

**Señor Director**  
**Dirección de Nuevas Creaciones**  
**Superintendencia de Industria y Comercio**  
**E. S. D.**

Expediente : **NC2018/0010950**

Referencia : Solicitud de la PCT patente de invención denominada  
**"USO DE PROBIÓTICOS PARA MEJORAR LA ABSORCIÓN DE  
PROTEÍNAS"**

Solicitante : **SOFAR S.P.A.**

## **I. RESPUESTA A REQUERIMIENTO**

**CAROLINA VERA MATIZ**, obrando como apoderada de la sociedad solicitante, oportunamente doy respuesta al requerimiento de Oficio No. 12567, notificado el día 19 de octubre de 2018 por su Despacho.

## **II. IDIOMA Y PRESENTACIÓN**

De acuerdo con su requerimiento, me permito anexar la traducción al castellano de la solicitud de la patente en referencia (Descripción, resumen, reivindicaciones).

Por otra parte y como complemento a los documentos aportados en la solicitud inicial, me permito allegar copia del documento de cesión de Derechos Patrimoniales debidamente firmado por las partes, en el que consta la cesión del derecho de la Patente de invención, del inventor (Andrea Biffi) al solicitante (SOFAR S.P.A.), conforme a lo establecido en el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

NFBC

Oficina Principal/Main Office  
Calle 70 A No. 11 - 43, Bogotá D.C. Colombia.  
Tel 571+3176650 /3127928 Fax 571+2126167/  
6062872

Quito, Ecuador  
Avda. 6 de Diciembre y La Niña - Edificio Multicentro  
Ofc.603  
Tel. (593) 2-2555208 Fax.(593) 2-2297528.

Web: [www.veraabogadossa.com](http://www.veraabogadossa.com) E-mail: [vera@veraabogadossa.com](mailto:vera@veraabogadossa.com)  
Miembros de/Members of: PRAGMA, EEIG.International network of law firms

De acuerdo con lo anterior considero que el requerimiento ha sido resuelto y por consiguiente solicito se ordene la inmediata publicación de la patente en la Gaceta de la Propiedad Industrial.

### **III. ANEXOS**

Me permito anexar los siguientes documentos:

- Traducción al castellano de la solicitud de la PCT patente de invención.
- Cesión del derecho patrimonial de la PCT patente de invención.

Cordialmente,



**CAROLINA VERA MATIZ**

C.C. No. 52.225.999

T.P. 91835

NFBC

Oficina Principal/Main Office  
**Calle 70 A No. 11 - 43, Bogotá D.C. Colombia.**  
Tel 571+3176650 /3127928 Fax 571+2126167/  
6062872

Quito, Ecuador  
**Avda. 6 de Diciembre y La Niña - Edificio Multicentro**  
**Ofc.603**  
Tel. (593) 2-2555208 Fax.(593) 2-2297528.

Web: [www.veraabogadossa.com](http://www.veraabogadossa.com) E-mail: [vera@veraabogadossa.com](mailto:vera@veraabogadossa.com)  
Miembros de/Members of: PRAGMA, EEIG.International network of law firms

## USO DE LOS PROBIOTICOS PARA UNA MEJOR ABSORCION DE LA PROTEINA

### Área Tecina

5

La presente invención está relacionada con los usos de los prebióticos preferiblemente una o más bacterias probióticas, para incrementar la absorción de las proteínas o la biodisponibilidad de estas, preferiblemente en individuos con requerimientos mayores de proteína y/o energía, especialmente adultos mayores, niños, mujeres embarazadas y atletas.

10

### Estado de la técnica

Las proteínas son una parte esencial de los organismos vivos y están formadas por la unión de moléculas más simples llamadas aminoácidos que se unen entre sí mediante enlaces peptídicos.

15

En el cuerpo humano hay alrededor de 50,000 moléculas de proteínas diferentes; Su función está determinada por su secuencia de aminoácidos.

A través de una serie de reacciones, nuestro cuerpo es capaz de sintetizar de forma autónoma las proteínas que necesita a partir de los aminoácidos individuales contenidos en los alimentos.

20

Muchas proteínas pertenecen a la categoría de enzimas, cuya función es catalizar las reacciones bioquímicas que son vitales para el metabolismo de los organismos.

Algunos tienen funciones estructurales y mecánicas, como la actina y la miosina en los músculos, el colágeno en los huesos y tejidos y como componentes del cito-esqueleto celular.

