _____ received by this Authority on _____
- pages* _____ received by this Authority on _____
- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) – see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (*specify*): _____

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/figs _____
- ☐ the sequence listing (*specify*): _____
- ☐ any table(s) related to the sequence listing (*specify*): _____

5. ☐ This report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2(e)).

* If item 4 applies, some or all of those sheets may be marked "superseded."

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/SE2007/050371

Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
------------------	--

1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>1 - 9</u>	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>1 - 9</u>	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1 - 9</u>	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations (Rule 70.7)

Documents cited in the International Search Report:

D1: Goswami A. G. et al. Role of Lactobacilli in the treatment of lactose intolerance in children with diarrhoea. Ind. J. Physiol. & Allied Sci. 1994, 48 (2): 83-87

D2: US2005271641 A1

D3: Weizman Z. et al. Effect of a Probiotic Infant Formula on Infections in Child Care Centers, Comparison of Two Probiotic Agents. Pediatrics 2005, 115 (1): 5-9

D4: US2004185032 A1

The cited documents represent the general state of the art.

Document D1 discloses Lactic acid bacteria (LAB) for treatment of lactose intolerance and colic, but not by the same mechanism; promoting IL-10 and up-regulating CD4+ CD25+ cells. Document D2 discloses the IL-10 promoting activity of Lactobacillus Reuteri ATCC 55730 (from which DSM 17938 is derived by removal of a plasmid), and the administration of this strain to breast-feeding women, which has beneficial effects on the baby. It is not disclosed that administration of this bacteria directly to the baby could reduce infantile colic. Further, document D3 discloses a method of preventing gut problems in infants by administration of the probiotic agent Lactobacillus reuteri 55730. This is not specified to infantile colic, neither is a probiotic effect transferred between related strains (as stated on page 8 column 2 line 31). Also, document D4 describes a pharmaceutical composition containing a probiotic agent for the treatment of colic, for

.../...

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.

PCT/SE2007/050371

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: BOX V

example a *Lactobacillus reuteri* strain. This strain is used in combination with other therapies and it is not mentioned that this strain promotes IL-10, hence probably not working by the same mechanism.

Thus, the invention defined in claims 1-9 is not disclosed by any of these documents.

The cited prior art does not give any indication that would lead a person skilled in the art to use an IL-10 expressing lactic acid bacterial strain for reducing infantile colic. Therefore, the claimed invention is not obvious to a person skilled in the art.

Accordingly, the invention defined in claims 1-9 is novel and is considered to involve an inventive step. The invention is industrially applicable.

The Swedish Patent Office
PCT International Application

I

PCT/SE2007/050371
03-07-2008

What is Claimed Is:

1. A biologically pure culture of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
- 5 2. A composition comprising a biologically pure culture of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
3. A lactic acid bacterial strain that promotes IL-10 expression in humans for reducing infantile colic.
- 10 4. The lactic acid bacterial strain according to claim 3, which is a strain of *Lactobacillus reuteri*.
5. The lactic acid bacterial strain according to claim 3, which is *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
- 15 6. A product for reducing infantile colic, comprising a strain of lactic acid bacteria selected for the ability to increase IL-10 levels.
- 20 7. The product of claim 6, wherein the lactic acid bacterial strain is a strain of *Lactobacillus reuteri*.
8. The product of claim 7, wherein the lactic acid bacterial strain is *Lactobacillus reuteri* DSM 17938.
- 25 9. The product of claim 7, further comprising a medium chain tri-glyceride oil.
- 30

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES.

PCT

NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DE
INFORME INTERNACIONAL PRELIMINAR
SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(PCT Regla 71.1)
Fecha de Envío: 07-08-2008

De: LA AUTORIDAD INTERNACIONAL DE EXÁMENES
PRELIMINARES

Para: Albiñns AB. P.O. Box 5581, 114 85 ESTOCOLMO.

Referencia del Solicitante o del Agente: **204556.**

NOTIFICACIÓN IMPORTANTE

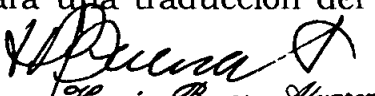
Solicitud Internacional No. PCT/SE2007/050371

Fecha Internacional de Presentación: 30-05-2007

Fecha de Prioridad 05-06-2006

Solicitante: **BIOGAIA AB y otros**

1. Por medio del presente se notifica al solicitante que esta Autoridad Internacional de Exámenes Preliminares transmite con el presente el informe internacional preliminar sobre patentabilidad y sus anexos, si hay alguno, establecidos en la solicitud internacional.
2. Una copia del informe y sus anexos, si hay alguno, está siendo transmitida a la Oficina Internacional para comunicación a todas las Oficinas elegidas.
3. Cuando cualquiera de las Oficinas elegidas lo requiera, la Oficina Internacional preparará una traducción del informe


 Hernán Baccara Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

al Inglés (pero no de ningún anexo) y transmitirá esa traducción a las Oficinas mencionadas.

