

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 138**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2010 E 10757610 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2485743**

54 Título: **Cepas de Lactobacillus plantarum como agentes hipocolesterolémicos**

30 Prioridad:

09.10.2009 EP 09172613

30.11.2009 US 265095 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2013

73 Titular/es:

AB-BIOTICS S.A. (100.0%)

**Parc de recerca UAB-Campus UAB s/n, Edificio
Eureka - Despacho P2M1, Bellaterra
08193 Cerdanyola del Valles, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

CUÑÉ CASTELLANA, JORDI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 427 138 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepas de *Lactobacillus plantarum* como agentes hipocolesterolémicos

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Europea 09172613.3 presentada el 09.10.2009 y la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Nº de Serie 61/265.095 presentada el 30.11.2009.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los campos de la medicina, la microbiología y la nutrición y, particularmente, a nuevas cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum* para su uso en la reducción del colesterol.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Los niveles anormalmente elevados de colesterol (hipercolesterolemia) están claramente asociados con enfermedad cardiovascular, ya que promueven el desarrollo de ateromas en las arterias.

Continuamente están desarrollándose potenciales productos alimenticios y agentes farmacéuticos hipocolesterolémicos para controlar el colesterol en suero en personas con niveles anormalmente elevados. Estos agentes farmacéuticos pueden basarse en la interrupción de la circulación enterohepática (EHC, del inglés enterohepatic circulation) de sales biliares. El metabolismo de las sales biliares y el metabolismo del colesterol están estrechamente relacionados. Las sales biliares son los productos finales excretados hidrosolubles de colesterol, y son esenciales para la emulsión de grasas en el tracto digestivo. Se sintetizan en el hígado, principalmente como glico- o tauro-conjugados. Las sales biliares se secretan varias veces al día (seis de promedio) en el duodeno, y pasan a través del yeyuno en el íleon. Durante el tránsito intestinal, la mayoría de las sales biliares se reabsorben para volver al hígado a través de la vena porta. Una pequeña proporción se pierde en las heces y esta pérdida se sintetiza de nuevo a partir de colesterol endógeno en el hígado. Un aumento de la cantidad de sales biliares que se pierde en las heces da como resultado una neosíntesis de colesterol aumentada, reduciendo por lo tanto eficazmente la reserva de colesterol endógeno. Un grupo de fármacos hipocolesterolémicos usados actualmente denominados resinas (Colestiramina, Colestipol, Colesevelam) son activos a través de este mecanismo de acción.

25 Aparte de los intentos farmacéuticos o quirúrgicos para disminuir los niveles de colesterol en suero a través de la interrupción de la EHC, se ha sugerido que la ingestión de determinadas células bacterianas también podría influir en los niveles de colesterol. Las bacterias intestinales pueden influir en los niveles de colesterol a través de la asimilación de colesterol exógeno de la dieta en la membrana bacteriana, o a través de la desconjugación de sales biliares. Durante el tránsito intestinal, las sales biliares experimentan varias transformaciones bacterianas, de las cuales la más importante es la desconjugación de sales biliares. La capacidad para desconjugar (o hidrolizar) sales biliares se encuentra en algunas especies de bacterias acidolácticas intestinales (LAB, del inglés Lactic Acid Bacteria), pero también en otros géneros. Tras la desconjugación de sales biliares, se libera glicina o taurina del resto esteroideo de la molécula, dando como resultado la formación de sales biliares libres (desconjugadas). Las sales biliares libres precipitan más fácilmente a bajo pH. También se reabsorben menos eficazmente que sus homólogos conjugados. Por lo tanto, las sales biliares desconjugadas se excretan más fácilmente en las heces que las sales biliares conjugadas. La desconjugación de sales biliares influye en la EHC mediante el aumento de la excreción de sales biliares, y se cree que es mucho más eficaz en la reducción de los niveles de colesterol en sangre que la simple retención de colesterol exógeno.

40 La hidrolasa de sales biliares (BSH, del inglés Bile Salt Hydrolase), la enzima responsable de la desconjugación de sales biliares durante la EHC, se ha detectado en varias especies de LAB autóctonas en el tracto gastrointestinal. Tanaka et al. (véase "Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity", Journal of Dairy Science 1999, vol. 82, págs. 2530-35) evaluaron más de 300 cepas de LAB de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y las especies *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus thermophilus*. Los resultados obtenidos para 273 cepas mostraron que la actividad BSH está distribuida heterogéneamente entre las diferentes especies. De acuerdo con este estudio, casi todas las cepas bifidobacterianas tienen actividad BSH, mientras que esta actividad sólo puede encontrarse en cepas seleccionadas de lactobacilo.

50 *Lactobacillus plantarum* es una LAB aerotolerante Gram-positiva encontrada comúnmente en muchos productos alimenticios fermentados, así como en materia vegetal anaerobia. También está presente en la saliva (de la que se aisló por primera vez). Las cepas de *L. plantarum* son especialmente adecuadas para la preparación industrial de productos alimenticios fermentados gracias a su buen índice de supervivencia a través del procesamiento industrial y del periodo de conservación, así como a su elevado perfil de acidificación y buenas propiedades organolépticas. Algunas cepas de *L. plantarum* también se consideran probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud al hospedador. Para ser denominadas probióticos, las bacterias deben satisfacer varios requisitos relacionados con su ausencia de toxicidad, viabilidad para alcanzar el tracto gastrointestinal inferior (GIT, del inglés gastrointestinal tract) y adhesión a la mucosa intestinal, entre otros. La mayoría de las bacterias probióticas pertenecen al grupo de las LAB pero, no obstante, en general se sabe que las características y beneficios de los probióticos son extremadamente dependientes de cada cepa, incluso entre LAB de la misma especie.

La cepa comercial L. plantarum 299v se considera generalmente un probiótico y se ha descrito que disminuye los niveles de fibrinógeno y colesterol en suero cuando se ingiere en forma de una bebida probiótica (véase Bukowska et al., "Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with Lactobacillus plantarum in subjects with moderately elevated cholesterol" *Atherosclerosis* 1998, vol. 137, págs. 437-38). Sin embargo, la reducción del colesterol-LDL era muy moderada en estos estudios y estaba acompañada de una reducción leve similar del colesterol-HDL. No se han publicado datos relacionados con la BSHA de L. plantarum 299v.

Por lo tanto, es deseable proporcionar nuevas cepas de probióticos mejoradas para ser usadas como agentes hipocolesterolémicos.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevas cepas probióticas mejoradas para la reducción del colesterol en sangre y, por consiguiente, para la prevención y el tratamiento de trastornos cardiovasculares.

Los presentes inventores proporcionan tres nuevas cepas probióticas de Lactobacillus plantarum aisladas a partir de heces humanas. Se encontró sorprendentemente que las cepas tenían una elevada actividad BSH. Como se ha mencionado anteriormente, la estrecha relación existente entre la elevada actividad BSH bacteriana y la reducción de colesterol condiciona que las presentes cepas sean útiles como agentes hipocolesterolémicos. Los ejemplos a continuación demuestran que estas cepas tienen una actividad BSH significativamente superior en comparación con cepas de L. plantarum relevantes disponibles en el mercado, tales como L. plantarum 299v o la cepa de L. plantarum que está presente en la mezcla de probióticos comercial VSL#3. También se muestra que las cepas de la invención son eficaces en la reducción de colesterol del cultivo de medios que contienen colesterol soluble. Aunque cada una de las nuevas cepas demuestra por sí misma ventajas con respecto a cepas conocidas, estas ventajas se ven magnificadas cuando las tres cepas se usan juntas, mostrando por lo tanto un comportamiento sinérgico.

La actividad de disminución de los niveles de colesterol de las cepas de la invención también se ha demostrado in vivo. El ejemplo a continuación demuestra que un producto que contiene las cepas probióticas de la invención es particularmente efectivo en la reducción de colesterol cuando se administra a sujetos hipercolesterolémicos.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una de las cepas seleccionadas del grupo que consiste en Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529, o cepas mutantes de las mismas, donde las cepas mutantes se obtienen usando las cepas depositadas como material de partida, y donde las cepas mutantes conservan o incluso mejoran la actividad de disminución del colesterol de las cepas parentales. En una realización particular, la invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una de las cepas seleccionadas del grupo que consiste en Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529.

La expresión "cantidad efectiva", como se usa en la presente memoria, significa una cantidad de un agente activo lo bastante elevada para conseguir el beneficio deseado, pero lo bastante reducida para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del buen juicio médico.

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad efectiva de Lactobacillus plantarum CECT 7527, L. plantarum CECT 7528 y L. plantarum CECT 7529 o cepas mutantes de las mismas, donde las cepas mutantes se obtienen usando las cepas depositadas como material de partida, y donde las cepas mutantes conservan o mejoran la actividad de disminución del colesterol de las cepas parentales. En una realización particular, la composición de la invención comprende una cantidad efectiva de Lactobacillus plantarum CECT 7527, L. plantarum CECT 7528 y L. plantarum CECT 7529.