25

Otras proteínas son mediadores importantes en la transmisión de señales inter e intracelulares, en la respuesta inmune, en los mecanismos de adhesión celular y en el ciclo de división celular.

30

Dado que las proteínas no pueden ser absorbidas como tales y transportadas en la circulación, varias enzimas presentes en el lumen del tracto gastrointestinal intervienen en su digestión, descomponiéndolas en aminoácidos simples.

Durante el proceso digestivo, la mayoría de las proteínas se reducen completamente a aminoácidos simples.

35

La digestión de estas macromoléculas comienza en el estómago, donde la acción combinada del pepsinógeno y el ácido clorhídrico conducen a la

formación de oligopéptidos (cadenas cortas de aminoácidos de menos de diez unidades).

Esta digestión se completa con las proteasas intestinales de origen pancreático (vertidas en el duodeno) y producidas por las membranas del intestino en sí (situadas en el borde). Por esta razón, la digestión de proteínas es normal incluso después de la extirpación quirúrgica del estómago.

Las proteasas mencionadas anteriormente se dividen en endoproteasas (que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de las proteínas: quimiotripsina, elastasa, tripsina) y exopeptidasas (que hidrolizan el aminoácido terminal de la proteína: carboxipeptidasa, aminopeptidasa, dipeptidasa).

La digestión de proteínas se completa a nivel intestinal, gracias precisamente a la acción de las exopeptidasas, presentes en las microvillas del intestino delgado, que conducen a la formación de aminoácidos individuales, dipéptidos y tripéptidos, que pueden ser absorbidos en el sitio de la mucosa a través de un mecanismo symport  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$ .

Además, la flora intestinal presente en el intestino delgado, sobre todo los lactobacilos, contribuye a la digestión adicional de los péptidos al actuar también sobre los que no están completamente hidrolizados por las propias proteasas. Sólo una pequeña porción, equivalente a aproximadamente el 5%, llega al colon, donde también se somete a la acción de la flora bacteriana residente (lactobacilos y bífido-bacterias).

Una vez absorbidos, los aminoácidos individuales son transportados al hígado por portadores específicos y aquí pueden:

- ser utilizado como tal e intervenir en la respuesta inmune, en la síntesis de hormonas y vitaminas, en la transmisión de impulsos nerviosos, en la producción de energía y como catalizadores en muchos procesos metabólicos;
- participar en la síntesis de proteínas, un proceso inverso con respecto al digestivo que tiene el propósito de proporcionar al cuerpo materiales para el crecimiento, mantenimiento y reconstrucción de las estructuras celulares;
- si está presente en exceso, debe utilizarse con fines energéticos (gluconeogénesis) o convertirse en depósitos de grasa.

Sin embargo, una pequeña porción de las proteínas presentes en los alimentos no se absorbe y se elimina como tal con heces (5%).

Algunos péptidos compuestos por más de tres aminoácidos son absorbidos por la transcitosis y, como tales, pueden representar un elemento importante para el desarrollo de alergias e intolerancias alimentarias. El cuerpo humano descompone las proteínas diariamente mientras sintetiza otras. Este proceso

se define como la rotación de proteínas. En este proceso, algunos aminoácidos se oxidan, y el nitrógeno resultante se pierde en forma de urea, creatinina y otras sustancias derivadas. Con una ingesta normal de proteínas, solo el 4% de las proteínas que se vuelven pueden perderse.

- 5 Esta situación se puede determinar por la cantidad de proteína que se ingiere, es decir, por una ingesta diaria alta o baja de proteínas. El nitrógeno se dispersa principalmente a través de la orina, pero una parte también se elimina a través del sudor, las heces, la piel o las uñas.

El balance de nitrógeno compara la cantidad de nitrógeno (de las proteínas  
10 de la dieta) introducida en el cuerpo con el nitrógeno que se pierde. Si una persona ingiere más nitrógeno del que pierde, se dice que tiene un balance positivo de nitrógeno y deposita nitrógeno en el cuerpo. Si un individuo consume la misma cantidad de nitrógeno que pierde, se dice que se encuentra en una situación de equilibrio de nitrógeno, mientras que si un  
15 individuo pierde más nitrógeno del que consume, tiene un balance de nitrógeno negativo. y pierde proteínas del cuerpo.

Dado que el catabolismo o la descomposición de los aminoácidos es la causa principal de la pérdida de nitrógeno, la expulsión del nitrógeno es un indicador del catabolismo de los aminoácidos.