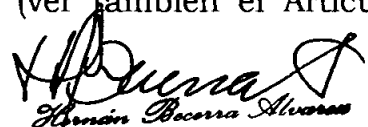
4. **RECORDATORIO**

El solicitante debe ingresar a la fase nacional ante cada Oficina elegida llevando a cabo ciertos actos (presentación de las traducciones y el pago de los derechos) dentro de los 30 meses siguientes a la fecha de prioridad (o mas tarde en algunas oficinas) (Artículo 39(1)) (ver también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional con el Formato PCT/IB/301)

Cuando se deba presentar la traducción de la solicitud internacional a una Oficina seleccionada, esa traducción debe contener la traducción de cualquiera de los anexos del informe internacional preliminar sobre patentabilidad. Es responsabilidad del solicitante preparar y suministrar esa traducción directamente a cada Oficina seleccionada que lo solicite.

Para mayores detalles sobre límites de tiempo aplicables y requerimientos de las Oficinas seleccionadas, ver el Volumen II de la Guía del Solicitante PCT.

Se llama la atención del Solicitante sobre el Artículo 33(5), el cual establece que los criterios de novedad, pasos de intención y aplicabilidad industrial descritos en los Artículos 33(2) al (4) sirven solamente para los fines de examen preliminar internacional y que “ningún Estado Contratante puede aplicar criterios adicionales o diferentes con el fin de decidir si, en ese Estado, la invención mencionada es patentable o no” (ver también el Artículo 27(5)).


Hernán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

Tales criterios adicionales se pueden relacionar, por ejemplo, con excenciones de patentabilidad, requerimientos para permitir la divulgación, claridad y soporte de las reivindicaciones.

Nombre y dirección de correo de la IPEA/

Patent-och registreringsverket

Box 5055

S-102 42 ESTOCOLMO

Facsímile No. 08-667 72 88

Funcionario Autorizado:

Mónica North

Teléfono No. 08-782 25 00


Hernán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME INTERNACIONAL PRELIMINAR SOBRE
PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)

Referencia del archivo del Solicitante o del Agente: **204556**

PARA ACCIONES POSTERIORES ver el formato PCT/IPEA/416

Solicitud Internacional No. PCT/SE2007/050371

Fecha de presentación internacional: 30-05-2007.

Fecha de Prioridad: 05-06-2006

Clasificación de Patente Internacional (IPC) o clasificación nacional
e IPC: Ver Casilla Suplementaria

Solicitante: **BIOGAIA AB y otros**

1. Este es el informe de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de acuerdo con el Artículo 36
2. Este INFORME consiste de un total de 5 hojas, incluyendo esta hoja de cubierta.
3. Este informe también está acompañado de ANEXOS que comprenden lo siguiente:
 - a. ☒ (enviado al Solicitante y a la Oficina Internacional) un total de 1 hoja así:
☒ Hojas de la descripción, reivindicaciones y/o planos los cuales han sido enmendados y son la base para este informe y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta


Hernán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas)

☐ Hojas que reemplazan envíos anteriores, las cuales esta Autoridad considera que contienen una enmienda que va más allá de la divulgación en la solicitud internacional como se ha presentado, como lo indica el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria.

- b. ☐ (*Enviado solamente a la Oficina Internacional*) un total de (indique el tipo y número de transportador electrónico _____ que contiene un listado de secuencia y/on tablas relacionadas con el mismo, solo en formato electrónico, como se indica en la Casilla Suplementaria que se Relaciona con Listados de Secuencia (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas)

4. Este informe contiene las indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- | | |
|--|--|
| ☒ Casilla No. 1 | Bases del Informe |
| ☐ Casilla No. 2 | Prioridad |
| ☐ Casilla No. 3 | El no establecimiento de opinión con relación a novedad, pasos de inventiva y aplicabilidad industrial |
| ☐ Casilla No. IV. | Falta de uniformidad en el invento |
| ☒ Casilla No. V. | Declaración razonada bajo el Artículo 35(2) con relación a la novedad, pasos de inventiva o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan tal declaración. |
| ☐ Casilla No. VI. | Ciertos documentos citados |



Hernán Bocerra Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

- [] Casilla No. VII. Ciertos defectos en la solicitud Internacional.
[] Casilla No. VIII. Ciertas observaciones en la solicitud internacional.

Fecha de presentación de la reivindicación: **04-04-2008**

Fecha de terminación de este informe: **06-08-2008**

Nombre y dirección de correo de IPEA/SE:

Patent-och registreringsverket

Box 5055

S-102 42 ESTOCOLMO

Facsímile No. 08-667 72 88

Funcionario Autorizado:

Nora Buche/ELY

Teléfono No. +46 8 782 25 00


Hernán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD.**

SOLICITUD INTERNACIONAL No. PCT/SE2007/050371

Casilla Suplementaria

En caso de que el espacio en cualquiera de las casillas precedentes no sea suficiente.

Continuación de: Hoja de Cubierta.