Está claro que usando las cepas depositadas como material de partida, el experto en la materia puede obtener de forma rutinaria, por mutagénesis convencional o técnicas de reaslamiento, mutantes adicionales o derivados de los mismos que conserven las características y ventajas pertinentes descritas en la presente memoria. Por consiguiente, la expresión "un mutante de las mismas" se refiere a cepas mutantes obtenidas usando las cepas depositadas como material de partida, conservando o mejorando dichas cepas mutantes las propiedades de disminución de los niveles de colesterol de las cepas originales. El experto en la materia decidirá sobre el método adecuado a emplear para determinar la actividad de disminución del colesterol de las cepas. Se muestran ejemplos de posibles métodos para medir esta actividad en los ejemplos a continuación.

Las cepas de esta invención tienen la ventaja de que son particularmente útiles como probióticos. Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias probióticas deben satisfacer varios requisitos relacionados con la ausencia de toxicidad, viabilidad, adhesión y efectos beneficiosos. Estas características probióticas son dependientes de cepa, incluso entre bacterias de la misma especie. Por lo tanto, es importante encontrar aquellas cepas que tengan un mejor rendimiento en todos los requisitos de probióticos. Los ejemplos a continuación demuestran que las presentes cepas tienen excelentes características probióticas.

Las cepas de la invención han demostrado que son muy resistentes a las condiciones del medio gastrointestinal de mamíferos (medio ácido, altas concentraciones de lisozima, sales biliares y peróxido de oxígeno), siendo por lo tanto

capaces de sobrevivir al paso a través del GIT. Las cepas también tienen una buena adhesión al epitelio intestinal, lo que les permite permanecer en el tracto intestinal para ejercer sus efectos probióticos. Cuando se comparan con otras cepas comerciales, las cepas de la invención muestran una mejor resistencia a las condiciones del GIT y una mayor capacidad de adhesión. Además, también han demostrado ser seguras, puesto que no tienen efectos tóxicos, no conducen a un aumento en la translocación de LAB, ni facilitan la translocación enterobacteriana en mamíferos hospedadores.

Además, las presentes cepas tienen varios efectos beneficiosos en el hospedador. Además de su actividad de disminución del colesterol, benefician al equilibrio de la microbiota intestinal debido a su actividad antagonista. La expresión "actividad antagonista" se refiere a la inhibición del crecimiento de bacterias gastrointestinales no beneficiosas por la actividad de bacterias probióticas. La afección de tener un equilibrio microbiano gastrointestinal inadecuado se conoce como disbiosis y tiene múltiples consecuencias negativas para el bienestar humano. A continuación se mostrará que las cepas tienen una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de cepas patógenas cuando se comparan con otras cepas de L. plantarum comerciales.

Las cepas también producen grandes cantidades de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, del inglés short chain fatty acids). La producción de SCFA a partir de fibras no digeribles es una capacidad probiótica interesante. Esta capacidad es deseable en un probiótico porque los SCFA producidos muestran varias propiedades beneficiosas en el hospedador (véase Wong J., "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids", J Clin Gastroenterol_2006, vol. 40, págs. 235-43). Entre los SCFA, la producción de ácido propiónico y butírico es de mayor interés para el alcance de la presente invención. El primero tiene un efecto antiinflamatorio, útil para reducir la inflamación sistémica. La inflamación global tiene una incidencia en la aterogénesis, que es uno de los factores de riesgo cardiovasculares más importantes (véase Naruszewicz M., "Potential parapharmaceuticals in the traditional Polish diet" 2005, Journal of Physiology and Pharmacology, vol. 56, supl 1, págs. 69-78). En general se sabe que el ácido butírico es beneficioso para el epitelio del colon, puesto que es la fuente de energía principal para las células del colon.

Al ejercer varios efectos beneficiosos en el hospedador humano, estas bacterias probióticas son útiles como agentes terapéuticos o profilácticos. Particularmente, las cepas de la presente invención son eficaces para reducir los niveles de colesterol en sangre. Como se ha explicado anteriormente, los niveles de colesterol elevados están claramente asociados con enfermedad cardiovascular porque promueven el desarrollo de ateromas en arterias. Por lo tanto, las cepas de la invención son útiles para la prevención o el tratamiento de trastornos cardiovasculares.

Por consiguiente, otro aspecto de la invención está relacionado con una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una de las cepas de esta invención, o cepas mutantes de las mismas, para su uso como agente de prevención y/o terapéutico. En una realización preferida, la composición de la invención es para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos cardiovasculares en un animal, incluyendo un ser humano. En otra realización preferida, la invención proporciona el uso de la composición como se ha descrito anteriormente, para la fabricación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de trastornos cardiovasculares. Esto puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o el tratamiento de trastornos cardiovasculares en un animal, incluyendo un ser humano, que comprende administrar a dicho animal que lo necesite una cantidad efectiva de la composición de la invención.

En otra realización, la composición de la invención se usa como un agente hipocolesterolémico. En una realización adicional, la invención proporciona el uso de la composición como se ha descrito anteriormente para la fabricación de un medicamento para la reducción de colesterol. Esto puede formularse alternativamente como un método para la reducción de colesterol en un animal, incluyendo un ser humano, que comprende administrar a dicho animal que lo necesite una cantidad efectiva de la composición de la invención.

La composición de la invención puede administrarse a sujetos sanos, así como a pacientes que padecen un trastorno coronario. En una realización particular, el sujeto que recibe la composición de la invención padece hipercolesterolemia.

Las composiciones probióticas de la invención tienen la ventaja adicional de carecer de los efectos secundarios presentados por los esteroides vegetales, los cuales se han descrito como contraindicados en combinación con estatinas en sujetos que hiperabsorben esterol. Pruebas recientes sugieren que algunos de los riesgos coronarios residuales observados con la monoterapia con estatinas son una consecuencia de que las estatinas aumentan en realidad el riesgo coronario en pacientes que hiperabsorben esteroides, incluyendo esteroides vegetales. Los sujetos que hiperabsorben esterol ascienden a aproximadamente el 25% de la población y se ha demostrado que la mayoría de ellos contienen polimorfismos en el semitransportador ABCG8 del casete de unión (ABC) de adenosina-5'-trifosfato (ATP) (Goldstein M et al., "Statins, plant sterol absorption, and increased coronary risk". Journal of Clinical Lipidology, 2008, vol. 2, págs. 304-305). Además, se ha sugerido que los efectos del enriquecimiento dietético en esteroides vegetales y la terapia con estatinas son aditivos en la elevación de los niveles de esterol vegetal en sangre y tejido, y que esto es particularmente evidente en los que hiperabsorben esterol. La composición probiótica de la invención no tiene estos inconvenientes y puede administrarse a cualquier población y en combinación con estatinas o cualquier otro fármaco de disminución del colesterol.

Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención se administra a sujetos que hiperabsorben esterol. En otra realización particular, la composición de la invención se administra en combinación con una estatina.

Las cepas de la invención también promueven efectos inmunomoduladores en el hospedador, puesto que inducen un patrón de citocinas mejorado de la mucosa intestinal. Estos efectos inmunomoduladores son beneficiosos para el hospedador porque ayudan a conseguir una resistencia a la enfermedad mejorada y un riesgo de alergias disminuido. Se sabe que las bacterias Gram negativas que viven en el GIT muestran el LPS (lipopolisacárido) molecular en su superficie celular, lo que induce la producción de marcadores inflamatorios a partir de las células de la mucosa intestinal. La complementación con probióticos puede cambiar esta situación para favorecer una mayor presencia de bacterias Gram positivas en el GIT (agrupadas en el grupo de bacterias acidolácticas), con mejores condiciones ecológicas o con propiedades antagonistas contra algunos microorganismos Gram negativos, reduciendo por lo tanto la presencia de LPS en la mucosa intestinal. No obstante, algunos microorganismos probióticos muestran la capacidad de modular por sí mismos la producción de citocinas, que son moléculas mensajeras que regulan las respuestas inflamatorias e inmunes en el cuerpo. Particularmente, algunas bacterias probióticas inducen un patrón mejor equilibrado entre la señalización pro/anti-inflamatoria en la mucosa intestinal (sin reducir el número de bacterias Gram negativas). Como se ha mencionado anteriormente, esta inmunomodulación estimulada por bacterias también tiene un efecto antiaterosclerótico.

Como se ilustrará a continuación, se encontró que las cepas de la invención promueven por sí mismas una reducción de los niveles de factor de necrosis tumoral α (TNF- α) inflamatorio y un aumento de los niveles de interleucina 10 (IL-10) antiinflamatoria producidos por células de la mucosa intestinal, induciendo por lo tanto un patrón de citocinas mejorado de la mucosa intestinal. Este efecto inmunomodulador está complementado por las propiedades antagonistas de la cepa en la reducción de la presencia de bacterias Gram negativas patógenas en el GIT, y disminución de la cantidad de LPS en la mucosa intestinal.