- 20 Los requerimientos de proteínas se definen por la cantidad de proteínas dietéticas necesarias para compensar y cubrir la pérdida de nitrógeno a diario, de modo que la persona mantenga un balance de nitrógeno. Esto se determina midiendo la excreción de nitrógeno cuando la persona sigue una dieta libre de proteínas. Dado que la ingesta de nitrógeno en la dieta es igual  
25 a cero, todo el nitrógeno expulsado se origina a partir de la descomposición y el catabolismo de las proteínas corporales. Como se mencionó, este valor supone la presencia de suficientes calorías en los alimentos y una proporción normal de carbohidratos en los alimentos.

Cuando nos referimos a un cuerpo sano normal, excluimos situaciones en las  
30 que se puede alterar el balance de nitrógeno, como el embarazo, la lactancia materna, la vejez, la actividad deportiva, la convalecencia, el crecimiento (niños, adolescentes) o las consecuencias de una dieta baja en calorías o anorexia.

- Los requerimientos de proteínas son la cantidad de proteínas que nuestro  
35 cuerpo necesita para satisfacer sus necesidades energéticas y mantener una buena salud.

Estas cantidades varían según varios factores, tales como: edad, género, estado de salud, actividad laboral o actividad deportiva. Los requerimientos de proteína promedio de una persona son inversamente proporcionales a la

edad. Por ejemplo: aproximadamente 2 g / kg / día en recién nacidos, aproximadamente 1,5 g / kg / día a los 5 años y aproximadamente 1,2 g / kg / día en la adolescencia - edad adulta.

Una proteína es digerible si una alta proporción de sus aminoácidos llega a las células del cuerpo para que puedan sintetizar las proteínas que necesitan.

Sin embargo, no todas las fuentes son utilizadas igualmente por el cuerpo y la biodisponibilidad de las proteínas en sí mismas varía según la fuente de proteínas. De hecho, casi el 100% de las proteínas animales sufren absorción intestinal, mientras que las proteínas vegetales muestran una absorción mucho menor: 52% para las lentejas, 70% para los garbanzos y 36% para el trigo.

Para aumentar la biodisponibilidad de las proteínas, el cuerpo descompone las grandes cantidades de moléculas de proteínas en sus unidades más simples, los aminoácidos.

En los adultos, una deficiencia de proteínas provoca una pérdida de vigor y fuerza, depresión mental, debilidad profunda, poca resistencia a las infecciones, retraso en la cicatrización de las heridas y recuperación lenta de las enfermedades. Incluso el cabello y las uñas se ven afectados, y este problema es más grave para los niños.

Como se señaló, para que el cuerpo pueda usar proteínas, deben descomponerse en aminoácidos o péptidos libres. Las proteínas en el yogur natural que contienen lactobacilos vivos llegan al proceso de digestión en condiciones ya tratadas previamente. De hecho, incluso antes de consumirse, las bacterias presentes han comenzado a transformar las proteínas, grasas y azúcares de la leche en componentes fácilmente digeribles. Como resultado, los nutrientes en el yogurt natural están inmediatamente disponibles y listos para ser utilizados por nuestro cuerpo.

El proceso de fermentación aumenta considerablemente el contenido de proteínas de los alimentos fermentados. Incluso los alimentos ricos en proteínas como la leche contienen más proteínas después de la fermentación que antes de que las bacterias interactuaran con ellos. Cuando comemos un alimento fermentado como el yogur, no solo tenemos las ventajas de las proteínas agregadas, sino que este alimento en una forma parcialmente biodisponible y previamente digerida también es muy apreciado por el cuerpo.

## **Objeto de invención**

Con el objetivo de satisfacer, en general, los requerimientos diarios promedio de proteínas y particularmente en condiciones en las que se altera el balance de nitrógeno, la presente invención propone el uso de uno o más probióticos para aumentar la biodisponibilidad de proteínas en el cuerpo o, en cualquier caso, la absorción. (asimilación) del mismo, preferiblemente en el sitio intestinal.