Clasificación de Patente Internacional (IPC)

A61K	35/74	(2006.01)
A61P	1/06	(2006.01)
C12N	1/20	(2006.01)
A61K	47/44	(2006.01)
C07K	14/335	(2006.01)
C12R	1/225	(2006.01)


RAMÓN BECERRA ALVARADO
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

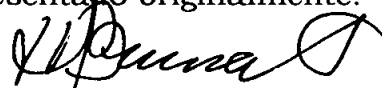
**INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD.**

SOLICITUD INTERNACIONAL No. PCT/SE2007/050371

Casilla No. I. Bases del Informe

1. Con relación al idioma, este informe se basa sobre:
 - ☒ La solicitud internacional en el idioma en que se presentó
 - ☐ Una traducción de la solicitud internacional a: _____ que es el idioma de una traducción suministrada con fines de:
 - ☐ Búsqueda Internacional (reglas 12.3(a) y 23.1(b))
 - ☐ Publicación de la Solicitud Internacional [Regla 12.4(a)]
 - ☐ Examen preliminar internacional [Reglas 55.2(a) y/o 55.3(a)]

2. Con relación a los elementos de la solicitud internacional, este informe se basa en *(hojas de reemplazo que han sido suministradas a la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el Artículo 14 que se mencionan en este reporte como "originalmente presentadas" y no se anexan a este informe.)*
 - ☐ La solicitud internacional como se ha presentado originalmente
 - ☒ La descripción:
 - Páginas 1-18 como se han presentado originalmente
 - Páginas ____ recibidas por esta Autoridad en _____
 - Páginas ____ recibidas por esta Autoridad en _____
 - ☒ Las Reivindicaciones:
 - Páginas ____ como se han presentado originalmente.



Hernán Becerra Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

Páginas ____ enmendadas (junto con cualquier declaración)

bajo el Artículo 19

Páginas 1 recibido por esta Autoridad en 03.07.2008.

Páginas ____ recibidas por esta Autoridad en ____

☒ Los Planos:

Páginas 1-2 como se presentaron originalmente

Páginas ____ recibidas por esta Autoridad en ____

Páginas ____ recibidas por esta Autoridad en ____

☐ Un listado de secuencia y/o cualquier tabla relacionada-Ver la Casilla Suplementaria relacionada con el Listado de Secuencia

3. ☐ Las enmiendas han ocasionado la cancelación de:

☐ La descripción, páginas ____

☐ Las reivindicaciones, Nos. ____

☐ Los Planos, Hojas Figuras ____

☐ El listado de secuencia (Especificar) ____

☐ Cualquier Tabla relacionada con el listado de secuencia (Especificar): ____

4. ☐ Este informe ha sido establecido como si algunas de las enmiendas anexas a este informe y que se mencionan más adelante no se hubieran hecho, ya que se ha considerado que ellas van más allá de la divulgación como se ha presentado, como se indica en la Casilla Suplementaria [Regla 70.2(c)]

☐ La descripción, páginas ____

☐ Las reivindicaciones Nos. ____

☐ Los planos hojas/figuras ____


Hernán Bocorra Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

☐ El listado de secuencia (especificar) _____

☐ Cualquier Tabla relacionada con el listado de secuencia (especificar) _____

5. ☐ Este informe se ha establecido teniendo en cuenta la rectificación de un error obvio autorizado por o notificado por esta Autoridad bajo la Regla 91 [Regla 70.2(e)]

- si se aplica el ítem 4, algunas o todas aquellas hojas se pueden marcar como "reemplazadas"



Ramón Bocerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

THE
FEDERAL
BUREAU OF
INVESTIGATION
UNITED STATES DEPARTMENT OF JUSTICE
WASHINGTON, D. C. 20535

MEMORANDUM FOR THE DIRECTOR, FBI

SUBJECT: [Illegible]

DATE: [Illegible]

TO: [Illegible]

FROM: [Illegible]

RE: [Illegible]

[Illegible text follows]

INFORME PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD.

SOLICITUD INTERNACIONAL No. PCT/SE2007/050371

Casilla No. V. Declaraciones razonadas bajo el Artículo 35(2) con relación a la novedad, paso de inventiva o aplicabilidad industrial; menciones y explicaciones que apoyan esa declaración

1. Declaración

Novedad (N) Reivindicaciones 1-9 SI
Reivindicaciones ____ NO

Paso de inventiva: Reivindicaciones 1-9 SI
Reivindicaciones ____ NO

Aplicabilidad Industrial: Reivindicaciones 1-9 SI
Reivindicaciones ____ NO

2. Citas y Explicaciones (Regla 70.7)

Documentos citados en el Informe Internacional de Búsqueda:

D1: Goswami AG y otros. Papel de los Lactobacilos en el tratamiento de intolerancia a la lactosa en niños con diarrea. Ind. J. Physiol. & Allied Sci. 1994, 48 (2): 83-87

D2: US2005271641 A1


Hernán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

D3: Weizman Z. y otros. Efecto de la Fórmula Probiótica Infantil sobre Infecciones en Centros de Cuidado de Niños, Comparación de Dos Agentes Probióticos. Pediatrics 2005, 115 (1): 5-9.