Las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden una cantidad efectiva de al menos una de las cepas depositadas, o de sus mutantes, pueden formularse como productos comestibles, farmacéuticos o veterinarios, en los que dichas cepas son los únicos agentes activos o están mezcladas con uno o más agentes activos distintos y/o están mezcladas con excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables (en el caso de un producto farmacéutico o veterinario) o aditivos adecuados (en el caso de un producto comestible). En una realización particular de la invención, los productos contienen además uno o más agentes activos adicionales. Preferentemente, el agente o agentes activos adicionales son otras bacterias probióticas. Dependiendo de la formulación, las cepas pueden añadirse como bacterias purificadas, como un cultivo bacteriano, como parte de un cultivo bacteriano, como un cultivo bacteriano que se ha sometido a un tratamiento posterior, y en solitario o junto con vehículos o ingredientes adecuados. También podrían añadirse prebióticos, dando origen a una composición simbiótica. En una realización particular, las composiciones de la invención contienen además un prebiótico seleccionado del grupo que consiste en fructooligosacáridos y galactooligosacáridos.

En otro aspecto, la invención proporciona un producto farmacéutico y/o veterinario que contiene una cantidad efectiva de una composición que comprende al menos una de las cepas depositadas, o cepas mutantes de las mismas, junto con cantidades adecuadas de excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables. A este respecto, el producto farmacéutico puede prepararse para administrarse por vía oral en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, microcápsulas, gránulos, suspensiones, jarabes, polvos liofilizados, preparaciones líquidas, etc. La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para la formulación en vista del propósito particular de la composición están dentro del alcance de los expertos en la materia de la tecnología farmacéutica. Aunque se prefiere la administración oral, son posibles otras formas, tales como la inyectable, rectal o tópica.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin una toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación excesivos, en proporción a una relación de beneficio/riesgo razonable. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. Pueden encontrarse vehículos, excipientes, etc. adecuados en los textos farmacéuticos convencionales. Asimismo, la expresión "veterinariamente aceptable" significa adecuado para su uso en contacto con los tejidos de un animal no humano.

Las cepas de la invención también pueden incluirse en una diversidad de productos comestibles, tales como productos lácteos, un yogur, una cuajada, un queso (por ejemplo tipo quark, cremoso, procesado, blando y duro), una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado a base de leche, un helado, un producto a base de cereal fermentado, un polvo a base de leche, una bebida, un aliño y un alimento para mascotas. La expresión "producto comestible" se usa en la presente memoria en su sentido más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto en cualquier forma de presentación que pueda ser ingerido por un animal, pero excluyendo productos farmacéuticos y veterinarios. Son ejemplos de otros productos comestibles productos cárnicos (por ejemplo, paté de hígado, salchichas tipo frankfurt y embutidos de salami o pastas de carne), pastas de chocolate, rellenos (por ejemplo, trufa, crema) y escarchados, chocolate, dulces (por ejemplo caramelo, glaseados o dulce de leche), productos horneados (tartas, pasteles), salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores de café. Los productos comestibles particularmente interesantes son complementos dietéticos y fórmulas infantiles. En el sentido de la

presente invención, los complementos dietéticos también incluyen nutracéuticos, que se sabe que son extractos de alimentos que tienen un efecto medicinal sobre la salud humana. También se incluyen en el alcance de la invención forrajes para alimentos animales. Las composiciones de la invención también podrían usarse como ingrediente en otros productos alimenticios.

- 5 Por consiguiente, en otro aspecto de la invención, se proporciona un producto comestible que contiene la composición de la invención junto con cantidades apropiadas de ingredientes comestibles. Preferentemente, la composición de la invención es un complemento dietético.

10 La cantidad efectiva de unidades formadoras de colonias (cfu, del inglés colony forming units) para cada cepa en la composición se determinará por el experto en la materia y dependerá de la formulación final. Por ejemplo, en productos comestibles, la cepa o cepas están presentes en una cantidad de aproximadamente 10^5 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10^7 cfu/g a aproximadamente 10^{12} cfu/g, de acuerdo con la legislación actual. La expresión "unidad formadora de colonias" ("cfu") se define como el número de células bacterianas revelado por los recuentos microbiológicos en placas de agar.

15 Los complementos dietéticos contienen habitualmente cepas probióticas en una cantidad que varía de 10^7 a 10^{12} cfu/g. En una realización particular, la composición de la invención es un complemento dietético que comprende entre 10^9 - 10^{11} cfu/g, preferentemente aproximadamente 10^{11} cfu/g, de las cepas depositadas. En otra realización, el complemento dietético comprende 10^9 cfu de la cepa o cepas de la invención.

20 El experto en la materia puede establecer regímenes de administración adecuados de la composición de la invención. La composición de la invención puede administrarse una vez al día, una vez por semana, varios días por semana o varias veces al día. En otra realización, la dosis diaria comprende 10^9 cfu de la cepa o cepas de la invención.

25 Las cepas de la invención se producen por cultivo de las bacterias en un medio adecuado y en condiciones adecuadas. Las cepas pueden cultivarse en solitario para formar un cultivo puro, o como un cultivo mixto junto con otros microorganismos, o por cultivos de bacterias de diferentes tipos por separado y después combinación de las mismas en las proporciones deseadas. Después del cultivo, la suspensión celular se recupera y se usa como tal o tratada de la forma deseada, por ejemplo, por concentración o liofilización, para emplearse después en la preparación de productos farmacéuticos o comestibles. A veces la preparación de probióticos está sujeta a un procedimiento de inmovilización o encapsulación para mejorar la vida útil. Se conocen en el estado de la técnica varias técnicas para la inmovilización o encapsulación de bacterias (véase Kailasapathy et al., "Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications", Curr Issues Intest Microbiol 2002, vol. 3, págs. 39-48).

30 Si la composición de acuerdo con la invención se usa como complemento dietético, puede administrarse como tal, puede mezclarse con un líquido adecuado para beber, tal como agua, yogur, leche o zumo de frutas, o puede mezclarse con alimento sólido o líquido. En este contexto, el complemento dietético puede estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, sobrecitos, pastillas, dulces, barritas, jarabes y formas de administración correspondientes, habitualmente en forma de una dosis unitaria. Preferentemente, la composición de la invención se administra en forma de comprimidos, cápsulas, jarabes o píldoras, fabricados en procedimientos convencionales de preparación de productos farmacéuticos.

35 Como se muestra en los ejemplos a continuación, cada una de las cepas proporcionadas tiene características mejoradas cuando se compara con cepas de L. plantarum disponibles en el mercado, tales como L. plantarum 299v o L. plantarum VSL#3. Particularmente, las tres cepas poseen efectos hipocolesterolémicos mejorados debido a su sorprendente elevada actividad BSH. Por lo tanto, cada una de las cepas puede usarse en la composición de la invención en solitario o en combinación con las otras cepas de la invención. Por ejemplo, una composición de la invención puede comprender una cantidad efectiva de L. plantarum cepa CECT 7527 en solitario o junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, o ingredientes comestibles, conservantes, etc. Además, la composición de la invención puede contener una cantidad efectiva de L. plantarum cepa CECT 7527 en combinación con L. plantarum cepa CECT 7528 y/o L. plantarum cepa CECT 7529 junto con excipientes farmacéuticamente aceptables, o ingredientes comestibles, conservantes, etc.

40 Un aspecto adicional de la invención proporciona una cepa de Lactobacillus plantarum seleccionada del grupo que consiste en Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529, o cepas mutantes de las mismas, donde las cepas mutantes se obtienen usando las cepas depositadas como material de partida, y donde las cepas mutantes conservan o mejoran la actividad de disminución del colesterol de las cepas parentales. En una realización particular, la cepa se selecciona de una de las cepas depositadas.

45 Las secciones siguientes describen las capacidades hipocolesterolémicas de las cepas de la invención, así como su caracterización taxonómica y sus características probióticas específicas, incluyendo sus efectos sobre el sistema inmune. Estos ejemplos no pretenden ser limitantes de la presente invención. Los resultados obtenidos demuestran que las cepas de la invención tienen características probióticas mejoradas cuando se comparan con la cepa comercial L. plantarum 299v. Además, se muestra que una composición que comprende las cepas de la invención

tiene mejor actividad de disminución del colesterol in vivo que las formulaciones conocidas que contienen esteroides vegetales.

5 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para la práctica de la presente invención.

10 A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden aprenderse mediante la práctica de la invención. Los ejemplos y dibujos siguientes se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención. Además, la presente invención abarca todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en la presente memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 FIG. 1. Patrones de electroforesis de campo pulsado de ADN genómico digerido con las enzimas de restricción Sma-I (A) y Sfi-I (B) de: 1, Lactobacillus plantarum 299v; 2, F2099; 3, F3147; 4, Lactobacillus plantarum VSL#3; 5, F3276.

EJEMPLOS

1. Actividad hipocolesterolémica in vitro de las nuevas cepas

20 Las cepas de la presente invención se aislaron de heces de niños y se seleccionaron de entre otras 500 cepas bacterianas por su alto rendimiento en una exploración para actividad hidrolasa de sales biliares (BSH) mediante el método descrito a continuación. Las cepas seleccionadas mostraban una clara tinción Gram+, así como morfología de bacilos y no formaban esporas. Las cepas se depositaron bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Edificio de investigación, Campus de Burjassot, 46100 Burjassot, Valencia). Se emitió el certificado de viabilidad correspondiente y las cepas recibieron los números de acceso siguientes: Lactobacillus plantarum CECT 7527 (también denominado F2099 en esta memoria descriptiva), Lactobacillus plantarum CECT 7528 (también denominado F3147 en esta memoria descriptiva) y Lactobacillus plantarum CECT 7529 (también denominado F3276 en esta memoria descriptiva). La fecha de entrada en la CECT fue el 07.05.2009 para las cepas F3276 y F2099, y el 15.07.2009 para la cepa F3147.

30 La actividad hipocolesterolémica de las cepas se investigó adicionalmente in vitro y se comparó con las cepas de control comerciales L. plantarum cepa 299v (de ahora en adelante Lp 299v) y la cepa de L. plantarum contenida en el cultivo comercial VSL#3 (de ahora en adelante Lp VSL#3). Como se ha indicado anteriormente, se han descrito dos mecanismos para la disminución de los niveles de colesterol causada por bacterias acidolácticas, es decir, la neosíntesis de colesterol causada por la desconjugación de ácidos biliares y a través de la asimilación de colesterol exógeno de la dieta. Por lo tanto, todas las cepas se sometieron a un ensayo de actividad BSH y a un ensayo de disminución del nivel de colesterol en cultivo. Además, se ensayaron cultivos mixtos que contenían diferentes combinaciones de las nuevas cepas para determinar si existen efectos sinérgicos entre las cepas respecto a las actividades BSH y de disminución de los niveles de colesterol en los medios. Se realizaron procedimientos experimentales como se describen por Hyeong-Jun Lim et al. (véase "Isolation of cholesterol lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use", J Vet Sci 2004, vol. 5, págs. 391-5) con ligeras modificaciones.

1.1. Actividad hidrolasa de sales biliares

40 Las cepas se cultivaron durante una noche en medio MRS (pH 6,4) a 30 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 5%. Después de la incubación, los cultivos se normalizaron a 10⁸ cfu/ml y se prepararon los cultivos mixtos siguientes: F2099 + F3147, F2099 + F3276, F3147 + F3276, F2099 + F3147 + F3276. Los cultivos mixtos contenían la misma cantidad de cada una de sus cepas constituyentes y la misma concentración bacteriana total que los cultivos de una sola cepa. Tanto los cultivos de una sola cepa como los cultivos mixtos se ensayaron para determinar la actividad BSH. Los cultivos se impregnaron alrededor de discos de papel esterilizados en placas de agar MRS complementadas con sal sódica del ácido taurodesoxicólico al 4% (p/v) (TDCA, Sigma, Estados Unidos) y CaCl₂ 0,37 g/l. Las placas se incubaron anaeróticamente a 37 °C durante 72 h, y se midió el diámetro de las zonas de precipitación alrededor de los discos. Después, se calculó la actividad BSH restando el diámetro del disco (DD) del diámetro de la zona de inhibición (IZD) y dividiendo esta diferencia por dos, siguiendo la fórmula $GI = (IZD-DD) / 2$ (véase la TABLA 1).

TABLA 1. Actividad hidrolasa de sales biliares (BSH)

	Actividad BSH
F2099	2,10
F3147	2,53
F3276	3,17
F2099 + F3147	2,63
F2099 + F3276	3,35
F3147 + F3276	2,90
F2099 + F3147 + F3276	3,65
Lp 299V	1,70
Lp VSL#3	2,00

Estos resultados demuestran que las cepas de la presente invención tienen una elevada actividad de desconjugación de sales biliares. Además, la actividad BSH de cada una de las cepas individuales F2099, F3147 y F3276 es superior que la de las cepas comerciales Lp 299v y Lp VSL#3, correspondiendo la mayor actividad a la cepa F3276. Además, cuando las cepas se combinan en un cultivo mixto, la actividad de BSA del cultivo mixto es superior que la de los cultivos de una sola cepa para la misma concentración bacteriana total. La actividad BSH aumenta particularmente cuando se combinan las tres cepas, dando como resultado una actividad BSH que duplica ampliamente la de Lp 299v. Por lo tanto, parece que existe un efecto sinérgico entre las cepas de la invención respecto a la actividad BSH.

1.2. Capacidad de disminución de los niveles de colesterol en el medio

Se realizó un ensayo de disminución de los niveles de colesterol usando caldo MRS con colesterol soluble. Se prepararon cultivos de una sola cepa y mixtos como se ha explicado anteriormente. El colesterol soluble (sebacato de polioxietanilcolesterol, Sigma, Estados Unidos) se filtró a través de un Millipore de $0,45 \mu\text{m}$ se usó para complementar a una concentración final de 300 mg/ml caldo MRS autoclavado que contenía L-cisteína al 0,05% . El volumen de inoculación fue de 15 μl de disolución de cultivo bacteriano según se obtuvo anteriormente (10^8 cfu/ml) por 1 ml de caldo MRS con colesterol, y que se incubó anaeróticamente a 37 °C durante 24 h. También se incubó en las mismas condiciones caldo MRS no inoculado. Después de la incubación, las células bacterianas se retiraron por centrifugación y los sobrenadantes del cultivo de *L. plantarum* y del control sin inocular se ensayaron después para determinar su contenido restante de colesterol en un analizador automático (Olympus AU400). El mismo experimento se realizó en caldo MRS que contenía sales biliares al 1% p/v (sales biliares de SIGMA C4951), puesto que esta última combinación se parece más estrechamente al medio intestinal. Los resultados de estos ensayos pueden observarse en la TABLA 2, y se expresan como el % de reducción de colesterol con respecto al control sin inocular.

TABLA 2. Capacidad de disminución de los niveles de colesterol en el medio por cultivos bacterianos.

	% Reducción de colesterol	de % Reducción de colesterol (sales biliares al 1%)
F2099	10,10	42,70
F3147	9,60	42,70
F3276	9,30	42,00
F2099 + F3147	9,84	43,00
F2099 + F3276	11,82	47,20
F3147 + F3276	10,72	44,27
F2099 + F3147 + F3276	13,01	50,85
Lp 299V	4,58	26,70
Lp VSL#3	7,40	27,80

De nuevo, los resultados demuestran que las cepas de la invención tienen mejores efectos hipocolesterolémicos en comparación con las bien conocidas cepas comerciales Lp 299v y Lp VSL#3. Además, se muestra que los efectos de disminución del colesterol son mejores cuando se combinan las tres cepas de la invención en un cultivo mixto.

2. Caracterización taxonómica de las cepas

5 Para la caracterización taxonómica, las cepas de la invención se cultivaron durante una noche en medio MRS (pH 6,4) a 30 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 5%. Las bacterias se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en tampón de pre-lisis (480 µl de EDTA 50 mM pH 8,0; 120 µl de lisozima 10 mg/ml), y se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 60 min. Se extrajo el ADN usando un kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega).
 10 Después de la centrifugación de las bacterias pre-tratadas a 14000 g durante 2 min para eliminar el sobrenadante, se siguió el protocolo de Promega. En resumen, las bacterias se resuspendieron en Disolución de Lisos de Núcleos y se incubaron a 80 °C durante 5 min, después se enfriaron a temperatura ambiente. Los lisados celulares se incubaron en disolución de ARNasa a 37 °C durante 60 min y las proteínas se precipitaron por adición de Disolución de Precipitación de Proteínas y agitación con vórtex a velocidad elevada. Las muestras se enfriaron y se centrifugaron a 15000 g durante 3 min. Los sobrenadantes que contenían el ADN se transfirieron a tubos de microfuga de 1,5 ml limpios y se mezclaron con 600 µl de isopropanol por inversión. El ADN se recogió por centrifugación a 15000 g durante 2 min, y eliminando por vertido con cuidado el sobrenadante. Las muestras de ADN se lavaron con 600 µl de etanol al 70% por inversión suave del tubo varias veces. El etanol se eliminó por aspiración, después de centrifugación a 15000 g durante 2 min. Por último, el sedimento de ADN se resuspendió en 100 µl de Disolución de Rehidratación por incubación a 65 °C durante 1 h. Las muestras se almacenaron a 2-8 °C.

20 2.1. Identificación genética de género y especie

El ARNr 16S se amplificó por PCR usando los cebadores universales Eub27f y Eub1492r, que producen un fragmento casi de secuencia completa de 16S (más de 1000 nucleótidos) (TABLA 3). Después, el ADN obtenido como se ha explicado anteriormente se lavó usando el kit Quiaquick (Quiagene).

25 Se realizaron cuatro reacciones de secuenciación consecutivas para cada muestra en un Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) usando el kit BigDye v.3.1, usando los cebadores mostrados en la TABLA 3. La recogida de datos y los cromatogramas se construyeron usando el software DNA Sequence Analysis v.5.2 (Applied Biosystems) y se comprobaron por análisis visual con Chromas (Technelysium Pty Ltd.) y BioEdit (Ibis Biosciences).

30 La identificación de género se llevó a cabo usando la herramienta Ribosomal Database Project (Q. Wang et al., "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy", Appl. Environ. Microbiol. 2007, vol. 73, págs. 5261-7). La identificación de especie se realizó por comparación de la secuencia obtenida con secuencias 16S de organismos conocidos tanto de la base de datos RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) por medio de un BLASTN, como del Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>, J.R. Cole et al., "The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data" Nucl. Acids Res. 2007, vol. 35, págs. 169-72). La herramienta RDP identificó que las tres cepas F2099, F3147 y F3276 pertenecían a la especie Lactobacillus plantarum.

TABLA 3. Cebadores usados para amplificar y secuenciar el gen 16S.

Etapa	Cebador	Orientación	Secuencia 5' → 3'
Amplificación	Eub27f	directa	GAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEC ID NO: 1)
	Eub1492r	inversa	TACGGYTACCTTGTTACGACTT (SEC ID NO: 2)
Secuenciación	27f	directa	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEC ID NO: 3)
	357f	directa	CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGGCCGCC GCCCCGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG
			(SEC ID NO: 4)
	907r	inversa	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT (SEC ID NO: 5)
	1492r	inversa	GGTTACCTTGTTACGACTT (SEC ID NO: 6)

45 Genotipado de cepa

La caracterización se realizó por digestión genómico y electroforesis en gel de campo pulsado. Las cepas F2099, F3147 y F3276 se sometieron a un protocolo descrito anteriormente (A.M. Rodas et al., "Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications", Int J Syst Evol Microbiol 2005, vol. 55, págs. 197-207). También se incluyeron en el ensayo Lp VSL#3 y Lp 299v como cepas de control. Todas las cepas se cultivaron en placas de

- agar MRS y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5% durante 18 h. Las células se recogieron y se lavaron 3 veces en 8 ml de PET (Tris 10 mM pH 7,6, NaCl 1 M), después se centrifugaron a 6000 rpm 10 min. Los sedimentos se resuspendieron en 700 µl de tampón de lisis (Tris 6 mM, NaCl 1 M, EDTA 0,1 M, SLS al 0,5%, ácido desoxicólico al 0,2%; lisozima 1 mg/ml; mutanolisina 40 U/ml; 20 (g/ml ARNasa). Se añadió un volumen equivalente de agarosa de bajo punto de fusión al 1,6% (FMC BioProducts, Rockland, ME, Estados Unidos) a las células resuspendidas y se permitió la solidificación a 4 °C durante 1 h. Los insertos se transfirieron a 2 ml de tampón de lisis II (EDTA 0,5 M pH 9,2, N-lauril sarcosina al 1% y pronasa 1 mg/ml) y se incubaron a 50 °C durante 48 h. Después, los insertos se lavaron a temperatura ambiente con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0). Se realizó una digestión de ADN total mediante las enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I (Roche Diagnostics).
- Se llevó a cabo una electroforesis de campo pulsado usando un aparato CHEF DRIII (BioRad Laboratories). Los insertos se cargaron en un gel de agarosa al 1% (agarosa SeaKem ME, FMC BioProducts, ME, Estados Unidos). La TABLA 4 describe las condiciones de electroforesis para cada enzima. Los marcadores de PM de ADN fueron el marcador Lambda ladder PFG y el marcador Low Range PFG (New England Biolabs). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y UV usando un GelDoc System (BioRad).
- TABLA 4. Condiciones de electroforesis para ADN genómico de las cepas F2099, F3147 y F3276 digerido por las enzimas de restricción Sfi-I y Sma-I.

Enzima	Bloque	Pulso inicial (s)	Pulso final (s)	Tiempo (horas)
<u>Sfi</u> -I	1	2	10	10
	2	15	25	6
<u>Sma</u> -I	1	0,5	5	16

- Como se muestra en la FIG. 1, los patrones de restricción de Sfi-I y Sma-I de electroforesis de campo pulsado fueron diferentes para las cepas F2099, F3147 y F3276, confirmando por lo tanto que pertenecen a tres cepas diferentes. Como se esperaba, los patrones también diferían de los de las cepas Lp 299v y Lp VSL#3. En la bibliografía se ha descrito que, a diferencia de otros Lactobacillus, las especies de L. plantarum presentan una elevada heterogeneidad genética (I. Sánchez et al., "Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with 'Almagro' eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns" Journal of Applied Microbiology 2004, vol. 97, págs. 446-58). Como se muestra por su PFGE, las cepas F2099, F3147 y F3276 parecen estar genéticamente muy estrechamente relacionadas, de modo que puede que vengan del mismo origen clonal (F.C. Tenover et al., "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing" J Clin Microbiol 1995, vol. 33, págs. 2233-9).

3. Resistencia al medio gastrointestinal

- Para evaluar la resistencia de las cepas F2099, F3147 y F3276 al tránsito a través del GIT se realizaron ensayos en condiciones que imitan el medio gastrointestinal de mamíferos. Por lo tanto, se cuantificó la supervivencia después del tratamiento con lisozima, peróxido de oxígeno, medio ácido y sales biliares. Los resultados se compararon con los obtenidos para Lp 299v y Lp VSL#3.

- 3.1. Tolerancia a lisozima:** Se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa bacteriana cultivado durante una noche en MRS a 37 °C en una placa de 96 pocillos y se añadieron 200 µl de medio complementado con lisozima a 100, 200 o 300 µg/ml (Sigma). Las placas se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5%. El crecimiento bacteriano se cuantificó por medición del aumento de la densidad óptica a 620 nm en un lector de ELISA entre 0 y 6 h de tiempo de incubación. Los resultados se expresan en % frente al control, que es el crecimiento máximo de cada una de las cepas en un caldo MRS sin complementación con lisozima (TABLA 5).

- 3.2. Tolerancia a peróxido de oxígeno:** Se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa cultivado durante una noche en MRS a 37 °C en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µl de MRS complementado con H₂O₂ a 10, 20 y 30 µg/ml a los pocillos y las placas se incubaron 30 min a 37 °C antes de leerse a 620 nm después de 0 y 6 h de tiempo de incubación (TABLA 6).

- 3.3. Tolerancia a medio ácido:** Se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa cultivado durante una noche en MRS a 37 °C en una placa de 96 pocillos, después se pusieron alícuotas de 200 µl de medios MRS ajustados a diferentes valores de pH con HCl sobre pocillos que contenían bacterias. Después, las placas se mantuvieron a 42 °C y el aumento de la densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro a 620 nm entre 0 y 6 h. Los resultados se expresan en % frente al control, que es el crecimiento máximo de cada una de las cepas en un caldo MRS a pH 7,2 (TABLA 7).

5 3.4. Tolerancia a sales biliares: Se pusieron alícuotas de 20 µl de cada cultivo de cepa bacteriana cultivado durante una noche en MRS a 37 °C en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200 µl complementados con sales biliares al 0,3%, 0,5% y 0,1% (p/v) (SIGMA B8756-10G, 096K1213) a los pocillos y se ajustaron a pH 3. Las muestras también se ensayaron en 200 µl de MRS con sales biliares al 0,3% (p/v) sin ajuste de pH. Las placas se mantuvieron a 37 °C, CO₂ al 5% y se leyeron a las 0 y 6 h en un espectrofotómetro a 620 nm (TABLA 8).

TABLA 5. Resultados de densidad óptica (DO) expresados en % de MRS de control después de la incubación a diferentes concentraciones de lisozima

	Concentración de lisozima (µg/ml)		
	100	200	300
F2099	99,23	99,65	97,55
F3147	96,45	95,72	93,66
F3276	98,45	98,12	94,67
Lp 299v	92,86	90,02	85,19
Lp VSL#3	89,23	87,12	81,19

10 TABLA 6. Resultados de densidad óptica expresados en % de MRS de control después de la incubación a diferentes diluciones de H₂O₂

	Concentración de H ₂ O ₂ (µg/ml)		
	10	20	30
F2099	96,12	95,77	90,9
F3147	98,45	96,80	94,35
F3276	95,12	92,38	89,99
Lp 299v	95,34	93,24	87,45
Lp VSL#3	97,12	90,88	85,45

TABLA 7. Resultados de densidad óptica expresados en % de MRS de control después de la incubación a diferentes valores de pH

	pH								
	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6
F2099	60,45	62,67	66,58	70,23	71,89	77,34	80,24	85,28	93,45
F3147	62,08	65,80	71,20	74,32	76,45	84,12	88,95	95,40	97,20
F3276	58,24	58,23	60,22	63,56	64,58	68,34	74,56	86,34	92,10
Lp 299v	52,34	51,56	57,34	58,03	63,20	63,99	78,23	83,20	87,30
Lp VSL#3	55,34	56,74	61,10	62,45	63,76	67,77	72,34	82,12	84,23

15 TABLA 8. Resultados de densidad óptica expresados en % de MRS de control después de la incubación a diferentes concentraciones de sales biliares. * Sin ajuste de pH.

	concentración de sales biliares (% p/v)			
	0,3*	0,3 pH 3	0,5 pH 3	1 pH 3

F2099	117,85	109,34	103,23	87,12
F3147	136,08	128,01	107,34	95,66
F3276	109,80	104,30	93,67	72,56
Lp 299v	102,45	94,35	89,34	51,56
Lp VSL#3	104,65	99,49	92,12	65,23

Estos resultados indican que las cepas de la invención tienen un buen comportamiento de viabilidad cuando se someten a condiciones que imitan el medio gastrointestinal. Las TABLAS 5 y 6 muestran que las cepas son resistentes a las altas concentraciones de agentes bactericidas presentes en la boca (lisozima y peróxido de oxígeno). La viabilidad de cepa es muy buena incluso a concentraciones por encima de las condiciones fisiológicas (lisozima 30 µg/ml y H₂O₂ 10 µg/ml). Respecto a las condiciones ácidas del estómago, la viabilidad de las cepas también es satisfactoria. Además, las cepas de la invención son extraordinariamente resistentes a sales biliares (véase la TABLA 8), incluso en combinación con un pH ácido, como es habitualmente el caso cuando tiene lugar el vaciamiento del estómago. En su conjunto, los resultados muestran que las cepas de esta invención son viables después del paso a través del GIT. Además, los resultados muestran que las cepas de la invención tienen un mejor rendimiento que las cepas comerciales Lp 799v y Lp VSL#3 en las condiciones ensayadas.

4. Adhesión al intestino

4.1. Adhesión al moco

La capacidad de adhesión de las cepas F2099, F3147 y F3276 se comparó con la de la cepa comercial Lp 299v.

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

Se prepararon cultivos marcados con tritio de la forma siguiente. Se pusieron 150 µl de cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos en medio MRS complementado con timidina marcada con tritio (5 µl en 3 ml de MRS) y se incubaron durante una noche a 30 °C y CO₂ al 5%. Las preparaciones se centrifugaron y los sedimentos se resuspendieron en tampón PBS a una concentración de 10⁸ cfu/ml. La señal de tritio incorporada en los microorganismos se calcula a partir de la señal de tritio inicial (los µl de timina marcada con tritio añadidos al medio) y la señal del sobrenadante. La proporción entre este número (señal incorporada a la biomasa) y el número total de microorganismos en el cultivo da como resultado dpm/cfu (señal/bacteria).

24 h antes del ensayo de adhesión, se incubó 1 ml de la disolución de moco a 0,5 mg/ml en pocillos de una placa de ELISA. Después de lavar, las preparaciones de microorganismos marcados con tritio a 1 x 10⁸ cfu/ml se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 60 min a 37 °C. Se retiraron los sobrenadantes de cada pocillo, los pocillos se lavaron con medio MEM Alfa (Gibco) y se rasparon para liberar los microorganismos asociados al moco de los pocillos. La adhesión de las cepas se calcula por recuento de la señal de tritio en un lector de centelleo (Wallac 1410) de la preparación de los microorganismos asociados al moco en los pocillos, y división por las dpm/cfu que se han obtenido anteriormente. El resultado es el número de bacterias adheridas por unidad de área de moco. Pueden unirse 6,80 x 10⁵, 6,58 x 10⁶ y 7,31 x 10⁶ cfu de las cepas F2099, F3147 y F3276, respectivamente, a 2 cm² de moco intestinal. En comparación con la cepa comercial Lp 299v, las cepas de la presente invención tienen una capacidad de adhesión mucho mejor.

4.2. Adhesión a células Caco-2

Se obtuvieron células Caco-2 ECACC N°: 86010202 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). El procedimiento experimental para obtener el número de bacterias que se adhieren por unidad de área de células caco-2 es esencialmente el mismo que se ha explicado anteriormente para la adhesión a moco. Los resultados mostraron que 3,12 x 10⁶, 2,11 x 10⁶ y 5.19 x 10⁵ cfu de las cepas F2099, F3147 y F3276, respectivamente, pueden unirse a 2 cm² de células caco-2. De nuevo, en comparación con la cepa comercial Lp 299v, las cepas de la invención tienen una mejor capacidad de adhesión.

5. Ensayos de toxicidad

Un cultivo mixto prefijado de las cepas F2099, F3147 y F3276 (este cultivo mixto se denominará de ahora en adelante AB-LIFE) se administró a 5 x 10¹⁰ cfu/kg en PBS a seis ratas Wistar de 9 semanas de edad (machos y hembras) a lo largo de dos días consecutivos hasta una dosis total de 10¹¹ cfu/kg. Los animales se alimentaron con forraje (Teklad 2014) y agua *ad libitum*. La administración fue después de comer en estómago lleno y con la ayuda de una sonda orogástrica. El mismo régimen de alimentación se aplicó a 6 ratas de control, que recibieron PBS

solamente. Cada dos días, se determinó el bienestar animal asignando valores a parámetros tales como el peso, el comportamiento y la respuesta a estímulos. La puntuación total se obtiene como resultado de la suma de los valores obtenidos en cada parámetro: peso + comportamiento + respuesta a estímulos. En su conjunto, no se observaron efectos negativos sobre el bienestar animal durante el estudio.

5 Los animales se sacrificaron el día 7 por inhalación de CO₂. Se realizó una necropsia completa para encontrar daños orgánicos macroscópicos. Se tomaron muestras de ganglios linfáticos mesentéricos e hígado para estudiar la translocación bacteriana. Se homogeneizaron aproximadamente 5 mg de cada muestra en 1 ml de PBS gelatina al 0,01%. Se sembraron 100 µl de este homogeneizado en placas de McConkey o placas de MRS. Las colonias se contaron después de la incubación a 37 °C durante 48 h. Los resultados se presentan en la TABLA 9 y la TABLA 10.
10 Se observaron unas cuantas colonias de LAB en placas de MRS de animales de control y alimentados con AB-LIFE que corresponden a una translocación basal normal de LAB (J.S. Zhou *et al.*, "Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria", *Food Chem Toxicol* 2000, vol. 38, págs. 153-61).

15 En conclusión, los resultados muestran que la administración oral de cultivo AB-LIFE es segura puesto que no conduce a un aumento en la translocación de LAB ni facilita la translocación enterobacteriana. Todos los animales mostraron una evolución de peso corporal similar a lo largo del estudio. No se observaron diferencias significativas en el consumo de forraje y agua. No se detectaron síntomas clínicos ni alteraciones del bienestar de los animales. No se detectaron daños macroscópicos en órganos y cavidades durante el examen histopatológico.

20 TABLA 9. Translocación bacteriana al hígado de animales alimentados con AB-LIFE. Los números indican el número de animales con crecimiento bacteriano positivo y el número máximo de cfu/mg de tejido.

Grupo	Sexo	Enterobacterias (cfu/mg)	Bacterias acidolácticas (cfu/mg)	Translocación máxima (cfu/mg)	observada
Control	Machos	0/3	0/3	0	
	Hembras	0/3	0/3	0	
AB-LIFE	Machos	0/3	1/3	1	
	Hembras	0/3	0/3	0	

TABLA 10. Translocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos de animales alimentados con AB-LIFE. Los números indican el número de animales con crecimiento bacteriano positivo y el número máximo de cfu/mg de tejido.

Grupo	Sexo	Enterobacterias (cfu/mg)	Bacterias acidolácticas (cfu/mg)	Translocación máxima (cfu/mg)	observada
Control	Machos	0/3	1/3	1	
	Hembras	0/3	1/3	1	
AB-LIFE	Machos	0/3	1/3	1	
AB-LIFE	Hembras	0/3	1/3	1	

25

6. Propiedades antagonistas

Para evaluar si las cepas F2099, F3147 y F3276 presentaban actividades antagonistas, se realizó un protocolo de Campbell usando placas de agar sembradas con patógenos bacterianos en medio Oxoid. Los patógenos usados en este estudio se seleccionaron entre los comúnmente presentes en el tracto gastrointestinal humano (véase la TABLA 11). Los hisopos se frotaron uniformemente sobre las placas y se cultivaron hasta la confluencia a las temperaturas apropiadas en una incubadora de CO₂ al 5%. Después, una sección cilíndrica de una placa de agar de F2099, F3147 o F3276 confluyente sembrada uniformemente se puso cara a cara sobre la placa de patógeno y se incubó durante una noche a 37 °C.
30

Al día siguiente, las zonas de inhibición se midieron poniendo la placa de agar sobre una regla plana. La actividad inhibitoria de crecimiento se calculó después restando el diámetro del cilindro (CD) del diámetro de la zona de inhibición (IZD) y dividiendo esta diferencia por dos siguiendo la fórmula $GI = (IZD-CD) / 2$. Las capacidades de inhibición de las cepas de esta invención se compararon con las de las cepas comerciales Lp299v y Lp VSL#3.

5 TABLA 11. Valores de inhibición de crecimiento de acuerdo con la fórmula representada anteriormente.

	F2099	F3147	F3276	Lp VSL#3	Lp 299v
<u>Salmonella enterica Enteritidis</u> CECT 4155	0,45	0,775	0,6	0,6	0,25
<u>Salmonella enterica</u>	0,6	0,6	0,6	0,55	0,15
<u>Typhimurium</u> CECT 4594					
<u>Escherichia coli</u>	0,35	0,7	0,675	0,45	0,2
aislada de heces de lactantes					
<u>Proteus mirabilis</u>	0,975	0,85	0,675	0	0
<u>CECT 484</u>					
<u>Klebsiella oxytoca K108</u>	0,7	0,85	0,75	0,9	0,15
CIP 103434					
<u>Pseudomonas aureginosa</u>	0,3	0,3	0,2	0,2	0
aislada de heces de lactantes					
<u>Yersinia pseudotuberculosis</u>	1	3	10,25	1,8	0,4
CIP 104896					
<u>Clostridium perfringens</u>	0	0	1,7	0,15	0
aislada de heces de lactantes					
<u>Clostridium ramosum</u>	0	0	0,3625	0,2	0
ATCC 13937					
<u>Enterococcus faecalis</u>	0,625	0,8	0,7	0,45	0
CIP A186					

10 Las cepas F2099, F3147 y F3276 inhibieron el crecimiento de la mayoría de las cepas patógenas mostradas en la TABLA 11. Por lo tanto, benefician el equilibrio de la microbiota intestinal debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de cepas patógenas. Las cepas de esta invención tenían generalmente mejores propiedades antagonistas cuando en comparación con las cepas de control comerciales.

7. Evaluación in vitro de la capacidad de inmunomodulación de la producción de citocinas en un modelo de mucosa intestinal.

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

20 Se cultivaron células THP-1 obtenidas de la ATCC en medio DMEM en placas de ELISA de 24 pocillos a una concentración final de 10^6 monocitos/pocillo, aproximadamente. Las células se estimularon con LPS 10 ng/ml durante 2,5 horas antes de añadir las cepas bacterianas. Las cepas F2099, F3147, F3276 y Lp 299v se cultivaron previamente durante una noche en medio MRS a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de la incubación, la concentración de microorganismo se calculó usando la cámara de recuento de Neubauer y se diluyó apropiadamente para obtener una proporción final de 25:1 ($2,5 \times 10^7$) cfu/monocitos en 500 µl de DMEM en los pocillos de ELISA con células THP-1. Cada dilución se genera con medio DMEM complementado con gentamicina (50 µg/ml), ampicilina (10 µg/ml) y cloranfenicol (12 µg/ml).

La coincubación de células THP-1 con cepas de L. plantarum fue de 24 horas, tomándose alícuotas para un análisis adicional a las 6 horas y al final del experimento. Las alícuotas se centrifugaron y los sobrenadantes se ensayaron para TNF- α e IL-10 por citometría de flujo usando el kit comercial Kit Human Soluble Protein Master Buffer (BD Cytometric Bead Array) siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 5 Para la interpretación de los resultados obtenidos, se obtuvo la pendiente entre los valores obtenidos a las 6 y 24 horas y se normalizó. La pendiente normalizada se calculó con la fórmula siguiente, que se proporciona por el fabricante:

$$NS = ((1 - \text{valor de IL a 24h} / \text{valor de IL a 6h}) / 24) \times 100;$$

- 10 en la que NS es la pendiente normalizada, y el valor de IL (o TNF- α) es la concentración de la IL-10 o del TNF- α a las 6 ó 24 horas. Los resultados se expresan en pg/ml.

- 15 La razón para seleccionar este método es obtener un valor patrón que permite una comparación transversal entre los experimentos (TABLA 12), puesto que la evolución de la concentración de citocinas es más interesante que su valor absoluto (pg/ml). En los valores obtenidos a las 6 horas, las células THP-1 están todavía bajo la inducción de LPS; posteriormente, la concentración de TNF- α se eleva y la IL-10 se reduce. A las 24 horas, es posible observar la reversión del perfil de producción de citocinas (la reducción de TNF- α y el aumento de IL-10).

TABLA 12. Pendientes normalizadas que muestran la inducción (pendiente positiva) o inhibición (pendiente negativa) de IL-10 y TNF- α en células THP-1 inducidas por LPS.

	IL-10	TNF- α
F2099	20,56	-1,23
F3147	37,56	-1,61
F3276	31,46	-2,34
Lp 299v	21,42	-0,52

- 20 Como se muestra en la TABLA 12, las células THP-1 inducidas por LPS inducen la producción de IL-10 en presencia de cepas de L. plantarum, siendo la inducción de IL-10 especialmente elevada en presencia de la cepa F3276. Además, F2099, F3147 y F3276 tienen una mayor actividad de inhibición sobre la producción de TNF- α inflamatorio cuando se compara con la Lp 299v comercial.

8. Producción de ácidos grasos de cadena corta

- 25 Para ensayar la producción de ácido propiónico y butírico, las cepas de la invención y las cepas de control se cultivaron en medio basal complementado con el 1% p/v de cada una de las fibras siguientes: inulina (SIGMA I2255), pectina (SIGMA 76282) y fructooligosacáridos (FOS) (SIGMA F8052), que son fibras comúnmente presentes en la dieta diaria. La composición del medio basal puede observarse en la TABLA 13. El medio se preincubó durante 12 horas en una atmósfera anaerobia. Después de la inoculación con cada una de las cepas de Lp, los medios se incubaron durante una noche a 37 °C en condiciones anaerobias. Los cultivos de una noche se centrifugaron después y el sobrenadante se congeló rápidamente en nitrógeno líquido para el análisis de HPLC posterior en un cromatógrafo Agilent 1100 usando una columna de fase inversa Tracer Extrasil ODS2 (3 μ m, 15 x 0,4 cm). Los resultados para las concentraciones de ácido propiónico y butírico en las muestras pueden observarse en la TABLA 14.

TABLA 13. Composición de medio basal.

Compuesto	Concentración
Peptona	2 g/l
Extracto de levadura	2 g/l
NaCl	0,1 g/l
K ₂ HPO ₄	0,04 g/l
KH ₂ PO ₄	0,04 g/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g/l
CaCl ₂ 6H ₂ O	0,01 g/l
NaHCO ₃	2 g/l
Hemina	0,05 g/l
HCl Cisteína	0,5 g/l
Sal biliar	0,5 g/l
Tween 80	2 g/l
Vitamina K1	10 µl

TABLA 14. Producción de ácido propiónico y butírico de cepas de *L. plantarum* cultivadas en medio basal que contiene inulina, pectina y FOS.

	Ácido propiónico (mg/ml)	Ácido butírico (mg/ml)
F2099	15,546	14,185
F3147	12,23	12,294
F3276	44,939	21,636
Lp 299v	12,898	9,195

5

A partir de los resultados anteriores puede concluirse que las cepas de esta invención producen grandes cantidades de ácidos propiónico y butírico, ejerciendo por lo tanto efectos beneficiosos para el organismo hospedador.

9. Actividad hipocolesterolémica in vivo

10 El efecto de disminución de los niveles de colesterol de una composición probiótica de la invención en sujetos hipercolesterolémicos se investigó en un ensayo clínico aleatorio, doble ciego, controlado con placebo y paralelo. El estudio contemplaba además parámetros relacionados con el sistema cardiovascular adicionales, así como la tolerabilidad de la composición probiótica y sus propiedades organolépticas.

15 60 sujetos hipercolesterolémicos con edades comprendidas entre los 18 y los 65 años participaron en el estudio. El índice de masa corporal (IMC) de los participantes estaba entre 19 y 30 kg/m², el colesterol en suero total (C total) entre 200 y 300 mg/dl y el colesterol de baja densidad (C-LDL) entre 130 y 190, excepto para sujetos que presentaban dos o más factores de riesgo cardiovascular, para los que el C-LDL estaba comprendido entre 100 y 190 mg/dl. Ninguno de los participantes había recibido ninguna clase de tratamiento hipocolesterolémico durante las cuatro semanas anteriores al estudio. Se excluyeron los sujetos con hipertrigliceridemia superior a 350 mg/dl o que habían padecido un episodio isquémico cardiovascular en los 6 meses anteriores al comienzo del estudio. También se excluyeron las mujeres gestantes o amamantando y los sujetos alérgicos a cualquiera de los componentes de las composiciones. La diferencia entre participantes hombres y mujeres no era superior al 20%. Todos los participantes proporcionaron un consentimiento informado por escrito para participar y el protocolo de estudio se revisó y se autorizó por un comité ético independiente.

25 Durante 12 semanas, los participantes recibieron una sola dosis diaria oral de composición de control (placebo) o composición probiótica que comprende 1,2*10⁹ cfu de un cultivo mixto de proporciones equivalentes de las tres

5 cepas de la invención F2099, F3147 y F3276 (AB-LIFE 2). La formulación de composiciones de placebo y AB-LIFE puede observarse en la tabla 15. Ambas composiciones se administraron en forma de una cápsula de gelatina vegetal. El C-LDL, C total, LDL/HDL, LDL-oxidado, triglicéridos, tensión arterial, glucemia basal, peso, índice de cintura/caderas, grasa corporal y bienestar de los sujetos se controlaron a lo largo de todo el estudio. Además, se evaluaron las propiedades organolépticas y la tolerabilidad de las composiciones. Los valores medidos tanto para el grupo de probiótico AB-LIFE 2 como para el grupo de placebo se analizaron estadísticamente usando el programa SPSS.

TABLA 15. Formulación de composiciones de probiótico AB-LIFE 2 y placebo (valores en mg por cápsula).

AB-LIFE 2	Placebo
F2099, F3147 y F3276: 100	Almidón de maíz: 100 mg
Celulosa microcristalina (pH 10,2): 71,1	Celulosa microcristalina (pH 10,2): 71,1
Talco: 2,6	Talco: 2,6
Estearato de magnesio: 1,3	Estearato de magnesio: 1,3

10 Los resultados del ensayo clínico se muestran en las Tablas 16 y 17. Los valores medios y las desviaciones típicas para C total, C-LDL y LDL-oxidado antes y después del tratamiento para los grupos tanto de placebo como de probiótico pueden observarse en la Tabla 16. El porcentaje de reducción y el análisis estadístico intragrupo se muestran en la TABLA 17. Por lo tanto, se concluye que AB-LIFE 2 es un agente hipocolesterolémico efectiva.

15 Además, cuando se compara con productos de indicaciones similares, como el esteroles vegetal, la reducción de C total ejercida por el consumo de AB-LIFE 2 es superior (Plana N. et al., "Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects", Eur J Nutr., 2008, vol. 47, págs. 32-39).

TABLA 16. Valores medios y desviaciones típicas para C total, C-LDL y LDL-oxidada. t0, valores basales; tf, valores al final del tratamiento de 12 semanas.

	C total_t0		C total_tf	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
Placebo	252,63	23,47	242	22,676
AB-LIFE	247,43	31,28	213,77	18,68

	C-LDL_t0		C-LDL_tf	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
Placebo	168,4	19,592	158,53	18,17
AB-LIFE	166,67	21,595	142,17	13,28

	LDLoxidada_t0		LDLoxidada_tf	
	Media	Desv. típica	Media	Desv. típica
Placebo	56,42	9,99	55,38	9,71
AB-LIFE	54,68	10,99	47,23	8,32

20

TABLA 17. Porcentaje de reducción (y análisis estadístico intragrupo) de C total, C-LDL y LDL-oxidada en el grupo de probiótico AB_LIFE.

C total	13,60% ($p < 0,05$)
C-LDL	14,30% ($p < 0,05$)
LDL-oxidada	13,62% ($p < 0,05$)

REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

- 5 Tanaka H, Doesburg K, Iwasaki T, Mierau I, "Screening of Lactic Acid Bacteria for Bile Salt Hydrolase Activity". *Journal of Dairy Science* 1999, vol. 82, págs. 2530-35.
- Bukowska H, Pieczul-Mróz J, Jastrzebska M, Chełstowski K, Naruszewicz M, "Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol". *Atherosclerosis* 1998, vol. 137, págs. 437-38.
- 10 Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ, "Colonic health: fermentation and short chain fatty acids". *J Clin Gastroenterol* 2006, vol. 40, págs. 235-43.
- Naruszewicz M, Kozłowska-Wojciechowska M, "Potential parapharmaceuticals in the traditional Polish diet". *Journal of Physiology and Pharmacology* 2005, vol. 56, supl 1, págs. 69-78.
- 15 Goldstein M, Mascitelli L, Pezzetta F, "Statins, plant sterol absorption, and increased coronary risk". *Journal of Clinical Lipidology*, 2008, vol. 2, págs. 304-305.
- Kailasapathy K, "Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications". *Curr Issues Intest Microbiol* 2002, vol. 3, págs. 39-48.
- Lim HJ, Kim SY, Lee WK, "Isolation of cholesterol lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use". *J Vet Sci* 2004, vol. 5, págs. 391-5.
- 20 Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR, "Naive Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy". *Appl. Environ. Microbiol* 2007, vol. 73, págs. 5261-7.
- Base de datos RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>
- Proyecto de Base de Datos Ribosomal, <http://rdp.cme.msu.edu/>
- 25 Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM, "The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data" *Nucl. Acids Res.* 2007, vol. 35, págs. 169-72.
- Rodas AM, Ferrer S, Pardo I, "Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications", *Int J Syst Evol Microbiol* 2005, vol. 55, págs. 197-207.
- 30 Sánchez I, Seseña S, Palop LL, "Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with 'Almagro' eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis patterns", *Journal of Applied Microbiology* 2004, vol. 97, págs. 446-58.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B, "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing" *J Clin Microbiol* 1995, vol. 33, págs. 2233-9.
- 35 Zhou JS, Shu Q, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK, Gill HS, "Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria", *Food Chem Toxicol* 2000, vol. 38, págs. 153-61.
- Plana N, Nicolle C, Ferre R, Camps J, Cos R, Villoria J, Masana L; DANACOL group, "Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects", *Eur J Nutr.*, 2008, vol. 47, págs. 32-39.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AB BIOTICS S.A.

<120> Cepas de Lactobacillus plantarum como agentes hipocolesterolémicos

- 5 <130> P1483PC00
 <150> EP 09172613.3
 <151> 09-10-2009
 <150> US 61/265.095
 <151> 30-11-2009
- 10 <150> PCT EP2010/064304
 <151> 28-09-2009
 <160> 6
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
- 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador Eub27f directa
- 20 <400> 1
 gagtttgatc ctggctcag 19
- <210> 2
 <211> 22
- 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador Eub1492r inversa
- <400> 2
- 30 tacggytacc ttgttacgac tt 22
- <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
- 35 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 27f directa

ES 2 427 138 T3

	<400> 3	
	agagtttgat cctggctcag	20
	<210> 4	
5	<211> 57	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 357f directa	
10	<400> 4	
	cgcccgccgc gcccgcgcc cggcccgcg ccccgcgcc cctacgggag gcagcag	
	57	
	<210> 5	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 907r inversa	
20	<400> 5	
	ccgtcaattc cttgagttt	20
	<210> 6	
	<211> 19	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador 1492r inversa	
	<400> 6	
30	ggttacctg ttacgactt	19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cantidad efectiva de al menos una de las cepas seleccionadas del grupo que consiste en Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529 o cepas mutantes de las mismas, donde las cepas mutantes se obtienen usando las cepas depositadas como material de partida, y donde las cepas mutantes conservan o mejoran la actividad de disminución del colesterol de las cepas parentales.
2. La composición según la reivindicación 1, que comprende una cantidad efectiva de al menos una de las cepas seleccionadas del grupo que consiste en Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529.
- 10 3. La composición según la reivindicación 1, que comprende una cantidad efectiva de las cepas Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529, o cepas mutantes de las mismas, donde las cepas mutantes se obtienen usando las cepas depositadas como material de partida, y donde las cepas mutantes conservan o mejoran la actividad de disminución del colesterol de las cepas parentales.
- 15 4. La composición según la reivindicación 3, que comprende una cantidad efectiva de las cepas Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529.
5. La composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso como probiótico.
6. La composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso como agente de prevención y/o terapéutico.
- 20 7. La composición según la reivindicación 6, para su uso en la prevención y/o tratamiento de trastornos cardiovasculares.
8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, para su uso como un agente hipocolesterolémico.
9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, para su uso en combinación con estatinas.
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, para su uso en sujetos que hiperabsorben esterol.
- 25 11. Un producto farmacéutico y/o veterinario que comprende una cantidad efectiva de la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, junto con cantidades apropiadas de excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables.
12. Un producto comestible que comprende una cantidad efectiva de la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, junto con cantidades apropiadas de otros ingredientes comestibles.
- 30 13. Un producto comestible según la reivindicación 12, que es un complemento dietético.
14. Un producto comestible según la reivindicación 13, que es un nutracéutico.
15. Un producto comestible según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, que está en forma de un comprimido, cápsula, jarabe o píldora.
16. Un producto comestible según la reivindicación 12, que es un producto lácteo o un producto cárnico.
- 35 17. Una cepa de Lactobacillus plantarum seleccionada del grupo que consiste en Lactobacillus plantarum CECT 7527, Lactobacillus plantarum CECT 7528 y Lactobacillus plantarum CECT 7529.

FIG. 1

A