## **Descripción detallada del alcance principal de la invención**

- Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de probióticos para aumentar la absorción y / o la biodisponibilidad de proteínas y / o de derivados de proteínas en un individuo.
- Preferiblemente, el individuo tiene una necesidad de una mayor absorción / biodisponibilidad de proteínas, por ejemplo, como en el caso de personas mayores, niños, mujeres embarazadas o atletas. En otras palabras, dichos probióticos pueden tomarse para aumentar la ingesta de proteínas y / o energía cada vez que surja la necesidad de un individuo.
- En este contexto “probióticos” se refieren de conformidad con lo establecido por la FAO (Organización de Agricultura y Comida- Naciones Unidas) y la Organización Mundial de la Salud (WHO): *"Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del consumidor"*.
- En otras palabras, los probióticos son microorganismos que demuestran poder, una vez ingeridos en cantidades adecuadas, realizar funciones que son beneficiosas para el cuerpo, haciendo eco de la definición de las dos organizaciones mencionadas anteriormente.
- En el contexto de la presente invención, los requisitos de proteínas significan la cantidad de proteínas que nuestro cuerpo necesita para satisfacer sus necesidades energéticas y mantener una buena salud.
- Estas cantidades varían según varios factores, tales como: edad, género, estado de salud, actividad laboral o actividad deportiva.
- Los requerimientos de proteína promedio de una persona son inversamente proporcionales a la edad. Por ejemplo: aproximadamente 2 g / kg / día en recién nacidos, aproximadamente 1.5 g / kg / día a los 5 años y aproximadamente 1.2 g / kg / día en la adolescencia - edad adulta
- Preferiblemente, las proteínas a las que se hace referencia particularmente en el contexto de la presente invención se seleccionan entre proteínas

animales y vegetales, que incluyen: clara de huevo, proteínas de suero lácteo, preferiblemente WPI 90% y WPC 80%; proteínas de lupino, preferiblemente protilup 450; proteínas de soja; proteínas de garbanzo y proteína de caseinato, preferiblemente proteína de caseinato de calcio y proteínas de arroz.

De hecho, el solicitante ha encontrado sorprendentemente que después de la administración de probióticos, en particular de bacterias del género *Lactobacillus*, preferiblemente cepas *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572) y / o *Lactobacillus paracasei* LPC-S01, se observa un aumento del 10-20% en la absorción de proteínas / energía / biodisponibilidad en el individuo que los ha tomado. En particular, se ha observado el efecto de las proteínas de caseinato y / o suero de leche.

Para una realización adecuada de la presente invención, los probióticos son bacterias y / o levaduras y / u otros microorganismos, tomados individualmente o en combinación.

Las bacterias que son particularmente preferidas para los fines de la presente invención pertenecen a un género seleccionado entre: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* y combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, las bacterias pertenecen al género *Lactobacillus* y / o *Bifidobacterium*.

En particular, el *Lactobacillus* se selecciona de entre: *paracasei* *Lactobacillus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *aviarios* de *Lactobacillus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *coryniformis* de *Lactobacillus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *kefiranofaciens* de *Lactobacillus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *collinoides* de *Lactobacillus*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis* y combinaciones de los mismos.

Más preferiblemente, los lactobacilos son de la especie *Lactobacillus acidophilus*, *rhamnosus* o *paracasei*. Aún más preferiblemente, *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572) y / o *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (depositadas por SOFAR SpA en la Colección alemana de

microorganismos del instituto DSMZ de Leibniz el 16/01/2016, con número de depósito DSM 26760). Se pueden administrar individualmente o en varias combinaciones.

La cepa bacteriana L. casei DG® fue depositada por SOFAR S.p.A. en la  
5 Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París el 05/05/1995, con el número de depósito CNCM I-1572. Inicialmente, la cepa tenía la designación de *Lactobacillus casei* DG sub.casei.

Claramente, también se puede hacer uso de otras bacterias que son capaces de colonizar de manera estable el intestino, quitándole espacio a las  
10 bacterias patógenas.

La cantidad de microorganismo administrado, en particular para las bacterias, es el mínimo suficiente para obtener una colonización temporal del intestino, preferiblemente al menos 10<sup>9</sup> unidades de microorganismo, bacteria, por día. Los microorganismos, preferiblemente las bacterias, pueden administrarse  
15 vivos y, por lo tanto, la composición también se puede definir como un probiótico. Alternativamente, los microorganismos que se pueden usar están muertos o tyndalizados (proceso de John Tyndal).

En una realización adicional, los microorganismos están en forma de un lisado o extracto y, por lo tanto, la composición también se puede definir  
20 como un paraprobiótico, o un solo componente, o varios componentes del mismo, presentes en el nivel de la pared bacteriana.

En una realización adicional de la invención, la composición comprende además los bioproductos metabólicos generados por los microorganismos definidos como posbióticos, y / o cualquier otro producto de derivación  
25 bacteriana. Por lo tanto, la composición de la presente invención también es un probiótico o paraprobiótico o posbiótico conocido o supuesto o un componente de la pared bacteriana.

En general, los microorganismos comprendidos en la composición de la presente invención son microorganismos individuales o combinaciones de  
30 cualquier especie microbiana especificada en la lista de Presunción cualificada de seguridad (QPS) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)

En una realización de la presente invención, los probióticos pueden administrarse por vía oral, por ejemplo en forma sólida, preferiblemente en  
35 forma de píldoras, cápsulas, comprimidos, polvo granular, cápsulas de cubierta dura, gránulos que se disuelven por vía oral, sobres, pastillas o viales bebibles.

Alternativamente, en forma líquida, por ejemplo, como un jarabe o bebida, o bien se agregan a los alimentos, por ejemplo, al yogur, queso o jugo de

frutas.

Alternativamente, están formulados en una forma capaz de ejercer una acción tópica, por ejemplo a través de enema o como una crema.

También se pueden administrar en combinación con aminoácidos, suplementos, vitaminas, oligoelementos como el zinc y el selenio, enzimas y /  
5 o sustancias prebióticas, como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), inulina, goma guar o combinaciones de los mismos.

El solicitante ha encontrado que los probióticos en general, y en particular las  
10 bacterias del género *Lactobacillus* y / o *Bifidobacterium*, son muy eficaces para dividir proteínas en diferentes péptidos en comparación con lo que ocurre en virtud de la acción de las enzimas digestivas por sí solas. También actúan sobre moléculas que no están completamente hidrolizadas por las proteasas humanas, pero cuya hidrólisis podría completarse con la  
15 intervención microbiana.

Los péptidos generados en virtud de su acción, individual o combinada, son absorbidos más fácilmente por el cuerpo que la proteína de partida. El resultado final que se obtiene por la acción de los probióticos es un aumento / mejora de la absorción o, en cualquier caso, una mayor biodisponibilidad de  
20 las proteínas para un individuo que las necesita.

#### EJEMPLO I

En particular, se estableció un estudio in vitro con el fin de evaluar el papel de las bacterias probióticas en la absorción de proteínas; En particular, se probaron las proteínas utilizadas por los atletas.

25 Las bacterias probióticas utilizadas específicamente a modo de ejemplo ilustrativo son:

- L. casei DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM I1572); y
- *Lactobacillus paracasei* LPC-S01.

The bacteria were used individually or in combination.

30 La acción individual o combinada se verificó sobre diversos sustratos proteicos. En particular en:

- Clara de huevo
- Proteínas de suero lácteo aislado, (WPI) 90% y WPC 80%.
- Proteínas Lupin, Protilup 450
- 35 • proteínas de soja
- Proteínas de garbanzo
- Caseinato de calcio
- Proteínas de arroz

Como un ensayo indirecto para evaluar la acción de una proteasa, se evaluó

la proteólisis global midiendo la absorbancia a 280 nm.

Este procedimiento se basa en la cuantificación de péptidos solubles después del tratamiento con TCA para determinar la absorbancia a 280 nm, con respecto a los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp). Obviamente, este método da una indicación relativa, ya que se basa en el supuesto de que existe una distribución promedio de péptidos que contienen estos residuos. Se debe tener en cuenta que existe una proporcionalidad directa entre los valores de absorbancia y la concentración de la solución considerada. Por lo tanto, en este caso, los valores altos de absorbancia indican altas concentraciones de los péptidos que se generan debido a la acción de las proteasas y de las cepas probadas. Sin embargo, esta técnica tiene un límite en el sentido de que no se detectan péptidos muy pequeños y, por lo tanto, el efecto puede ser subestimado.

A modo de ejemplo, en la Tabla I presentamos los resultados obtenidos con proteínas de suero de leche aislado (WPI) las cuales muestran diferencias de alrededor del 10-20%.

Tabla I

| Tratamiento     | WPI            |
|-----------------|----------------|
| Pepsina         | 0.80<br>±0.048 |
| pepsina + pan   | 2.29<br>±0.180 |
| pep + pan + SO1 | 2.81<br>±0.191 |
| pep + pan + DG  | 2.45<br>±0.192 |
| Mezcla compleja | 2.51<br>±0.141 |

Además, también se cuantificaron los péptidos solubles en ácido tricloroacético (TCA) generados por la acción proteolítica en caseinato con y sin probióticos. Específicamente, los péptidos que mostraron ser solubles después del tratamiento con ácido tricloroacético (TCA) se separaron por Cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa. (RP-HPLC).

Los resultados obtenidos de las separaciones cromatográficas, expresadas en términos del área total subtendida por el cromatograma con detección a 220 nm, se presentan en la Tabla II a continuación.

Table II

| Condiciones de proteolisis |                          |      |
|----------------------------|--------------------------|------|
|                            | Sustrato de caseinato    |      |
|                            | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    |
| pep + pan                  | 303                      |      |
| pep + pan + SO1            | 322                      | + 6% |
| pep + pan + DG             | 329                      | + 9% |

Los valores mostrados se calcularon a partir de los gráficos de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). En particular, se muestra el área total subtendida por los picos relacionados con los péptidos producidos durante las pruebas de hidrólisis en las diferentes condiciones utilizadas en el ensayo y las variaciones porcentuales relativas al tratamiento con pepsina y pancreatina (pero sin microorganismos) se indican para varias muestras. Los resultados muestran un aumento de la proteólisis en presencia de ambos microorganismos.

Como se dijo anteriormente, la actividad proteolítica medida de esta manera podría, sin embargo, subestimarse debido a la producción de fragmentos de proteína muy pequeños que no se adhieren a la columna matriz y, por lo tanto, se pierden en la fracción eluida antes de la aplicación del gradiente cromatográfico y que en consecuencia, no son cuantificables. O bien, también podría ocurrir que el uso de probióticos aumente la acción proteolítica de tal manera que se fragmenten las proteínas en péptidos que sean tan pequeños que se eluyan inmediatamente de la columna.

EJEMPLO II

Las pruebas de proteólisis se realizaron utilizando la cepa L casei SO1 o DG individualmente.

Los sustratos utilizados fueron:

- 5
- proteínas séricas de leche, WPI 90%, lote R2522, suministrado por SOFAR
  - proteínas de arroz aisladas suministradas por SOFAR,
  - proteínas séricas concentradas, WPC 80%, suministradas por SOFAR
  - proteínas de garbanzo, lote 20150430, suministrado por SOFAR

Evaluación de la proteólisis total midiendo la absorbancia a 280 nm

- 10
- Las condiciones de actividad proteolítica son las mismas que las utilizadas en las pruebas experimentales anteriores.

A modo de ejemplo mostramos los resultados obtenidos en la Tabla III.

Tabla III

| Tratamiento     | WPI  | WPC  | ARROZ |
|-----------------|------|------|-------|
| pep + pan       | 2.45 | 2.11 | 2.06  |
| pep + pan + SO1 | 2.48 | 2.12 | 2.09  |
| pep + pan + DG  | 2.44 | 2.09 | 2.07  |
| pep + pan + mix | 2.50 | 2.11 | 2.11  |

5 Evaluación de la proteólisis total por separación por RP-HPLC.

Con este método hemos querido cuantificar los péptidos generados por la acción proteolítica. Específicamente, los péptidos que demostraron ser solubles después del tratamiento con Ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%,  
10 que constituye la fase móvil utilizada para la separación por HPLC, se separaron mediante RP-HPLC. En estas condiciones, de hecho, la mayor parte del material de proteína que se puede separar y cuantificar midiendo la absorbancia a 220 nm y 280 nm permanece soluble.

Los resultados obtenidos de las separaciones cromatográficas, expresadas  
15 en términos del área total subtendida por el cromatograma con detección a 220 nm o a 280 nm, se presentan en la Tabla IV. Se debe observar que la cuantificación a 220 nm permite observar también la presencia de péptidos que no contienen los residuos aromáticos (Phe, Tyr, Trp), que en cambio se cuantifican cuando la absorbancia se mide a 280 nm.

20 Los valores mostrados se calcularon a partir de los gráficos de HPLC. En particular, se muestra el área total subtendida por los picos relacionados con los péptidos producidos durante las pruebas de hidrólisis en las diferentes condiciones utilizadas en el ensayo, y las variaciones porcentuales relativas al tratamiento con pepsina y pancreatina (pero sin microorganismos) se  
25 indican para las diversas muestras.

Los resultados presentados en las Tablas IV y V muestran que las cepas L.casei DG y S01 tienen una actividad proteolítica comparable con respecto al sustrato de proteína del suero. En el caso de las proteínas del arroz, por otro lado, se debe tener en cuenta que solo la cepa L.casei S01 muestra una  
30 actividad proteolítica. La cepa L.casei DG, por el contrario, es más activa con respecto al sustrato de proteína de garbanzo.

Tabla IV

| Tratamiento     | Substrato                |      |                          |      |                          |      |                          |      |
|-----------------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|
|                 | WPI                      |      | WPC                      |      | Arroz                    |      | Garbanzos                |      |
|                 | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    |
| pep + pan       | 125                      |      | 98                       |      | 78.2                     |      | 107                      |      |
| pep + pan + SO1 | 128                      | + 3% | 101                      | + 3% | 80.2                     | + 3% | 107                      | -    |
| pep + pan + DG  | 131                      | + 5% | 102                      | + 4% | 78.4                     | -    | 111                      | + 4% |
| pep + pan + mix | 129                      | + 3% | 104                      | + 6% | 80.6                     | + 3% | 114                      | + 7% |

Tabla V

| Tratamiento     | Substrato                |      |                          |      |                          |      |                          |      |
|-----------------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|------|
|                 | WPI                      |      | WPC                      |      | Arroz                    |      | Garbanzo                 |      |
|                 | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    | Área (*10 <sup>6</sup> ) | Δ    |
| pep + pan       | 4.5                      |      | 3.6                      |      | 5.1                      |      | 11.9                     |      |
| pep + pan + SO1 | 4.9                      | + 9% | 3.9                      | + 8% | 5.4                      | + 6% | 12.0                     | -    |
| pep + pan + DG  | 4.8                      | + 7% | 3.8                      | + 6% | 5.2                      | + 2% | 12.2                     | + 3% |
| pep + pan + mix | 4.9                      | + 9% | 3.9                      | + 8% | 5.4                      | + 6% | 12.6                     | + 6% |

## REIVINDICACIONES

1. Uso de probióticos para aumentar la absorción y / o la biodisponibilidad de proteínas y / o de energía en un individuo
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos probióticos se seleccionan de: bacterias, levaduras y otros microorganismos, tomados individualmente o en combinación; preferiblemente las bacterias pertenecen a al menos un género seleccionado de: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*,  
10 *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* y *Enterococcus*.
3. El uso de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde dichas bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* se seleccionan de:  
15 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*,  
20 *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*,  
25 *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus sanfranciscensis*, preferiblemente seleccionadas de: *Lactobacillus acidophilus*, *rhamnosus* o *paracasei*.
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,  
30 en el que dichas bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* se seleccionan de cepas L. *casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-1572) y / o *Lactobacillus paracasei* LPC-S01 (DSM 26760 DSMZ) ).
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dichos probióticos se toman diariamente por dicho individuo en  
35 una cantidad suficiente para permitir la colonización intestinal temporal, preferiblemente al menos 10<sup>9</sup> unidades de microorganismo, preferiblemente de bacteria, por día.

6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicho individuo se selecciona de entre: ancianos, niños, mujeres embarazadas y atletas.
- 5 7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las proteínas, animales y / o vegetales, se seleccionan de: clara de huevo, proteínas de suero lácteo, preferiblemente WPI 90%; proteínas de lupino, preferiblemente protilup 450; proteínas de soja; proteínas del garbanzo; Proteína de caseinato, preferiblemente proteína de caseinato de calcio y proteínas de arroz.
- 10 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que los probióticos, preferiblemente las bacterias, se administran vivos, preferiblemente por vía oral, más preferiblemente en forma sólida, incluso más preferiblemente como píldoras, cápsulas, tabletas, polvo granular. , cápsulas de cáscara dura, gránulos solubles, sobres o pastillas; o como un líquido, preferiblemente como un jarabe o bebida, o se agregan a los alimentos, preferiblemente yogur, queso o jugos de frutas.
- 15 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que los probióticos están formulados para actuar tópicamente, preferiblemente a través de enema o como una crema..
- 20 10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que los probióticos se administran en combinación con aminoácidos, suplementos, vitaminas, oligoelementos, preferiblemente zinc y / o selenio, enzimas y / o sustancias prebióticas, preferiblemente fructooligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), inulina, goma guar o una combinación de los mismos.
- 25

## RESUMEN

La presente invención se refiere al uso de probióticos, preferiblemente una o más bacterias probióticas, para aumentar la absorción de proteínas o la biodisponibilidad de las mismas, preferiblemente en individuos con mayores  
5 requerimientos de proteínas y / o energía tales como personas mayores, niños, mujeres embarazadas o atletas.

## CESIÓN DE DERECHOS PATRIMONIALES

Entre la suscrita a saber; **Andrea Biffi**, identificada como aparece al pie de su firma, obrando en nombre propio, domiciliada en **Via Mulino Vecchio 146 24059 URGANO (BERGAMO) Italia**, por una parte, que para los efectos aquí se llamará **LA CEDENTE** y **XXXXXXXXXXXXXXXXXX**, identificado como aparece al pie de su firma, obrando en representación de la sociedad **SOFAR S.P.A.**, domiciliada en **VIA FIRENZE 40 20060 TREZZANO ROSA (MILANO)**, IT por la otra parte, se llamará **EL CESIONARIO**, hemos convenido en celebrar contrato de **CESIÓN DE DERECHOS DE LA PATENTE DE INVENCION DENOMINADA:**

### USO DE LOS PROBIOTICOS PARA UNA MEJOR ABSORCION DE LA PROTEINA

Que se rige por las siguientes cláusulas:

**PRIMERA: LA CEDENTE**, cede en favor de **EL CESIONARIO**, los derechos que tienen sobre la patente de invención en referencia.

**SEGUNDA:** La cesión de la patente de invención a la que se refiere el presente documento surge efectos a partir de la fecha de su firma.

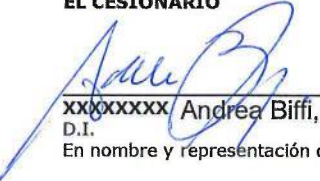
**TERCERA: LA CEDENTE y EL CESIONARIO**, en forma conjunta, otorgan poder especial, amplio y suficiente a los doctores **CAROLINA VERA MATIZ**, Abogada en ejercicio con T.P.A. No. 91.835 y **JORGE E. VERA VARGAS**, Abogado en ejercicio, con T.P.A. No. 12122, para que continúen el trámite, ante la entidad oficial competente, de la solicitud de la patente de invención aquí referida, actuaciones para las cuales se le confieren las facultades de recibir, transigir, conciliar, desistír, sustituir, revocar sustituciones, reasumir y renunciar. Una vez leído en su integridad el presente documento, fue aprobado por ambas partes.

Para constancia se firma en dos ejemplares del mismo tenor, en la ciudad de **XXXXXXXX** a los 24 días del mes de septiembre del año 2018

**LA CEDENTE**

  
Andrea Biffi  
D.I.

**EL CESIONARIO**

  
XXXXXXXXX Andrea Biffi, Chief Executive Officer  
D.I.  
En nombre y representación de la sociedad **SOFAR S.P.A.**

## PATRIMONIAL RIGHTS ASSIGNMENT

Between the undersigned, namely **Andrea Biffi**, is identify as shown in her signature and acting in her own name, domiciled in **Via Mulino Vecchio 146 24059 URGANO (BERGAMO) Italia**, who henceforth will be referred to as **THE ASSIGNOR**, and **XXXXXXXXXXXXXXXXXX**, is identify in his signature, acting in its capacity as legal representative of the company **SOFAR S.P.A.**, domiciled in **VIA FIRENZE 40 20060 TREZZANO ROSA (MILANO)**, IT will be referred to as **THE ASSIGNEE**, we hereby celebrate the assignment rights of the patent of invention named:

### USE OF PROBIOTICS FOR IMPROVING PROTEIN ABSORPTION

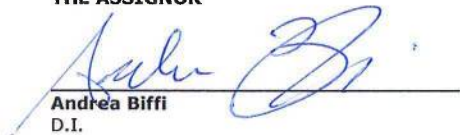
Governed by the following clauses

**FIRST: THE ASSIGNOR** assigns in favor of **THE ASSIGNEE**, the **PATRIMONIAL RIGHTS** that has over the patent of Invention in reference.

**SECOND:** The assignment of the patent Invention take effect from the date of its signature.

**THIRD:** The assignor and the assignee, by means of the written present, award special, wide and sufficient power to the lawyers **CAROLINA VERA MATIZ** lawyer in exercise with T.P.A. No. 91.835 and **JORGE VERA VARGAS**, lawyer in exercise with card T.P.A. No. 12122, in order that they request, before in the direction of new creations of the superintendence of industry and trade, or in the office competent entity, the record of the transfer here above-mentioned, action for which him the powers are awarded of receive, compromise, reconcile, revoking substitutions, re-taking up office and resigning. Once read in its totality the present document was approved on both parts. For witness, it is signed in two copies of the same tenor, in the city of **XXXXXXXX**, 24<sup>th</sup> September, 2018.

**THE ASSIGNOR**

  
Andrea Biffi  
D.I.

**THE ASSIGNEE**

  
XXXXXXXXX Andrea Biffi, Chief Executive Officer  
D.I.

On behalf and representation of the company **SOFAR S.P.A.**