D4: US2004185032 A1

Los documentos citados representan lo más novedoso.

El documento D1 divulga las bacterias del ácido Láctico (LAB sigla en Inglés) para el tratamiento de la intolerancia a la lactosa y el cólico, pero no por los mismos mecanismos; promoviendo IL-10 y regulando hacia arriba las células CD4+ CD25+.

El documento D2 divulga el IL-10 que promueve la actividad de los Lactobacilos Reuteri ATCC 55730 (a partir de los cuales DSM 17938 se deriva mediante la remoción de un plásmido), y la administración de esta cepa a mujeres lactantes, la cual tiene el efecto benéfico sobre el bebé. No se divulga que la administración de esta bacteria directamente al bebé podría reducir el cólico infantil. Aún más, el documento D3 divulga un método de prevenir problemas intestinales en los infantes mediante la administración del agente probiótico Lactobacillus reuteri 55730. Esto no está especificado para cólico infantil, ni es un efecto probiótico transferido entre cepas relacionadas (como se menciona en la página 8, columna 2, renglón 31). También el documento D4 describe una composición farmacéutica que contiene un agente probiótico para el tratamiento del cólico, por ejemplo una cepa de Lactobacillus reuteri. Esta cepa se utiliza en combinación con otras terapias y no se menciona que esta cepa promueve IL-10, y por lo tanto probablemente no trabaje por el mismo mecanismo.



Hernán Baccara Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

Así, el invento definido en las reivindicaciones 1-9 no es divulgado por ninguno de estos documentos.

La novedad anterior citada no da ninguna indicación que pudiera conducir a una persona experta en la novedad para utilizar un IL-10 que exprese que la cepa bacteriana de ácido láctico para reducir el cólico infantil. Por lo tanto, el invento reivindicado no es obvio para una persona experta en la novedad.

De acuerdo con lo anterior, el invento definido en las reivindicaciones 1-9 es una novedad y se considera que involucra un paso de inventiva. El invento es industrialmente aplicable.



Hernán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

La Oficina Sueca de Patentes

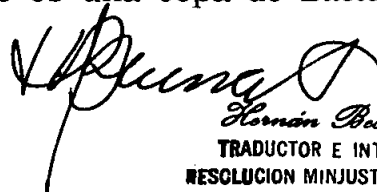
Solicitud Internacional PCT

PCT/SE207/050371

03-7-2008

Lo que está reivindicado es:

- 1 Un Cultivo biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri*
DSM 17938
- 5 2 Una composición que comprende un cultivo
biológicamente puro de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938
- 3 Una cepa bacteriana de ácido láctico que promueve la
expresión L-10 en humanos para reducir el cólico infantil
- 10 4 La cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con la
reivindicación 3, la cual es una cepa de *Lactobacillus*
reuteri
- 5 5 La cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con la
- 15 6 La cepa bacteriana de ácido láctico de acuerdo con la
reivindicación 3, la cual es *Lactobacillus reuteri* DSM 17938
- 6 Un producto para reducir el cólico infantil, que comprende
una cepa de bacterias de ácido láctico seleccionada por la
habilidad de incrementar los niveles de IL-10
- 20 7 El producto de la reivindicación 6, en el cual la cepa
bacteriana de ácido láctico es una cepa de *Lactobacillus*



Hernán Bocerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

reuteri

- 8 El producto de la reivindicación 7, en el cual la cepa bacteriana de ácido láctico es *Lactobacillus reuteri* DSM 17938

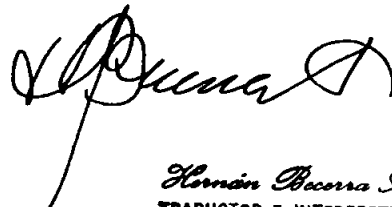
25

- 9 El producto de la reivindicación 7, además comprende una cadena mediana de aceite triglicérido.

30

PCT/SE2007/050371 2008-07-01

HOJA ENMENDADA



Hernán Bucara Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2007/050371

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: see extra sheet 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: A61K, C12N, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, TXTE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOSWAMI, A.G. et al, "Role of lactobacilli in the treatment of lactose intolerance in children with diarrhoea", Indian journal of physiology and allied sciences, 1994, vol. 48, no. 2, page 83 - page 87; page 1, line 10 - page 2, line 3; page 3, line 1 - line 5, table 1, 2, abstract --	3-9
X	US 20050271641 A1 (BJORKSTEN, BENGT ET AL), 8 December 2005 (08.12.2005), claims 1-3, 6, abstract, paragraphs (0009), (0018)-(0020), (0030)-(0033), (0063) --	1-2
Y	--	3-9
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family 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 application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 3 October 2007		Date of mailing of the international search report 03-10-2007
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Yvonne Siösteen/Eö Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE2007/050371

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEIZMAN, ZVI et al, "Effect of a Probiotic Infant Formula on Infections in Child Care Centers: Comparison of Two Probiotic Agents", Pediatrics, 2005, vol. 115, page 5 - page 9, abstract	1-2
Y	--	3-9
Y	US 20040185032 A1 (BURRELL, DAVID), 23 Sept 2004 (23.09.2004), claims 7, 17, 22, 27, 41, paragraphs (0020)-(0022), (0041), abstract	3-9
P,X	US 20060251634 A1 (KANG, HO-JIN ET AL), 9 November 2006 (09.11.2006), claims 1-3, abstract, paragraphs (0002), (0009)-(0010), (0016)	9
P,X	SAVINO, F. et al, "Lactobacillus reuteri ATCC 55730 versus simethicone in the treatment colic: A perspective randomised study:328", Pediatric Research, (online). August 2005, vol. 58, no. 2, page 411, (retrieved on 2007-09-27). Retrieved from the internet: <URL:http://www.pedresearch.org/pt/re/pedresearch/fulltext.00006450-200508000-00356.ht...>. see entire document	1-9
	-- -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2007/050371

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3-5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 3-5 relate to a method of treatment of the human or animal body by therapy /Rule 39.1(iv). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the bacterial strains.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/SE2007/050371

International patent classification (IPC)

A61K 35/74 (2006.01)
A61P 1/06 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61K 47/44 (2006.01)
C07K 14/335 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)

Download your patent documents at www.prv.se

The cited patent documents can be downloaded at www.prv.se by following the links:

- In English/Searches and advisory services/Cited documents (service in English) or
- e-tjänster/anförda dokument (service in Swedish).

Use the application number as username.

The password is **GOOXONNFYB**.

Paper copies can be ordered at a cost of 50 SEK per copy from PRV InterPat (telephone number 08-782 28 85).

Cited literature, if any, will be enclosed in paper form.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

01/09/2007

International application No.
PCT/SE2007/050371

US	20050271641	A1	08/12/2005	AU	2005249338	A	15/12/2005
				CA	2560472	A	15/12/2005
				CN	1942197	A	04/04/2007
				EP	1758604	A	07/03/2007
				NO	20070026	A	02/03/2007
				WO	2005117532	A	15/12/2005

US	20040185032	A1	23/09/2004	CA	2519439	A	30/09/2004
				CN	1761460	A	19/04/2006
				EP	1663187	A	07/06/2006
				WO	2004082669	A	30/09/2004

US	20060251634	A1	09/11/2006	WO	2006121384	A	16/11/2006

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud <Internacional No.

PCT/SE2007/050371

A: CLASIFICACIÓN DEL ASUNTO:

IPC: Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC sigla en Inglés) o tanto a la clasificación nacional como la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por símbolos de clasificación)

IPC: A61K, C12N, A61P.

Documentación buscada diferente a la documentación mínima hasta donde esos documentos hayan sido incluidos en los campos buscados.

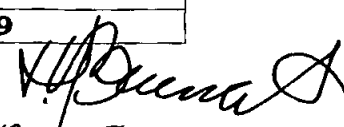
SE, DK, FI, NO clases igual a las anteriores

Bases Electrónicas de datos consultadas durante la búsqueda Internacional (nombre de la base de datos, y de ser posible, términos de búsqueda utilizados)

EPO-INTERNAL, WPI DATA, PAJ, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, EXTE.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS COMO RELEVANTES

Categoría	Citación de documentos, con indicaciones, donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante a la Reivindicación No.-
Y	GOSWAMI, A.G. y otros. "Papel de los lactobacilos en el tratamiento de intolerancia a la lactosa en niños con diarrea", Publicación India de Fisiología y Ciencias Aliadas, 1994, vol. 48, No. 2, página 83-página 87;página 1, renglón 10-página 2 renglón 3; página 3 renglón 1-renglón 5, Tabla 1, 2, resumen.	3-9
X	US 20050271461 A1 (BJORKSTEN, BENGT Y OTROS) Diciembre 8 de 2005. (08.12.2005), reivindicaciones 1-3, 6, resumen, párrafos (0009), (0018), (0020), (0030) - (0033), (0063)	1-2
Y		3-9


Herman Bocerra Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

[X] Se listan documentos posteriores en la continuación de la Casilla C.

[X] Ver anexo de la familia de la patente.

- Categorías especiales de documentos citados.

“A”. Documento que define generalidades de lo más novedoso los cuales no están considerados como de particular relevancia

“E”. Solicitudes o patentes anteriores pero publicadas en o después de la fecha internacional de presentación

“L” Documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones anteriores o el cual está citado para establecer la fecha de publicación de otra citación o por otra razón especial (como se especifique)

“O” Documento que se refiere a una revelación, uso exhibición u otro medio oral

“P” Documento publicado antes de la fecha internacional de presentación pero después de la fecha prioritaria de reivindicación.

“T” Documento posterior publicado después de la fecha internacional de presentación o de la fecha prioritaria que no está en conflicto con la solicitud pero está citado para entender el principio o teoría subyacente al invento.

“X” Documento de relevancia particular: El invento reivindicado no puede ser considerado como novedad o no puede ser considerado como que involucre un paso de inventiva cuando el documento se toma solo

“Y” Documento de relevancia particular: El invento reivindicado no puede ser considerado como que involucre un paso de inventiva cuando el documento se combina con uno o más diferentes de ese documento;

siendo tales combinaciones obvias para una persona entrenada en la novedad.

"&" Documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la terminación real de la búsqueda Internacional: Octubre 3 de 2007.

Fecha de envío del reporte de búsqueda Internacional: 03-10-2007.

Nombre y dirección de correo de ISA/Oficina Sueca de Patentes: Box 5055, S-102 42 ESTOCOLMO. Facsímile: +46 8 666 02 86

Funcionario autorizado: Ivonne Siösteen/Eö

Teléfono: +46 8 782 25 00

DOCUMENTOS CONSIDERADOS COMO RELEVANTES

Categoría	Citación de documentos, con indicaciones, donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante a la Reivindicación No.-
X	WEIZMAN, ZVI y otros, "Efecto de una Fórmula Infantil probiótica sobre las Infecciones en Centros de Ciudadado de Niños: Comparación de dos Agentes prebióticos" Pediatrías, 2005, vol 115, página 5 - página 9, resumen.	1-2
Y		3-9
Y	US 20040185032 A1 (BURELL, DAVID) Sept. 23 de 2004 (23.09.2004), reivindicaciones 7, 17, 22, 27, 41, parágrafos (0020)-(0022), (0041), resumen	3-9
P,X	US 20060251634 A1 (KANG, HO-JIN Y OTROS) Noviembre 9 de 2006 (09-11-2006)reivindicaciones 1-3, resumen, parágrafos (0002), (0009)-(0010), (0016)	9
P, X	SAVINO, F. y otros, "Tactobacillus reuteri ATCC 5573 contra la Simeticona en el tratamiento del cólico: La perspectiva de un estudio al azar: 328". PediatricResearch (on line). Agosto de 2005, vol 58, No. 2, página 411, recuperada (el 2007-09-27) Recuperada del Internet: <URL: http://www.pedresarch.org/pt/re/pedresearch/fulltext.00006450-200508000-00356.th...> ver todo el documento.	1-9

Casilla No. II. Observaciones donde ciertas reivindicaciones se encontraron como no escudriñable

Este reporte de búsqueda Internacional se ha establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.: 3-5 porque ellos se refieren a un asunto que no requiere búsqueda por parte de esta autoridad; ellos son:

Reivindicación 3-5 relacionada con un método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia /Regla 39.1(iv): No obstante se ha ejecutado una búsqueda para estas reivindicaciones. La búsqueda se ha basado en los presuntos efectos de las cepas bacterianas.

2. ☐ Reivindicaciones Nos: _____ porque ellas se relacionan a partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requerimientos prescritos hasta tal punto que no se puede ejecutar una búsqueda internacional fructífera, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones Nos: _____ porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera frases de la Regla 6.4(a).

Casilla No. III. Observaciones en las que falta unidad del Invento (Continuación del ítem 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples inventos en esta solicitud internacional, así:


Hernán Becerra Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

1. ☐ Como todas las búsquedas adicionales requeridas los honorarios fueron pagados oportunamente por el solicitante, este reporte de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones que se pueden buscar
2. ☐ Ya que todas las reivindicaciones que se pueden buscar se pudieron buscar sin esfuerzo que justifique un pago adicional, esta Autoridad no cobra el pago de ningún derecho adicional.
3. ☐ Ya que solo algunos de los honorarios de búsqueda fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre solo aquellas reivindicaciones por las cuales se pagaron tales honorarios, específicamente las reivindicaciones Nos:
4. ☐ No se requiere que el solicitante pague honorarios adicionales de búsqueda; en consecuencia este reporte de búsqueda internacional se restringe al invento mencionado inicialmente en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos:

Comentarios sobre la Objeción

☐ Los honorarios de búsqueda adicional estuvieron acompañados de la objeción del solicitante, cuando sea aplicable, el pago de los honorarios de objeción

☐ Los honorarios de búsqueda adicional estuvieron acompañados de la objeción del solicitante pero los honorarios aplicables de objeción no se pagaron dentro del tiempo límite especificado en la invitación

☐ Sin objeción acompañada del pago de honorarios adicionales. De búsqueda.



Hernán Baeza Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

Clasificación de Patente Internacional (IPC pos su sigla en Inglés)

A61K	35/74	(2006.01)
A61P	1/06	(2006.01)
C12N	1/20	(2006.01)
A61K	47/44	(2006.01)
C07K	14/335	(2006.01)
C12R	1/225	(2006.01)

Descargue sus documentos de patente en: www.prv.se

Los documentos de patente citados se pueden descargar en www.prv.se por los siguientes vínculos:

- En English/searches y servicios de documentos consejería/Citados (Servicio en Inglés)
- E-tjänster/anförda dokument (Servicio en Sueco)

Use el número de la solicitud como nombre del usuario

La palabra clave es **GOOXONNFYB**

Se pueden ordenar copias en papel a un costo de 50 SEK por copia desde PRV InterPat (Teléfono No. 07-782 28 85)

La literatura citada, si hay alguna, se incluirá en formato de papel.



Hernán Becerra Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

Información sobre miembros de la familia de patentes 01/09/2007

US	20050271641	A1	08/12/2005	AU	2005249338	A	15/12/2005
				CA	2560472	A	15/12/2005
				CN	1942197	A	04/04/2007
				EP	1758604	A	07/03/2007
				NO	20070026	A	02/03/2007
				WO	2005117532	A	15/12/2007
US	20040185032	A1	23/09/2004	CA	2519439	A	30/09/2004
				CN	1761460	A	19/04/2006
				EP	1663187	A	07/06/2006
				WO	20040182669	A	30/09/2004
US	20060251634	A1	09/11/2006	WO	2006121384	A	16/11/2006



Hernán Baeza Alvarado
 TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
 RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

INTERNATIONAL FORM

BioGaia AB
Tegnergatan 15
P.O. Box 3242
10364 Stockholm
SWEDEN

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: 17686s	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: DSM 17938
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 2006-01-30 (Date of the original deposit) ¹ .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>V. Weh</i> Date: 2006-02-06

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

DSMZ

**TRATADO DE BUDAPEST SOBRE EL RECONOCIMIENTO
INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMO SCON
FINES DE PROCEDIMIENTOS DE PATENTE.**

FORMATO INTERNACIONAL

**BioGaia AB
Tegnergatan 15
P.O. Box 3242
10364 Estocolmo
SUECIA**

**RECIBO EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL
Emitido de acuerdo con la Regla 7.1 por la
AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL
Identificada al final de esta página**

I. IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

Referencia de identificación dada por el DEPOSITANTE: **17686s**

Número de acceso dado por la AUTORIDAD DEPOSITARIA
INTERNACIONAL: **DSM 17938**

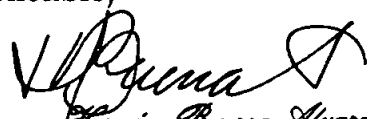
**II. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICA Y/O DESIGNACIÓN
TAXONÓMICA PROPUESTA.**

El Microorganismo identificado bajo el No. I anterior estaba
acompañado de:

[] una descripción Científica

[X] Una designación Taxonómica propuesta.

(Marque con una X lo que sea aplicable)


Germán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997

III. RECIBO Y ACEPTACIÓN

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el microorganismo identificado bajo el No. I anterior, el cual lo recibió el: 2006-01-30 (Fecha del Depósito Original)¹.

IV. RECIBO DE SOLICITUD DE CONVERSIÓN

El Microorganismo identificado bajo el No. I anterior fue recibido por la Autoridad Depositaria Internacional el ____ (Fecha del Depósito Original) y la solicitud de convertir el depósito original a un depósito bajo el Tratado de Budapest lo recibió en ____ Fecha de recibo de la solicitud de conversión)

V. AUTORIDAD DEPOSITARIA INTERNACIONAL

Nombre: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON
MUKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH

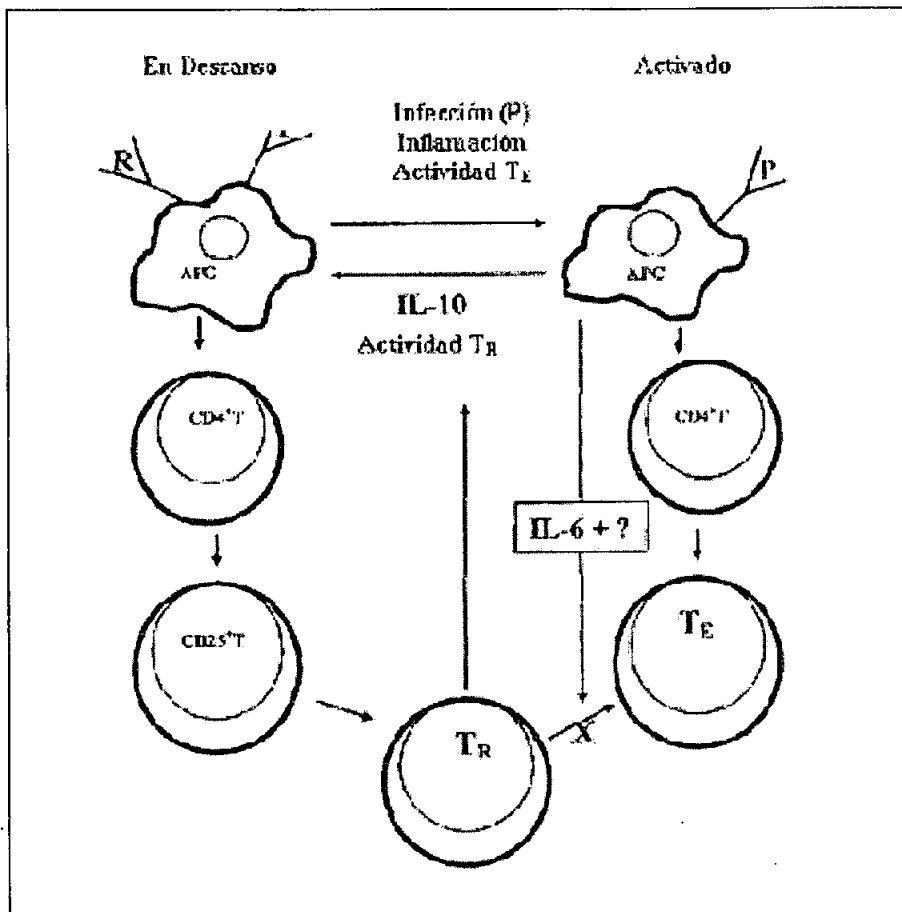
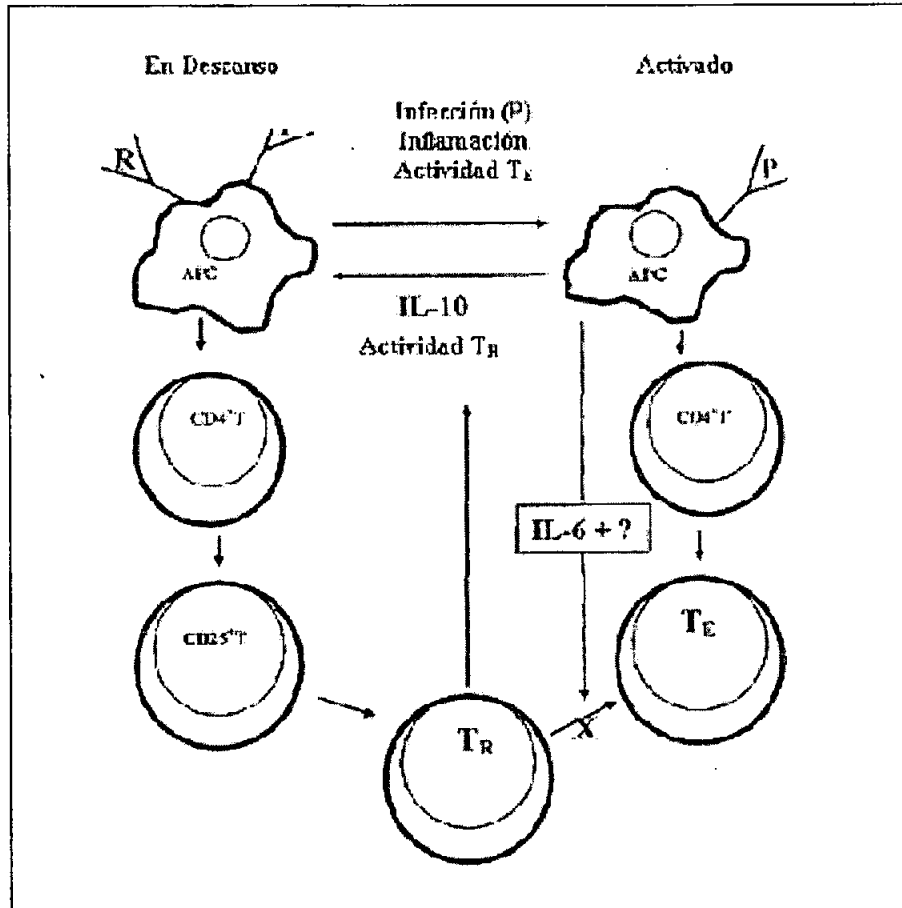
Dirección: Mascheroder Weg 1b
D-38124 Brainschweig

Firma(s) de la(s) persona(s) con poder de representar a la Autoridad Depositaria Internacional o del (los) funcionario(s) autorizado(s)

Firma ilegible. Fecha: 2006-02-06

1. *Donde aplica la Regla 6.4(d), la fecha es la fecha en la cual se adquirió el Status de la Autoridad Depositaria Internacional.*


Hernán Becerra Alvarado
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
RESOLUCION MINJUSTICIA No. 0631 DE 1.997





No. 08-129697- -00000-0000

Fecha: 2008-12-05 13:57:37 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 91

cio

SUPERINTENDENCIA

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]
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- ◆ Descripción de la invención [X]
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [X]
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA []

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 []

Sandra Rodríguez

Firma Responsable

Fecha Dic 05-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.cowww.sic.gov.co

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 93

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
BONILLA CASTRO MARTHA
Apoderado(a) y/o Representante de
BIOGAIA AB

REFERENCIA	Radicación No.	8 129697
	Solicitud internacional	PCT/SE2007/050371
	Fecha inicio fase nacional	05/01/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	7508
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

30 ENE. 2009

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand