

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 299**

51 Int. Cl.:

C12R 1/01 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.03.2013 PCT/IB2013/000518**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13144701**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2013 E 13723197 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2831287**

54 Título: **Composición basada en cepas de bacterias bifidobacterium longum capaz de ayudar a prolongar la vida**

30 Prioridad:

26.03.2012 IT MI20120471

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

19.07.2017

73 Titular/es:

MOGNA, GIOVANNI (100.0%)

Viale Roma 13/B

28100 Novara (NO), IT

72 Inventor/es:

MOGNA, GIOVANNI y

DRAGO, LORENZO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 625 299 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

COMPOSICIÓN BASADA EN CEPAS DE BACTERIAS BIFIDOBACTERIUM LONGUM CAPAZ DE AYUDAR A PROLONGAR LA VIDA

5 La presente invención se refiere a una composición basada en bacterias pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum* capaz de ayudar a prolongar la vida y promover el buen funcionamiento renal y/o intestinal, así como asegurar el bienestar corporal.

10 Es bien conocido que la microflora intestinal (microbiota) desempeña un papel esencial en el bienestar corporal y en la salud humana. Es igualmente conocido que la microflora intestinal se caracteriza por la presencia de un delicado equilibrio entre una población compleja de especies bacterianas patógenas y una población igualmente compleja de bacterias que realizan actividades que son beneficiosas y esenciales para el cuerpo. Hasta la fecha, se han hecho muchos esfuerzos para llegar a conocer y comprender el complejo sistema microbiota con el fin de determinar qué poblaciones de patógenos colonizan el tracto gastrointestinal y qué especies bacterianas son beneficiosas para el cuerpo. Por encima de todo, se han hecho muchos esfuerzos para entender y determinar qué factores contribuyen a modificar el complejo equilibrio dentro de la población de especies patógenas, dentro de la población de bacterias que aportan beneficios al cuerpo y entre estas dos poblaciones. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de ser capaces de identificar y seleccionar, dentro de la población de especies bacterianas que son beneficiosas para el cuerpo, las especies bacterianas prevalentes que están presentes en el complejo sistema microbiota; una vez aisladas, es igualmente necesario ser capaces de determinar sus efectos sobre el cuerpo con el fin de ser capaces de preparar composiciones farmacéuticas específicas o productos suplementarios o dispositivos médicos o composiciones alimenticias.

20 El Solicitante llevó a cabo una fase experimental en la cual identificó, seleccionó, aisló y caracterizó algunas cepas bacterianas que al ser evaluadas revelaron propiedades promotoras de la salud excelentes e inesperadas en términos de ayudar a prolongar la vida y promover la buena función intestinal, así como asegurar el bienestar corporal y un estado de salud que se prolonga en el tiempo.

25 La presente invención se refiere a una cepa bacteriana perteneciente a la especie *Bifidobacterium longum*, como se reivindica en la reivindicación anexa.

30 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar cultivos de bacterias pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum*, donde dicho procedimiento comprende una etapa en la cual al menos dos cepas bacterianas, pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum* - seleccionadas entre DLBL 07, DLBL 08 y DLBL 10, como descrito a continuación - se hacen crecer juntas de forma sinérgica en el mismo sustrato de cultivo, como se reivindica en la reivindicación anexa.

35 La presente invención además describe una composición farmacéutica o un dispositivo médico o un producto suplementario o una composición alimenticia o una composición cosmética que comprende al menos dos cepas bacterianas que pertenecen a la misma especie *Bifidobacterium longum*, obtenidas mediante un procedimiento de co-cultivo bacteriano, como se reivindica en la reivindicación anexa.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención se expondrán y se ilustrarán en la descripción detallada que sigue, sin pretender limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

40 El Solicitante se dedicó a una intensa actividad de investigación, durante la cual identificó, seleccionó, aisló y caracterizó las siguientes cepas bacterianas, las cuales forman la materia descrita en la presente invención, como se reivindica en la reivindicación 1.

Las siguientes cepas bacterianas fueron depositadas por la empresa Probiotal SpA, Via Mattei, 3 -28100 Novara (NO) Italia, en DSMZ-*Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen* GmbH, Alemania el 16.02.2012, de conformidad con el Tratado de Budapest:

- 1) *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
- 45 2) *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670
- 3) *Bifidobacterium longum* DLBL 09 = DSM 25671
- 4) *Bifidobacterium longum* DLBL 10 = DSM 25672
- 5) *Bifidobacterium longum* DLBL 11 = DSM 25673
- 6) *Bifidobacterium longum* DLBL 12 = DSM 25674

7) *Bifidobacterium longum* DLBL 13 = DSM 25675

8) *Bifidobacterium longum* DLBL 14 = DSM 25676

9) *Bifidobacterium longum* DLBL 15 = DSM 25677

10) *Bifidobacterium longum* DLBL 16 = DSM 25678

5 11) *Bifidobacterium longum* DLBL 17 = DSM 25679

La siguiente cepa bacteriana fue depositada por la empresa Probiotal SpA, Via Mattei, 3 -28100 Novara (NO) Italia, en DSMZ-*Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen* GmbH, Alemania el 24.02.2012, de conformidad con el Tratado de Budapest:

12) *Bifidobacterium longum* DLBL 18 = DSM 25708

10 Las siguientes cepas bacterianas fueron depositadas por la empresa Probiotal SpA, Via Mattei, 3 -28100 Novara (NO) Italia, en DSMZ-*Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen* GmbH, Alemania el 01.03.2012, de conformidad con el Tratado de Budapest:

13) *Bifidobacterium longum* DLBL 19 = DSM 25717

14) *Bifidobacterium longum* DLBL 20 = DSM 25718

15 Las cepas bacterianas anteriormente mencionadas se emplean de manera válida para preparar una composición farmacéutica o un dispositivo médico o un producto suplementario o una composición alimenticia o una composición cosmética (de aquí en adelante, en breve, "las composiciones") como se describe a continuación. Todas estas composiciones comprenden o, alternativamente, consisten en una mezcla bacteriana que comprende o, alternativamente, consiste en al menos dos cepas bacterianas que pertenecen a la especie *Bifidobacterium longum*.

20 Dicha mezcla que comprende o, alternativamente, consiste en estas cepas bacterianas se prepara mediante un proceso de "co-cultivo" sinérgico de cepas bacterianas individuales que pertenecen a la misma especie, *B. longum*. Dichas cepas se seleccionan del grupo que comprende o, alternativamente, consiste en las cepas indicadas como (1), (2) y (4), como se describe a continuación.

25 El Solicitante encontró útil llevar a cabo la fermentación mediante un procedimiento de "co-cultivo" sinérgico de cepas bacterianas individuales que pertenecen a la misma especie, *B. longum*, utilizando un número de cepas igual o superior a 2. El co-cultivo se lleva a cabo utilizando técnicas y equipamiento conocidos por la persona experta en la técnica, la cual es capaz de seleccionar los medios de cultivo, las fuentes de nitrógeno y carbono, así como las condiciones de operación para la fermentación y multiplicación celulares. El número de cepas utilizadas en el procedimiento de co-cultivo está comprendido entre 2 y 14 cepas; preferiblemente, dichas cepas se seleccionan entre aquellas indicadas anteriormente como (1) a (14). El número de las cepas utilizadas en el procedimiento de co-cultivo oscila entre 2 y 14 (por ejemplo, 2 cepas o 3 cepas o 4 cepas o 5 cepas o 6 cepas o 7 cepas u 8 cepas o 9 cepas u 10 cepas u 11 cepas o 12 cepas o 13 cepas o 14 cepas). Las cepas utilizadas en un procedimiento de "co-cultivo" sinérgico de bacterias de la misma especie, *B. longum*, se seleccionan entre aquellas pertenecientes a la especie *B. longum*. Preferiblemente, dichas cepas son aquellas indicadas anteriormente como (1) a (14). Se observó que las cepas bacterianas individuales pertenecientes a la misma especie *B. longum* de manera ventajosa sinergizan una con la otra durante el "co-cultivo" bacteriano. Hablando de manera práctica, la fermentación llevada a cabo mediante "co-cultivo" de bacterias de la misma especie, *B. longum* (es decir, llevada a cabo utilizando más de 2 cepas, por ejemplo, entre las indicadas como (1) a (14)), produce un número total de células que es mayor que el número total de células bacterianas obtenidas por fermentación utilizando una única cepa.

40 Además, durante el co-cultivo bacteriano, se producen metabolitos que caracterizan el sustrato de cultivo, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, así como desde el punto de vista de las propiedades intrínsecas del sustrato de cultivo en sí. El procedimiento de "co-cultivo" sinérgico de bacterias de la misma especie, *B. longum*, en realidad produce efectos potenciadores tanto durante la producción (fermentación) como durante el uso en humanos (en particular en el intestino). Los efectos potenciadores se refieren no solamente a la cantidad y la actividad biológica de las células bacterianas obtenidas, sino también a la cantidad y calidad de los metabolitos bacterianos.

45 Por lo tanto, todas las composiciones de la presente invención se preparan utilizando las cepas bacterianas producidas mediante fermentación llevada a cabo con un procedimiento de "co-cultivo" de bacterias de la misma especie, *B. longum*; preferiblemente, dichas cepas son aquellas indicadas como (1) a (14). Por esta razón, las composiciones se distinguen ventajosamente de aquellas presentes en el estado de la técnica.

Todas las cepas bacterianas preparadas mediante co-cultivo revelan propiedades promotoras de la salud excelentes e inesperadas en términos de ayudar a prolongar la vida y promover la buena función renal y/o intestinal, así como asegurar el bienestar corporal y un estado de salud que se prolonga en el tiempo.

5 De manera ventajosa, las cepas bacterianas de la presente invención son capaces de producir citoquinas. El análisis de las citoquinas individuales secretadas demostró la capacidad de las cepas bacterianas para inducir un incremento tanto en la citoquina pro-inflamatoria IFN-gamma como la citoquina antiinflamatoria/reguladora IL-10. Además, el ratio Th1/Th2 es mayor que 1. La mezcla bacteriana presente en la composición se caracteriza mediante una serie de cepas bacterianas que es capaz de modular el ratio Th1/Th2 de una manera óptima porque cada una de dichas cepas tiene una tendencia por sí misma a inducir un incremento en la citoquina pro-inflamatoria IFN-gamma o la citoquina antiinflamatoria/reguladora IL-10.

En una realización de la presente invención, el procedimiento de preparar una mezcla bacteriana comprende co-cultivar al menos dos cepas bacterianas seleccionadas del grupo que consiste en:

1) *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669

2) *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670

15 4) *Bifidobacterium longum* DLBL 10 = DSM 25672

En una realización de la presente invención el procedimiento de preparar una mezcla bacteriana comprende co-cultivar las siguientes cinco cepas bacterianas (mezcla de 5 cepas):

– *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669

– *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670

20 – *Bifidobacterium longum* DLBL 09 = DSM 25671

– *Bifidobacterium longum* DLBL 10 = DSM 25672

– *Bifidobacterium longum* DLBL 11 = DSM 25673.

En una realización de la presente invención el procedimiento de preparar una mezcla bacteriana comprende co-cultivar las siguientes cuatro cepas bacterianas (mezcla de 4 cepas):

25 – *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669

– *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670

– *Bifidobacterium longum* DLBL 09 = DSM 25671

– *Bifidobacterium longum* DLBL 11 = DSM 25673.

30 En una realización de la presente invención el procedimiento de preparar una mezcla bacteriana comprende co-cultivar las siguientes tres cepas bacterianas (mezcla de 3 cepas (a)):

– *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669

– *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670

– *Bifidobacterium longum* DLBL 11 = DSM 25673.

35 La presente invención también describe el procedimiento de preparar una mezcla bacteriana que comprende co-cultivar las siguientes tres cepas bacterianas (mezcla de 3 cepas (b)):

Bifidobacterium longum DLBL 09 = DSM 25671

Bifidobacterium longum DLBL 10 = DSM 25672

Bifidobacterium longum DLBL 11 = DSM 25673.

40 Las mezclas anteriormente mencionadas (mezclas de 5 cepas, 4 cepas y 3 cepas (a) y (b)) tienen una concentración (recuento bacteriano) comprendida entre 1×10^8 y 1×10^{11} UFC/g de mezcla, preferiblemente comprendida entre 1×10^9 y 1×10^{10} UFC/g de mezcla. En la mezcla de 5 cepas, cada cepa está presente en una relación en peso de 1:1:1:1:1. Cada cepa individual tiene una concentración (recuento bacteriano) comprendida entre 1×10^8 y 1×10^{11} UFC/g de bacterias, preferiblemente comprendida entre 1×10^9 y 1×10^{10} UFC/g de bacterias. En la mezcla de 4 cepas, cada cepa está presente en una relación en peso de 1:1:1:1. Cada cepa individual tiene una concentración (recuento bacteriano) comprendida entre 1×10^8 y 1×10^{11} UFC/g de bacterias, preferiblemente comprendida entre 1×10^9 y 1×10^{10} UFC/g de bacterias. En las mezclas de 3 cepas (a) y (b), cada cepa está presente en una relación en peso de 1:1:1.

45 Cada cepa individual tiene una concentración (recuento bacteriano) comprendida entre 1×10^8 y 1×10^{11} UFC/g de bacterias, preferiblemente comprendida entre 1×10^9 y 1×10^{10} UFC/g de bacterias.

En el contexto de la presente invención, las cepas bacterianas pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum* pueden estar presentes en las mezclas anteriormente mencionadas y por lo tanto en dichas composiciones en forma de células vivas y/o células muertas y/o como un metabolito y/o como un derivado celular y/o componente celular o enzimático de los mismos.

5 Las composiciones se pueden administrar a todas las categorías de personas sin ninguna limitación con el fin de ayudar a prolongar la vida de un individuo; para ralentizar y/o combatir y/o reducir procesos biológicos de envejecimiento, por ejemplo envejecimiento físico y/o cutáneo; para reducir procesos de envejecimiento que conducen a la pérdida de memoria o memoria visual y/o capacidad de concentración; para inhibir la producción de bacteroides por medio de un mecanismo no específico de inhibición (producción de metabolitos) y/o uno específico (producción de bacteriocinas);
 10 para estimular la producción de *Clostridia* butírica capaz de producir butiratos capaces de inhibir los fenómenos que conducen a la aparición de colitis, colitis ulcerosa, IBD (enfermedad inflamatoria del intestino) y enfermedad de Crohn; para inhibir y/o reducir la producción de enterobacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, en particular para reducir el número de enterobacterias presentes normalmente en una microbiota; para modificar el equilibrio presente en la microflora intestinal con el fin de hacer prevalecer la especie *Bifidobacterium longum*; para influir positivamente sobre la actividad antioxidante y la actividad inmunomoduladora con la producción de citoquinas; para reducir el contenido de metabolitos tóxicos producidos por o derivados de la degradación de proteínas, ayudando o mejorando de este modo la función renal.

La presente invención describe una composición farmacéutica o cosmética o un dispositivo médico o un producto suplementario o una composición alimenticia que comprende una mezcla de bacterias de cepas que comprenden al menos dos cepas bacterianas indicadas como (1) a (14) obtenidas con el procedimiento de co-cultivo. Dicha composición tiene aplicación válida para uso en un tratamiento para ralentizar y/o combatir y/o reducir procesos biológicos de envejecimiento físico y cutáneo; o para uso en un tratamiento para ralentizar y/o combatir y/o reducir los procesos de envejecimiento biológico que conducen a pérdida de memoria y/o capacidad de concentración. Dicha mezcla de cepas bacterianas se puede seleccionar de entre la mezcla de 5 cepas, mezcla de 4 cepas o mezcla de 3 cepas (a) o (b) que tienen las características establecidas anteriormente.

La presente invención describe una composición farmacéutica o cosmética o un dispositivo médico o un producto suplementario o una composición alimenticia que comprende una mezcla de cepas bacterianas que comprenden al menos dos cepas bacterianas indicadas como (1) a (14) obtenidas con el procedimiento de co-cultivo. Dicha composición tiene aplicación válida para uso en un tratamiento para inhibir la producción de bacteroides por medio de un mecanismo de inhibición no específico que implica la producción de metabolitos por dichas bacterias y/o por medio de un mecanismo específico que implica la producción de bacteriocinas por dichas bacterias; o para uso en un tratamiento para estimular la producción de *Clostridia* butírica capaz de producir butiratos para combatir la aparición de colitis, colitis ulcerosa, una inflamación del intestino o del tracto gastrointestinal o enfermedad de Crohn. Dicha mezcla de cepas bacterianas se puede seleccionar de entre la mezcla de 5 cepas, la mezcla de 4 cepas o la mezcla de 3 cepas (a) o (b) que tienen las características descritas anteriormente.

La presente invención describe una composición farmacéutica o cosmética o un dispositivo médico o un producto suplementario o una composición alimenticia que comprende una mezcla de cepas bacterianas que comprenden al menos dos cepas bacterianas indicadas como (1) a (14) obtenidas con el procedimiento de co-cultivo. Dicha composición tiene aplicación válida para uso en un tratamiento para reducir el contenido de metabolitos tóxicos producidos o derivados de la degradación de proteínas con el fin de mejorar la función renal. Dicha mezcla de cepas bacterianas se puede seleccionar de entre la mezcla de 5 cepas, la mezcla de 4 cepas o la mezcla de 3 cepas (a) o (b) que tienen las características descritas anteriormente.

La presente invención describe una composición farmacéutica o cosmética o un dispositivo médico o un producto suplementario o una composición alimenticia que comprende una mezcla de cepas bacterianas que comprenden al menos dos cepas bacterianas indicadas como (1) a (14) obtenidas con el procedimiento de co-cultivo. Dicha composición tiene aplicación válida para uso en un tratamiento antioxidante o inmunomodulador con la producción de citoquinas. Dicha mezcla de cepas bacterianas se puede seleccionar de entre la mezcla de 5 cepas, la mezcla de 4 cepas o la mezcla de 3 cepas (a) o (b) que tienen las características descritas anteriormente.

De manera ventajosa, todas las composiciones tienen aplicación válida en mantener una buena y eficiente función renal y/o en el tratamiento de la función renal en sujetos que padecen enfermedades y/o trastornos renales. Los trastornos relacionados con una alteración en la función renal o insuficiencia renal (a menudo presente en los ancianos) resultan en un incremento en los metabolitos tóxicos debido a la degradación de proteínas. Estos trastornos están relacionadas principalmente con cardiopatías y encefalopatías.

Las cepas bacterianas pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum*, descritas en la presente invención, pueden ayudar a contribuir a prolongar la vida de un ser humano dado que dichas cepas pueden intervenir de manera significativa gracias a su proteasoma (SUP= sistema ubiquitina-proteasoma). La acción del proteasoma hace posible

combatir los fenómenos biológicos que conducen al envejecimiento, preservando así el estado físico y/o mental de un ser humano.

5 De manera ventajosa, todas las composiciones comprenden o, alternativamente, consisten en un número variable de cepas bacterianas, pertenecientes a la especie *B. longum*, comprendidas entre 2 y 14 (por ejemplo, 2 cepas o 3 cepas o 4 cepas o 5 cepas o 6 cepas o 7 cepas u 8 cepas o 9 cepas o 10 cepas u 11 cepas o 12 cepas o 13 cepas o 14 cepas) que se producen mediante un procedimiento de "co-cultivo" de cepas bacterianas individuales pertenecientes a la misma especie *B. longum*; preferiblemente, dichas cepas se seleccionan entre aquellas indicadas anteriormente como (1) a (14).

10 De manera ventajosa, las composiciones, además de comprender una mezcla de cepas bacterianas seleccionadas de entre la mezcla de 5 cepas o la mezcla de 4 cepas o la mezcla de 3 cepas (a) o (b), puede comprender N-acetilcisteína (NAC) como tal o una sustancia basada en N-acetilcisteína (NAC) o un derivado de la misma en asociación con al menos dos cepas bacterianas producidas mediante un procedimiento de "co-cultivo" de cepas bacterianas individuales pertenecientes a la misma especie *B. longum*; preferiblemente, dichas cepas se seleccionan entre aquellas indicadas anteriormente como (1) a (14).

15 En este caso, hay una mejora adicional en la función renal debido también a la disminución de metabolitos tóxicos resultantes de la degradación alterada de proteínas y producidos por descarboxilación de aminoácidos (aminas biogénicas producidas por *E. coli*). Por lo tanto, en la presente invención se prevé utilizar N-acetilcisteína, tanto en forma libre como en forma microencapsulada gastroprotegida (de 10 a 1000 mg/día), que tiene un efecto de barrera mecánica para obstaculizar la capacidad de *E. coli* de adherirse a la pared intestinal. Además, la N-acetilcisteína
20 estimula la producción de glutatión y por lo tanto tiene una capacidad antioxidante. Las composiciones son capaces de preservar la actividad del proteasoma. Por esta razón se pueden administrar de manera válida a personas para ayudar a prolongar su vida.

25 La mezcla de cepas bacterianas seleccionadas de entre la mezcla de 5 cepas o la mezcla de 4 cepas o la mezcla de 3 cepas (a) o (b) está presente en la composición en una cantidad comprendida de 0,1 a 50% en peso, preferiblemente de 0,5 a 25% en peso; incluso más preferiblemente de 1 a 15% en peso, con respecto al peso total de la composición. Sin embargo, dicho porcentaje con respecto al peso total de la composición depende de la categoría de producto de la composición que se pretende preparar. Por ejemplo, en una cápsula la cantidad de dichas bacterias preferiblemente es mayor que 40%.

30 Las composiciones contienen bacterias que tienen una concentración comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{11} UCF/g, preferiblemente entre 1×10^8 y 1×10^{10} UCF/g.

Las composiciones pueden contener bacterias en una concentración comprendida entre 1×10^6 y 1×10^{11} UCF/dosis, preferiblemente entre 1×10^8 y 1×10^{10} UCF/dosis. La dosis puede estar comprendida entre 0,2 y 10 g; por ejemplo, es 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g.

35 Las bacterias utilizadas en la presente invención pueden estar en forma sólida, en particular en forma de polvo, polvo deshidratado, pulverización o forma liofilizada.

40 La composición alimenticia o producto suplementario o dispositivo médico o composición farmacéutica puede comprender además algunas fibras prebióticas e hidratos de carbono que tienen una acción bifidogénica, tales como, por ejemplo, inulina, fructo-oligosacáridos (FOS), galacto- y trans-galactooligosacáridos (GOS y TOS), gluco-oligosacáridos (GOSa), xilo-oligosacáridos (XOS), oligosacáridos de chitosán (COS), oligosacáridos de soja (SOS), isomalto-oligosacáridos (IMOS), almidón resistente, pectina, psilio, arabinogalactano, glucomanano, galactomanano, xilano, lactosacarosa, lactulosa, lactitol y diversos otros tipos de gomas, preferiblemente goma de tara, acacia, algarroba, avena o bambú, fibras cítricas y, en general, fibras que contienen una porción soluble y una insoluble, en una proporción variable entre sí.

45 De manera ventajosa, dicha fibra se selecciona entre el grupo que comprende FOS, inulina y fibras cítricas, preferiblemente en una relación en peso de 1:3 a 3:1.

La cantidad de las fibras prebióticas y/o hidratos de carbono que tienen una acción bifidogénica, si está presente, está comprendida entre 0,5 y 75% en peso, preferiblemente entre 1% y 40% y aún más preferiblemente entre 2 y 20% con respecto al peso total de la composición. En este caso se tiene una composición o suplemento con actividad simbiótica.

50 Las composiciones pueden comprender además uno o más aditivos o excipientes fisiológicamente aceptables, así como comprender otros ingredientes y/o componentes activos, tales como vitaminas, minerales, péptidos bioactivos, sustancias que tienen actividad antioxidante, hipocolesterolemizante, hipoglicemiante, anti-inflamatoria o edulcorante en una cantidad en peso comprendida generalmente entre 0,001% y 10% en peso, preferiblemente entre 0,5% y 5%,

dependiendo en cualquier caso del tipo de componente activo y la cantidad diaria recomendada del mismo, si está definida, con respecto al peso total de la composición.

Las composiciones se preparan utilizando técnicas ya conocidas disponibles para la persona experta en la técnica, quien es capaz de utilizar maquinaria y dispositivos y métodos de producción adecuados conocidos.

- 5 Adicionalmente a comprender una mezcla de cepas bacterianas seleccionadas de entre la mezcla de 5 cepas o la mezcla de 4 cepas o la mezcla de 3 cepas (a) o (b), las composiciones pueden contener elementos o sustancias con actividad antioxidante como mencionado anteriormente, en una cantidad en peso comprendida entre 0,0001% y 30% con respecto al peso de la composición final, dependiendo de la concentración de sustancias con actividad antioxidante y/o de la cantidad diaria recomendada (CDR), donde esté definida.
- 10 Puede estar presente selenio en la forma de selenato sódico, L-selenometionina, selenito sódico, selenito sódico ácido y ácido selenioso, así como en forma de microorganismos enriquecidos con selenio, por ejemplo levaduras, en una cantidad en peso comprendida entre 0,0005% y 0,005% con respecto al peso de la composición final, en cualquier caso suficiente para contribuir una cantidad de selenio preferiblemente comprendida entre 10 µg y 150 µg.

De manera ventajosa, el selenio está presente en la forma de selenio internalizado en células de bacterias probióticas.

- 15 Adicionalmente a comprender una mezcla de cepas bacterianas seleccionadas de entre la mezcla de 5 cepas o la mezcla de 4 cepas o la mezcla de 3 cepas (a) o (b), la composición puede contener además al menos una cepa bacteriana depositada por la empresa BIOMAN S.r.l., Via Alfieri 18, 10100 Turín, Italia, a saber:
- *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositada en DSMZ el 05/04/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16341, y/o
 - 20 – *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositada en DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16144, y/o
 - *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositada en DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16143.

Las composiciones pueden contener además al menos otra cepa seleccionada de entre las que siguen.

- 25 Las siguientes cepas bacterianas fueron depositadas por la empresa Probiotal SpA Via Mattei, 3 -28100 Novara (NO) Italia en DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Alemania el 16.02.2012, de conformidad con el Tratado de Budapest:

- i) *Lactobacillus johnsonii* DLLJO 01 = DSM 25680
- ii) *Lactobacillus rhamnosus* DLLR 07 = DSM 25681
- iii) *Lactobacillus rhamnosus* DLLR 08 = DSM 25682
- 30 iv) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 07 = DSM 25683
- v) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 08 = DSM 25684
- vi) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 09 = DSM 25685
- vii) *Bifidobacterium infantis* BI 03 = DSM 25709
- viii) *Lactobacillus plantarum* LP 09 = DSM 25710

- 35 La presente invención se refiere a un procedimiento para preparar cultivos de bacterias pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum*, donde dicho procedimiento comprende una etapa co-cultivo sinérgico de cepas bacterianas individuales pertenecientes a la especie *B. longum* donde dichos al menos dos cepas bacterianas - dichas cepas se seleccionan entre las indicadas como (1), (2) y (4) - se hacen crecer y replicarse juntas en un mismo sustrato de cultivo.

- 40 La composición farmacéutica o cosmética o dispositivo médico o producto suplementario o composición alimenticia (en resumen, las composiciones) comprende al menos dos cepas bacterianas. Dichas cepas se obtienen mediante un "co-cultivo" sinérgico de bacterias de la misma especie *B. longum*; preferiblemente, dichas cepas se seleccionan entre aquellas indicadas como (1) a (14). Dichas al menos dos cepas bacterianas se obtienen mediante un procedimiento de fermentación que incluye una etapa de co-cultivo bacteriano donde dichas al menos dos cepas bacterianas se hacen crecer y replicarse juntas en un mismo sustrato de cultivo. Las composiciones son para uso en un tratamiento para
- 45 ayudar a prolongar la vida de un ser humano; o para uso en un tratamiento para ralentizar y/o combatir y/o reducir los procesos biológicos de envejecimiento físico y cutáneo; o para uso en un tratamiento para ralentizar y/o combatir y/o reducir los procesos biológicos de envejecimiento que conducen a pérdida de memoria y/o la capacidad de concentración.

5 La composición farmacéutica o cosmética o dispositivo médico o producto suplementario o composición alimenticia (en resumen, las composiciones) comprende al menos dos cepas bacterianas pertenecientes a la especie *B. longum*; preferiblemente, dichas cepas se seleccionan de aquellas indicadas como (1) a (14), obtenidas mediante un "co-cultivo bacteriano", para uso en un tratamiento para inhibir la producción de bacteroides por medio de un mecanismo de inhibición no específico que implica la producción de metabolitos por dichas bacterias y/o por medio de un mecanismo específico que implica la producción de bacteriocinas por dichas bacterias; o para uso en un tratamiento para estimular la producción de *Clostridia* butírica capaz de producir butiratos para combatir la aparición de colitis, colitis ulcerosa, inflamación del intestino o del tracto gastrointestinal o enfermedad de Crohn.

10 La composición farmacéutica o cosmética o dispositivo médico o producto suplementario o composición alimenticia (en resumen, las composiciones) comprende al menos dos cepas bacterianas pertenecientes a la especie *B. longum*; preferiblemente, dichas cepas se seleccionan de entre aquellas indicadas como (1) a (14), obtenidas mediante "co-cultivo", para uso en un tratamiento para inhibir y/o reducir Enterobacterias, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* y presentes en microbiota.

15 La composición farmacéutica o cosmética o dispositivo médico o producto suplementario o composición alimenticia (en resumen, las composiciones) comprende al menos dos cepas bacterianas pertenecientes a la especie *B. longum*; preferiblemente, dichas cepas se seleccionan entre aquellas indicadas como (1) a (14), obtenidas mediante "co-cultivo", para uso en un tratamiento antioxidante o inmunomodulador con la producción de citoquinas.

20 Dicha composición, preferiblemente, puede comprender además dos o tres o cuatro o cinco o seis cepas bacterianas de acuerdo con aquellas indicadas como (1) a (14) y obtenidas mediante "co-cultivo"; preferiblemente en asociación con N-acetilcisteína o una sustancia basada en N-acetilcisteína o un derivado de la misma; preferiblemente en asociación con selenio en la forma de selenato sódico, L-selenometionina, selenito sódico, selenito sódico ácido, ácido selenioso o selenio internalizado en células de bacterias seleccionadas del grupo que comprende o, alternativamente, consiste en:

- *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositada en DSMZ el 05/04/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16341, y/o
- 25 – *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositada en DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16144, y/o
- *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositada en DSMZ el 17/01/2004 y que tiene el número de depósito DSM 16143.

Dicha composición, preferiblemente, puede comprender además al menos dos cepas bacterianas de (1) a (14), en asociación con al menos otra cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende:

- 30 i) *Lactobacillus johnsonii* DLLJO 01 = DSM 25680
- ii) *Lactobacillus rhamnosus* DLLR 07 = DSM 25681
- iii) *Lactobacillus rhamnosus* DLLR 08 = DSM 25682
- iv) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 07 = DSM 25683
- v) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 08 = DSM 25684
- 35 vi) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 09 = DSM 25685
- vii) *Bifidobacterium infantis* BI 03 = DSM 25709
- viii) *Lactobacillus plantarum* LP 09 = DSM 25710

Las composiciones pueden contener además al menos otra cepa seleccionada de entre aquellas indicadas en Tablas A.

Parte experimental

40 Se examinó la microbiota intestinal de 14 personas que tienen una edad comprendida entre 100 y 104 años (grupo de sujetos centenarios), junto con la microbiota intestinal de 10 personas que tienen una edad comprendida entre 27 y 54 años (grupo de sujetos adultos). Se analizaron bacterias pertenecientes a los siguientes grupos: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridia*, *Bacteroides*, *Levaduras*.

45 La Tabla 1 muestra, de una manera estadísticamente significativa: anaerobios totales, Enterobacteriaceae, Bifidobacterias, Bacteroides y Clostridia. Un mes antes del inicio del estudio clínico (recogida de muestras), ninguno de los sujetos tomó antibióticos, fármacos anti-estreñimiento o anti-diarreicos, inhibidores de bomba de protones o productos que contuvieran bacterias probióticas. Se excluyeron del estudio clínico sujetos con enfermedades crónicas intestinales o enfermedades metabólicas (diabetes, obesidad, enfermedades relacionadas con malabsorción). Se recogieron muestras fecales frescas en tubos estériles y se almacenaron a -80 °C por un período máximo de un mes

antes de ser sometidas a análisis. Cada sujeto proporcionó dos muestras en dos semanas sucesivas. Se evaluó el valor principal de las dos muestras. Las muestras se homogeneizaron en una solución salina de peptona estéril (caseína digerida con 1 g/l de enzimas, 8,5 g/l de cloruro sódico). Se llevó a cabo una dilución en serie (10 veces) y se sembraron 100 µl de tres diluciones apropiadas en los siguientes medios: Agar Trypticase Soya (TSA) + 5% sangre para los aerobios totales; agar Schaedler (SCH) + 5% sangre para los aerobios totales; agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) para Lactobacilos; Medio Selectivo para Bifidobacterium (BSM) para Bifidobacterias; agar MacConkey (MC) para *Enterobacteriaceae*; agar Slanetz (SZ) para enterococos; Schaedler + Kanamicina/Vancomicina (KV) para Bacteroides; agar Clostrisel (CLOS) para Clostridia; y agar Sabouraud (SAB) + Cloramfenicol 500 mg/l para levaduras. Las placas se incubaron como sigue: TSA a 37 °C durante 24 horas en 10% de aire enriquecido con CO₂; MC, SZ y SAB a 37 °C bajo anaerobiosis durante 24 horas, 24 y 48 horas, respectivamente; SCH, MRS, BSM, KV y CLOS a 37 °C bajo anaerobiosis durante 72 horas. Después de la incubación las colonias visibles se identificaron inicialmente de acuerdo con su morfología, tinción Gram-positiva, tinción Gram-negativa y ensayos de catalasa y oxidasa. A continuación se cultivaron posteriormente en condiciones seleccionadas. Entonces se contaron las colonias y el número de microorganismos se expresó como unidades formadoras de colonias por gramo de heces húmedas (UFC/g). El nivel de detección fue de 10² UFC/g. Las Bifidobacterias y Lactobacilos, las colonias de los cuales se contaron y diferenciaron previamente de acuerdo con su morfología, se identificaron adicionalmente a un nivel de especie mediante secuenciación de rADN 16S utilizando el método técnicamente conocido como pirosecuenciación. Se extrajo el ADN bacteriano de un cultivo puro. Se calentaron suspensiones de alrededor de 10¹⁰ UFC/ml a 100 °C durante 10 minutos y se centrifugaron a 18.000 rpm durante 2 minutos. Se almacenaron los sobrenadantes a -20 °C pendientes de análisis. Se secuenció el rADN 16S bacteriano y se comparó con la base de datos en línea descrita por Jonasson et al.; (*Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments* - APMIS2002; 110:263-272). Se analizaron estadísticamente las diferencias entre los recuentos de bacterias determinados en los 14 sujetos centenarios y en los 10 sujetos adultos más jóvenes (Ensayo de Wilcoxon-Mann-Whitney). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

25

Tabla 1: Recuento bacteriano principal (valor principal ± SD log10 por gramo de heces húmedas) para los 14 sujetos centenarios y para los 10 sujetos adultos más jóvenes.

	Centenarios (Edad 100-104 años)	Adultos (Edad 24-57 años)	
Total de Aerobios	7,7 ± 0,8	8,2 ± 1,2	n.s.
Total de Anaerobios	8,3 ± 0,6	9,1 ± 0,2	p < 0,05
Enterobacteriaceae	4,2 ± 1,7	6,6 ± 1,4	p < 0,05
Enterococos	6,3 ± 1,8	6,9 ± 1,4	n.s.
Estafilococos	3,6 ± 1,2	4,9 ± 1,2	n.s.
Lactobacilos	4,8 ± 2,3	5,4 ± 1,2	n.s.
Bifidobacterias	6,7 ± 1,4	8,3 ± 0,7	p < 0.05
Bacteroides	5,9 ± 1,3	7,7 ± 0,8	p < 0.05
Clostridios	4,1 ± 2,3	2,0 ± 0,0*	p < 0.05
Levaduras	2,5 ± 0,9	2,0 ± 0,0*	n.s.

n.s. = no estadísticamente significativo

* los recuentos más bajos que el límite de detección (10² UFC/g) se consideraron como 90 UFC/g.

30

Tabla 2: Especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aislados de sujetos centenarios y sujetos adultos más jóvenes.

Especies	Número de sujetos e intervalos de recuento	
	Centenarios (100-104 años)	Adultos (24-57 años)
<i>Lactobacillus reuteri</i>	3 ($10^5 - 10^7$)	0
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2 ($10^6 - 10^7$)	0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2 ($10^3 - 10^4$)	0
<i>Lactobacillus sakei</i>	2 (10^5)	2 ($10^5 - 10^6$)
<i>Lactobacillus casei</i>	1 (10^4)	2 ($10^4 - 10^5$)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	1 (10^3)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	2 ($10^4 - 10^5$)
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	0	1 (10^4)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	2 ($10^3 - 10^4$)
<i>Bifidobacterium longum</i>	14 ($10^3 - 10^8$)	3 (10^8)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2 ($10^4 - 10^8$)	6 ($10^7 - 10^8$)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1 (10^5)	4 (10^7)
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	0	4 (10^7)
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	0	2 ($10^7 - 10^8$)

Se llevó a cabo también una evaluación de un co-cultivo de varias cepas de la misma especie de *Bifidobacterium longum* aisladas de sujetos centenarios, cultivadas individualmente (una a la vez) y co-cultivadas en asociación binaria (dos a la vez) o en asociación ternaria (tres a la vez). El presente estudio se refiere a los 5 biotipos diferentes de *Bifidobacterium longum* mostrados en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

Código	Nº identificación colección de cepas	Número de depósito
DLBL 07	1820	DSM 25669
DLBL 08	1823	DSM 25670
DLBL 09	1821	DSM 25671
DLBL 10	1824	DSM 25672
DLBL 11	1825	DSM 25673

Las cepas anteriormente mencionadas fueron tomadas de un congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se descongelaron a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Después se trasplantaron - tanto individualmente en un porcentaje del 3% y en una mezcla que contiene 0,6% de cada cepa (de manera que se obtiene un inóculo total del 3%) - en el caldo de cultivo TPY para bifidobacterias (de acuerdo con Scardovi), cuya composición se describe a continuación:

Peptona tripticasa	10 g
Peptona Soytone	5 g
Glucosa	10 g

ES 2 625 299 T3

Extracto de levadura	5 g
Tween 80	1 ml
K ₂ HPO ₄	2 g
MgCl ₂	0,50 g
ZnSO ₄	0,25 g
CaCl ₂	0,15 g
Agua destilada	1000 ml
Solución de 5%* de hidrocloreuro de L(-) cisteína esterilizada con un filtro de 0,20 µm (2,5g en 50 ml de agua)	10 ml

Previamente el medio se reconstituyó y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Después de la esterilización el pH era igual a 6,60 (25 °C). En el momento de uso, la solución de 5% de hidrocloreuro de L-cisteína se añadió de manera aséptica al medio base.

- 5 Las 5 cepas y la mezcla de las mismas se incubó a una temperatura de 37 °C en condiciones anaerobias utilizando frascos Gas-Pak que contienen sistemas de anaerobiosis AnaeroGen Oxoid (código AN0035A). Después de 5 horas de incubación se enfriaron los cultivos de bifidobacterias y se sometieron a ensayos de pH y densidad óptica a una longitud de onda de 560 nm y un recuento de células viables de acuerdo con el método ISO 29981:2010 (E) IDF 220:2010(E) con medio agar TOS-propionato + mupirocina como descrito a continuación:

Peptona tripticasa	10 g
Extracto de levadura	1,0 g
K ₂ HPO ₄	4,8 g
KH ₂ PO ₄	3 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	3 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,20 g
(R)-cisteína • HCl • H ₂ O	0,5 g
Propionato sódico	15,0 g
TOS*	10,0 g
Agua destilada	965 ml

- 10 * TOS: mezcla de galactosa y glucosa obtenida mediante hidrólisis enzimática de lactosa utilizando una β-galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.

El medio anteriormente descrito se reconstituyó y se esterilizó a 121 °C durante 15 minutos. Antes de su uso, se añadió una solución de mupirocina esterilizada por filtración a fin de obtener una concentración antibiótica final en el medio de 50 mg/litro.

15 Resultados

Los resultados obtenidos se refieren a las cepas cultivadas individualmente y en mezclas binarias y ternarias (después de 5 horas de incubación), ver Tabla 4.

Tabla 4

Código	pH	Densidad Óptica	Células viables
DLBL 07	5,54	0,239	27 millones/ml
DLBL 08	5,67	0,316	38 millones/ml
DLBL 09	5,66	0,178	21 millones/ml
DLBL 10	5,53	0,288	29 millones/ml
DLBL 11	5,82	0,385	47 millones/ml
Mezclas binarias (DLBL 07, y/o DLBL 08, y/o DLBL 09, y/o DLBL 10, y/o DLBL 11)	5,40	0,390	De 40 a 45 millones/ml

Mezclas binarias de DLBL 07 y DLBL 08	5,50	0,392	41 millones/ml
Mezclas binarias de DLBL 08 DLBL 10	5,40	0,395	43 millones/ml
Mezclas binarias de DLBL 10 y DLBL 11	5,45	0,390	45 millones/ml
Mezcla ternaria de DLBL 07 y DLBL 08 y DLBL 09	5,35	0,410	45 millones/ml
Mezcla ternaria de DLBL 08 y DLBL 10 y DLBL 11	5,45	0,395	49 millones/ml
Mezcla ternaria de DLBL 09 y DLBL 10 y DLBL 11	5,50	0,400	47 millones/ml
Mezcla ternaria de DLBL 07 y DLBL 08 y DLBL 11	5,40	0,405	48 millones/ml
Mezcla de 4 cepas (DLBL 07 y DLBL 08 y DLBL 09 y DLBL 11)	5,39	0,395	49 millones/ml
Mezcla de 5 cepas (DLBL 07 y DLBL 08 y DLBL 09 y DLBL 10 y DLBL 11)	5,41	0,405	53 millones/ml

Como se puede observar, los recuentos de células viables de las bifidobacterias cultivadas individualmente son más bajos que los de mezclas binarias, ternarias y cuaternarias de las mismas y que la mezcla de 5 cepas. El promedio de los valores que se refieren a cepas individuales es 32,4 millones/ml, mientras que en la mezcla binaria está comprendido entre 40 y 45 millones/ml; en las mezclas ternarias y cuaternarias está comprendido entre 45 y 49 millones/ml. En la mezcla de 5 cepas se encontraron 53 millones/ml, equivalente a un incremento del 63%. Los mejores resultados obtenidos en términos de pH, densidad óptica y recuento de células viables en las mezclas binarias, ternarias y mezclas de 5 cepas de bifidobacterias co-cultivadas son atribuibles a un efecto sinérgico entre las cepas.

Parte experimental: propiedades inmunomoduladoras.

Se llevó a cabo una evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de las cepas *Bifidobacterium longum* DLBL 07 (DSM 25669), *Bifidobacterium longum* DLBL 08 (DSM 25670), *Bifidobacterium longum* DLBL 09 (DSM 25671), *Bifidobacterium longum* DLBL 10 (DSM 25672) y *Bifidobacterium longum* DLBL 11 (DSM 25673), todas con una concentración bacteriana de 1×10^9 UFC/g. El estudio se llevó a cabo sobre las cepas individuales y sobre la mezcla de 5 cepas (relación en peso [1:1:1:1:1]), mezcla de 4 cepas (relación en peso [1:1:1:1]) y mezclas de 3 cepas (a) y (b) (relación en peso [1:1:1]). Más específicamente, el análisis se realizó en sobrenadantes de cultivo después de diferentes tiempos de estimulación con el fin de analizar tanto las citoquinas implicadas en la inmunidad innata como aquellas responsables de la inmunidad adquirida.

i) Cultivos bacterianos y condiciones de crecimiento

Las cepas se cultivaron en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) en un baño de temperatura controlada a 37 °C. Para los experimentos de inmunomodulación, después de aproximadamente 16 horas de crecimiento, las bacterias se subcultivaron durante 6 horas en las condiciones anteriormente mencionadas con el fin de alcanzar la fase de crecimiento exponencial.

Posteriormente se lavaron dos veces con solución salina de fosfato estéril tamponada (PBS, pH 7,2); se determinó el estado fisiológico y el número de células mediante citometría de flujo utilizando un kit comercial, "Kit de Viabilidad Celular con perlas líquidas", comercializado por la empresa Becton Dickinson, y siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Entonces se llevaron las células hasta la concentración óptima establecida en experimentos preliminares y se utilizaron en ensayos posteriores.

ii) Separación de las células mononucleares de sangre periférica

Se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) mediante centrifugación por gradiente de densidad. Para este propósito, en cada experimento se hizo uso de 20 ml de capas leucocitarias obtenidas de donantes sanos en el Departamento de Inmuno-transfusión del Hospital Borgomanero, con una cantidad promedio de 200×10^6 PBMC/capa leucocitaria. Se determinó la cantidad de células separadas en cámaras de recuento celular Bürker utilizando tinción de Turk, lo cual permite realizar una distinción entre células mononucleares y células polimorfonucleares.

Las células se llevaron hasta una concentración de 2×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado mediante calor (FCS, Gibco), 1% de glutamina y 25 mM HEPES.

iii) Estimulación de PBMC con bifidobacterias

Después de separación, se estimularon las PBMCs con las cepas bacterianas durante 1 y 5 días. Los controles internos de cada experimento individual se representaron mediante

Control negativo: : PBMCs solas

5 Control de 1-día: : PBMCs estimuladas con 1 µg/ml de Lipopolisacáridos (LPS; Escherichia coli, serotipo 055:B5, Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO).

Control de 5-días: PBMCs estimuladas con 1 µg/ml de Fitohemaglutinina (PHA-P; Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO).

10 En diferentes momentos de análisis, se centrifugaron los cultivos a 1500 rpm durante 10 minutos. Se retiraron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C hasta el momento del análisis. Las células se utilizaron para ensayos posteriores.

iv) Ensayo de citoquinas

15 La concentración de citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante E.L.I.S.A. (**Ensayo Por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas = Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay**). **Más específicamente, se utilizó "ELISA Module set" de la empresa Bender MedSystems para ensayar las citoquinas IL-10 e IFN-gamma. La Fig. 1 muestra la secreción promedio de citoquinas ± SEM de 4 ensayos independientes.** Se calculó la significancia estadística mediante una prueba t de Student. Valores de $p < 0,05$, calculados con respecto al valor basal (PBMCs no estimuladas), deben considerarse estadísticamente significativos. La producción de la citoquina IL-10 se evaluó en los sobrenadantes de cultivo después de 1 día de estimulación. La producción de IFN-gamma se evaluó en los sobrenadantes de cultivo después de 5 días de estimulación.

v) Análisis estadístico

20 El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student para datos pareados. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

vi) Resultados

Secreción de citoquinas

25 El espectro diferente de citoquinas secretadas por subpoblaciones celulares implicadas en la respuesta inmune desempeña un papel importante en la elección del tipo de sistema efector que se debe utilizar en respuesta a una provocación de un antígeno particular. Los linfocitos T son los principales efectores y reguladores de la inmunidad mediada por células. En respuesta a un antígeno o un agente patógeno, las células T sintetizan y secretan una variedad de citoquinas que son necesarias para el crecimiento y diferenciación de y como factores de activación para otras células inmunocompetentes.

30

Con el fin de investigar si las cepas bacterianas estudiadas inducían una secreción diferente de citoquinas por PBMCs, las células se activaron durante 1 y 5 días. La cantidad de citoquinas (IFN-gamma e IL-10) liberadas en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante E.L.I.S.A.

Citoquinas con una acción prevalente pro-inflamatoria

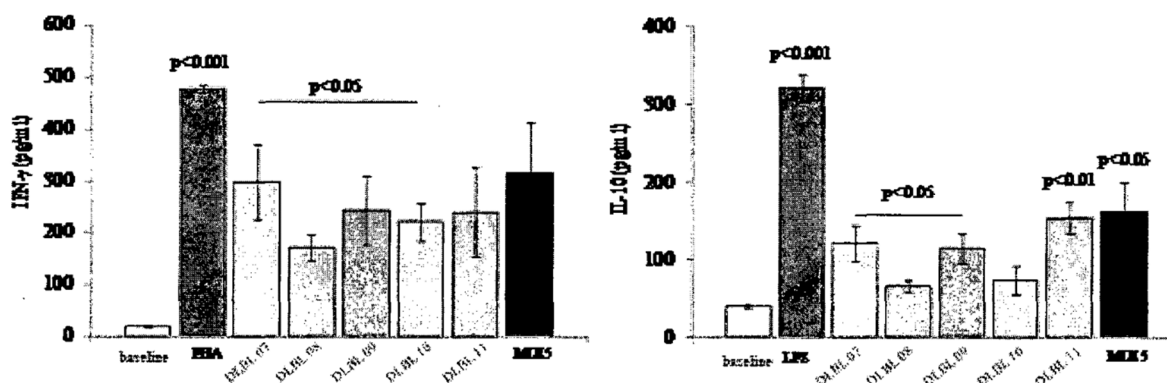
35 En el presente estudio se realizó una evaluación de la inducción de la citoquina IFN-gamma, como la más representativa de las citoquinas que tienen una acción predominantemente pro-inflamatoria. Como se puede ver en la figura 1, todas las cepas bacterianas estudiadas indujeron un incremento en la secreción de IFN-gamma, en comparación con las condiciones de línea base. La significancia estadística se obtuvo después de estimular con las cepas DLBL 07, DLBL 08 y DLBL 09. La estimulación con la mezcla de 5 cepas (MIX 5) no produjo un incremento adicional en la secreción de IFN-gamma en comparación con lo obtenido con algunas cepas individuales (Figura 1).

40

Citoquinas con una acción prevalente inmunoreguladora

45 En el presente estudio se realizó una evaluación de la inducción de la citoquina IL-10, como la más representativa de las citoquinas que tienen una acción predominantemente inmunoreguladora. Como se puede ver en la figura 1, todas las cepas bacterianas estudiadas indujeron un incremento en la secreción de la citoquina analizada, en comparación con las condiciones de línea base. La significancia estadística no se alcanzó en presencia solamente de la cepa DLBL 10.

La estimulación con la mezcla de 5 cepas (MIX 5) no produjo un incremento adicional en la secreción de IL-10 en



comparación con lo obtenido con algunas cepas individuales (Figura 1).

Figura 1: Secreción de citoquinas promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Se calculó la significancia estadística mediante una prueba t de Student. Valores de $p < 0,05$, calculados con respecto al valor basal (PBMCs no estimuladas), deben considerarse estadísticamente significativos. La producción de la citoquina IL-10 se evaluó en los sobrenadantes de cultivo después de 1 día de estimulación. La producción de IFN-gamma se evaluó en los sobrenadantes de cultivo después de 5 días de estimulación.

En el presente estudio, el análisis de las citoquinas individuales secretadas demostró la capacidad de las cepas bacterianas para inducir un incremento tanto en la citoquina pro-inflamatoria IFN-gamma como en la citoquina antiinflamatoria/reguladora IL-10.

Con el fin de comprender mejor la acción inmunomoduladora real de las cepas bacterianas, se analizó la relación entre la citoquina con una acción prevalente pro-inflamatoria y la que tiene una acción prevalente inmunorreguladora. La colonización intestinal por las bacterias con propiedades pro-Th1 específicas, tales como las cepas estudiadas por si mismas o en mezclas, podría ser un factor adicional en todas aquellas patologías que se caracterizan por un cambio en el equilibrio Th1/Th2 hacia un pronunciado perfil de tipo Th2, tales como enfermedades alérgicas (asma, rinitis alérgica y eccema atópico) y enfermedades autoinmunes causadas por autoanticuerpos (Lupus eritematoso sistémico y algunas formas de tiroiditis). De hecho la reacción alérgica se caracteriza por un cambio en el equilibrio Th1/Th2 hacia un pronunciado perfil de tipo Th2, con producción de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13.

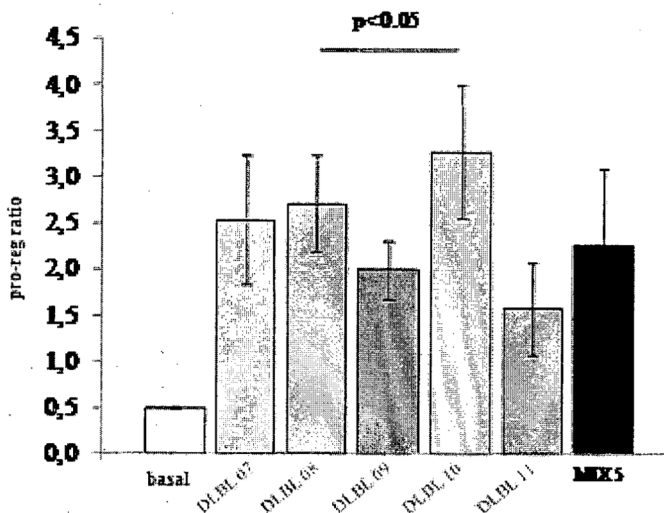


Tabla A

No.	Nombre	Código común	Institución de depósito	Número de depósito	Fecha de depósito	Propietario
1	<i>Lactobacillus casei</i>	LF1i	CNCM I.P.	I-785	21.07.1988	Anidral Srl
2	<i>Lactobacillus gasserii</i>	LF2i	CNCM I.P.	I-786	21.07.1988	Anidral Srl
3	<i>Lactobacillus crispatus</i>	LF3i	CNCM I.P.	I-787	21.07.1988	Anidral Srl
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF4i	CNCM I.P.	I-788	21.07.1988	Anidral Srl
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF5	CNCM I.P.	I-789	21.07.1988	Anidral Srl
6	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>pseudoplatantum</i>	LFH i	CNCM I.P.	I-790	21.07.1988	Anidral Srl
7	<i>Streptococcus thermophilus</i> B39		BCCM LMG	LMG P-18383	5.05.1998	Anidral Srl
8	<i>Streptococcus thermophilus</i> T003		BCCM LMG	LMG P-18384	5.05.1998	Anidral Srl
9	<i>Lactobacillus pentosus</i> 9/1 ei		BCCM LMG	LMG P-21019	16.10.2001	Mofin Srl
10	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776/1 bi	LP 02	BCCM LMG	LMG P-21020	16.10.2001	Mofin Srl
11	<i>Lactobacillus plantarum</i> 476LL 20 bi	LP 01	BCCM LMG	LMG P-21021	16.10.2001	Mofin Srl
12	<i>Lactobacillus plantarum</i> PR ci		BCCM LMG	LMG P-21022	16.10.2001	Mofin Srl
13	<i>Lactobacillus plantarum</i> 776 /2 hi		BCCM LMG	LMG P-21023	16.10.2001	Mofin Srl
14	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>paracasei</i> 181A/3 aiai	LPC00	BCCM LMG	LMG P-21380	31.01.2002	Anidral Srl
15	<i>Lactobacillus perteneciente al grupo acidófilo</i> 192A/1 aiai	LA 02	BCCM LMG	LMG P-21381	31.01.2002	Anidral Srl
16	<i>Bifidobacterium longum</i> 175A/1 aiai		BCCM LMG	LMG P-21382	31.01.2002	Anidral Srl
17	<i>Bifidobacterium breve</i> 195A/1 aiai		BCCM LMG	LMG P-21383	31.01.2002	Anidral Srl
18	<i>Bifidobacterium lactis</i> 32A/3 aiai	BS 01	BCCM LMG	LMG P-21384	31.01.2002	Anidral Srl
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/2 gi	COACTIVA (COAKTIV)	BCCM LMG	LMG P-21385	31.01.2002	Mofin Srl
20	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci		BCCM LMG	LMG P-21388	31.01.2002	Mofin Srl
21	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 hi		BCCM LMG	LMG P-21387	15.03.2002	Mofin Srl
22	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 501/4 ci		BCCM LMG	LMG P-21388	31.01.2002	Mofin Srl
23	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/4 li		BCCM LMG	LMG P-21389	15.03.2002	Mofin Srl
24	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA08	BCCM LMG	LMG P-26144	03.11.2010	Probiotical SpA
25	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>Paracasei</i>	LPC10	BCCM LMG	LMG P-26143	03.11.2010	Probiotical SpA
26	<i>Streptococcus thermophilus</i>	GB1	DSMZ	DSM 16506	18.06.2004	Anidral Srl
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>	GB5	DSMZ	DSM 16507	18.06.2004	Anidral Srl
28	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y02	DSMZ	DSM 16590	20.07.2004	Anidral Srl
29	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y03	DSMZ	DSM 16591	20.07.2004	Anidral Srl
30	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y04	DSMZ	DSM 16592	20.07.2004	Anidral Srl
31	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Y05	DSMZ	DSM 16593	20.07.2004	Anidral Srl
32 =56	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	BA 03	DSMZ	DSM 16594	21.07.2004	Anidral Srl
33	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	BA 04	DSMZ	DSM 16595	21.07.2004	Anidral Srl
34	<i>Bifidobacterium breve</i>	BR 04	DSMZ	DSM 16596	21.07.2004	Anidral Srl
35	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	BP 01	DSMZ	DSM 16597	21.07.2004	Anidral Srl
36	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	BP 02	DSMZ	DSM 16598	21.07.2004	Anidral Srl
37	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL 03	DSMZ	DSM 16603	20.07.2004	Anidral Srl
38	<i>Bifidobacterium breve</i>	BR 03	DSMZ	DSM 16604	20.07.2004	Anidral Srl
39	<i>Lactobacillus casei</i> ssp.	LR 04	DSMZ	DSM 16605	20.07.2004	Anidral Srl

ES 2 625 299 T3

	<i>rhamnosus</i>					
40	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	LDB 01	DSMZ	DSM 16606	20.07.2004	Anidral Srl
41	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	LDB 02	DSMZ	DSM 16607	20.07.2004	Anidral Srl
42	<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX01	DSMZ	DSM 17102	01.02.2005	Anidral Srl
43 = 57	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	BA 02	DSMZ	DSM 17103	01.02.2005	Anidral Srl
44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP 07	DSMZ	DSM 17104	01.02.2005	Anidral Srl
45	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO8	DSMZ	DSM 17843	21.12.2005	Anidral Srl
46	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO9	DSMZ	DSM 17844	21.12.2005	Anidral Srl
47	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO100	DSMZ	DSM 17845	21.12.2005	Anidral Srl
48	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF06	DSMZ	DSM 18295	24.05.2006	Anidral Srl
49	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF07	DSMZ	DSM 18296	24.05.2006	Anidral Srl
50	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF08	DSMZ	DSM 18297	24.05.2006	Anidral Srl
51	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF09	DSMZ	DSM 18298	24.05.2006	Anidral Srl
52	<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGS01	DSMZ	DSM 18299	24.05.2006	Anidral Srl
53	<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGS02	DSMZ	DSM 18300	24.05.2006	Anidral Srl
54	<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGS03	DSMZ	DSM 18301	24.05.2006	Anidral Srl
55	<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGS04	DSMZ	DSM 18302	24.05.2006	Anidral Srl
56 32	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-3 <i>Bifidobacterium catenulatum</i> sp. <i>/pseudocatenulatum</i> EI-3I, ID 09-255	BA 03	DSMZ	DSM 18350	15.06.2006	Anidral Srl
57 = 43	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-15	BA 02	DSMZ	DSM 18351	15.06.2006	Anidral Srl
58	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI-18 <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> EI-18, ID 09-256	BA 05	DSMZ	DSM 18352	15.06.2006	Anidral Srl
59	<i>Bifidobacterium catenulatum</i> EI-20	BC01	DSMZ	DSM 18353	15.06.2006	Anidral Srl
60	<i>Streptococcus thermophilus</i> FRai	MO1	DSMZ	DSM 18613	13.09.2006	Mofin Srl
61	<i>Streptococcus thermophilus</i> LB2bi	MO2	DSMZ	DSM 18614	13.09.2006	Mofin Srl
62	<i>Streptococcus thermophilus</i> LRci	MO3	DSMZ	DSM 18615	13.09.2006	Mofin Srl
63	<i>Streptococcus thermophilus</i> FP4	MO4	DSMZ	DSM 18616	13.09.2006	Mofin Srl
64	<i>Streptococcus thermophilus</i> ZZ5F8	MO5	DSMZ	DSM 18617	13.09.2006	Mofin Srl
65	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO4	MO6	DSMZ	DSM 18618	13.09.2006	Mofin Srl
66	<i>Streptococcus thermophilus</i> S1ci	MO7	DSMZ	DSM 18619	13.09.2006	Mofin Srl
67	<i>Streptococcus thermophilus</i> 641 bi	MO8	DSMZ	DSM 18620	13.09.2006	Mofin Srl
68	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A/1ai	MO9	DSMZ	DSM 18621	13.09.2006	Mofin Srl
69	<i>Streptococcus thermophilus</i> 277A/2ai	MO10	DSMZ	DSM 18622	13.09.2006	Mofin Srl
70	<i>Streptococcus thermophilus</i> IDC11	MO11	DSMZ	DSM 18623	13.09.2006	Mofin Srl
71	<i>Streptococcus thermophilus</i> ML3di	MO14	DSMZ	DSM 18624	13.09.2006	Mofin Srl
72	<i>Streptococcus thermophilus</i> TEO3	MO15	DSMZ	DSM 18625	13.09.2006	Mofin Srl
73	<i>Streptococcus thermophilus</i> G62	GG1	DSMZ	DSM 19057	21.02.2007	Mofin Srl
74	<i>Streptococcus thermophilus</i> G1192	GG2	DSMZ	DSM 19058	21.02.2007	Mofin Srl

ES 2 625 299 T3

75	<i>Streptococcus thermophilus</i> GB18	GG3 MO2	DSMZ	DSM 19059	21.02.2007	Mofin Srl
76	<i>Streptococcus thermophilus</i> CCR21	GG4	DSMZ	DSM 19060	21.02.2007	Mofin Srl
77	<i>Streptococcus thermophilus</i> G92	GG5	DSMZ	DSM 19061	21.02.2007	Mofin Srl
78	<i>Streptococcus thermophilus</i> G69	GG6	DSMZ	DSM 19062	21.02.2007	Mofin Srl
79	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 10	DSMZ	DSM 19063	21.02.2007	Anidral Srl
80	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 11	DSMZ	DSM 19064	21.02.2007	Anidral Srl
81	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 12	DSMZ	DSM 19065	21.02.2007	Anidral Srl
82	<i>Streptococcus thermophilus</i>	YO 13	DSMZ	DSM 19066	21.02.2007	Anidral Srl
83	<i>Weissella ssp.</i> WSP 01	EX	DSMZ	DSM 19067	21.02.2007	Anidral Srl
84	<i>Weissella ssp.</i> WSP 02	EX	DSMZ	DSM 19068	21.02.2007	Anidral Srl
85	<i>Lactobacillus ssp.</i> WSP 03	EX	DSMZ	DSM 19069	21.02.2007	Anidral Srl
86	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 09	OY	DSMZ	DSM 19070	21.02.2007	Anidral Srl
87	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 10	OY	DSMZ	DSM 19071	21.02.2007	Anidral Srl
88	<i>Lactococcus lactis</i>	NS 01	DSMZ	DSM 19072	21.02.2007	Anidral Srl
89	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF 10	DSMZ	DSM 19187	20.03.2007	Anidral Srl
90	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LF 11	DSMZ	DSM 19188	20.03.2007	Anidral Srl
91	<i>Lactobacillus casei ssp. rhamnosus</i>	LR05	DSMZ	DSM 19739	27.09.2007	Anidral Srl
92	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB01	DSMZ	DSM 19818	30.10.2007	Anidral Srl
93	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 01	Lb	DSMZ	DSM 19948	28.11.2007	Anidral Srl
94	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 02	Lb	DSMZ	DSM 19949	28.11.2007	Anidral Srl
95	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 03	Lb	DSMZ	DSM 19950	28.11.2007	Anidral Srl
96	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 04	Lb	DSMZ	DSM 19951	28.11.2007	Anidral Srl
97	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> LD 05	Lb	DSMZ	DSM 19952	28.11.2007	Anidral Srl
98	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	B660	DSMZ	DSM 21444	13.05.2008	Probiotal SpA
99	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA02	DSMZ	DSM 21717	06.08.2008	Probiotal SpA
100	<i>Lactobacillus paracasei</i>	LPC 08	DSMZ	DSM 21718	06.08.2008	Probiotal SpA
101	<i>Lactobacillus pentosus</i>	LPS 01	DSMZ	DSM 21980	14.11.2008	Probiotal SpA
102	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LR 06	DSMZ	DSM 21981	14.11.2008	Probiotal SpA
103	<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. Delbrueckii</i>	DSMZ 20074	DSMZ	DSM 22106	10.12.2008	Probiotal SpA
104	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP1	DSMZ	DSM 22107	10.12.2008	Probiotal SpA
105	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS01	DSMZ	DSM 22775	23.07.2009	Probiotal SpA
106	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS03	DSMZ	DSM 22776	23.07.2009	Probiotal SpA
107	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB01	DSMZ	DSM 22892	28.08.2009	Probiotal SpA
108	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		DSMZ	DSM 22893	28.08.2009	Probiotal SpA
109	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB03	DSMZ	DSM 22894	28.08.2009	Probiotal SpA
110	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BS05	DSMZ	DSM 23032	13.10.2009	Probiotal SpA
111	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA 06	DSMZ	DSM 23033	13.10.2009	Probiotal SpA
112	<i>Lactobacillus brevis</i>	LBR01	DSMZ	DSM 23034	13.10.2009	Probiotal SpA
113	<i>Bifidobacterium animalis ssp.</i>	BS06	DSMZ	DSM 23224	12.01.2010	Probiotal

ES 2 625 299 T3

	<i>lactis</i>					SpA
114	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL04	DSMZ	DSM 23233	12.01.2010	Probiotical SpA
115	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL05	DSMZ	DSM 23234	12.01.2010	Probiotical SpA
116	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	MB 109	DSMZ	DSM 23731	29.06.2010	Probiotical SpA
117	<i>Bifidobacterium breve</i>	MB 113	DSMZ	DSM 23732	29.06.2010	Probiotical SpA
118	<i>Bifidobacterium lactis</i>	MB 2409	DSMZ	DSM 23733	29.06.2010	Probiotical SpA
119	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE01	DSMZ	DSM 23877	05.08.2010	Probiotical SpA
120	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE02	DSMZ	DSM 23878	05.08.2010	Probiotical SpA
121	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE03	DSMZ	DSM 23879	05.08.2010	Probiotical SpA
122	<i>Lactobacillus reuteri</i>	LRE04	DSMZ	DSM 23880	05.08.2010	Probiotical SpA
123	<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i>	LPC09	DSMZ	DSM 24243	23.11.2010	Probiotical SpA
124	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA 07	DSMZ	DSM 24303	23.11.2010	Probiotical SpA
125	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB04	DSMZ	DSM 24437	04.01.2011	Probiotical SpA
126	<i>Lactobacillus crispatus</i>	CRL 1251	DSMZ	DSM 24438	04.01.2011	Probiotical SpA
127	<i>Lactobacillus crispatus</i>	CRL 1266	DSMZ	DSM 24439	04.01.2011	Probiotical SpA
128	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CRL 1289	DSMZ	DSM 24440	04.01.2011	Probiotical SpA
129	<i>Lactobacillus salivarius</i>	CRL 1328	DSMZ	DSM 24441	04.01.2011	Probiotical SpA
130	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CRL 1259	DSMZ	DSM 24512	25.01.2011	Probiotical SpA
131	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CRL 1294	DSMZ	DSM 24513	25.01.2011	Probiotical SpA
132	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS04	DSMZ	DSM 24618	02.03.2011	Probiotical SpA
133	<i>Lactobacillus crispatus</i>	LCR01	DSMZ	DSM 24619	02.03.2011	Probiotical SpA
134	<i>Lactobacillus crispatus</i>	LCR02	DSMZ	DSM 24620	02.03.2011	Probiotical SpA
135	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA09	DSMZ	DSM 24621	02.03.2011	Probiotical SpA
136	<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGS05	DSMZ	DSM 24622	02.03.2011	Probiotical SpA
137	<i>Lactobacillus paracasei</i>	LPC11	DSMZ	DSM 24623	02.03.2011	Probiotical SpA
138	<i>Bifidobacterium infantis</i>	BI 02	DSMZ	DSM 24687	29.03.2011	Probiotical SpA
139	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB 06	DSMZ	DSM 24688	29.03.2011	Probiotical SpA
140	<i>Bifidobacterium longum</i>	BL 06	DSMZ	DSM 24689	29.03.2011	Probiotical SpA
141	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BS 07	DSMZ	DSM 24690	29.03.2011	Probiotical SpA
142	<i>Bifidobacterium longum</i>	PCB133	DSMZ	DSM 24691	29.03.2011	Probiotical SpA
143	<i>Bifidobacterium breve</i>	B632	DSMZ	DSM 24706	07.04.2011	Probiotical SpA
144	<i>Bifidobacterium breve</i>	B2274	DSMZ	DSM 24707	07.04.2011	Probiotical SpA
145	<i>Bifidobacterium breve</i>	B7840	DSMZ	DSM 24708	07.04.2011	Probiotical

ES 2 625 299 T3

						SpA
146	<i>Bifidobacterium longum</i>	B1975	DSMZ	DSM 24709	07.04.2011	Probiotical SpA
147	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DLV1	DSMZ	DSM 25138	02.09.2011	Probiotical SpA
148	<i>Lactobacillus Reuteri</i>	LRE05	DSMZ	DSM 25139	02.09.2011	Probiotical SpA
149	<i>Lactobacillus Reuteri</i>	LRE06	DSMZ	DSM 25140	02.09.2011	Probiotical SpA
150	<i>Lactobacillus Reuteri</i>	RC 14	DSMZ	DSM 25141	02.09.2011	Probiotical SpA
151	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST 10	DSMZ	DSM 25246	19.09.2011	Probiotical SpA
152	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST 11	DSMZ	DSM 25247	19.09.2011	Probiotical SpA
153	<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST 12	DSMZ	DSM 25282	20.10.2011	Probiotical SpA
154	<i>Lactobacillus salivarius</i>	DLV8	DSMZ	DSM 25545	12.01.2012	Probiotical SpA

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una mezcla de cultivos de bacterias pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum*, donde dicho procedimiento comprende una etapa en la cual al menos dos cepas bacterianas pertenecientes a la especie *Bifidobacterium longum* seleccionadas del grupo que consiste en:

- 5
- 1) *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
 - 2) *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670
 - 3) *Bifidobacterium longum* DLBL 10 = DSM 25672

se hacen crecer juntas simultáneamente en un mismo sustrato de cultivo.

10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde dicha mezcla bacteriana comprende tres cepas bacterianas; preferiblemente dichas tres cepas bacterianas son:

- *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
- *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670
- *Bifidobacterium longum* DLBL 11 = DSM 25673.

15

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde dicha mezcla bacteriana comprende cuatro cepas bacterianas; preferiblemente dichas cuatro cepas bacterianas son:

- *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
- *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670
- 20 - *Bifidobacterium longum* DLBL 09 = DSM 25671
- *Bifidobacterium longum* DLBL 11 = DSM 25673.

4. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde dicha mezcla bacteriana comprende cinco cepas bacterianas; preferiblemente dichas cinco cepas bacterianas son:

- 25
- *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
 - *Bifidobacterium longum* DLBL 08 = DSM 25670
 - *Bifidobacterium longum* DLBL 09 = DSM 25671
 - *Bifidobacterium longum* DLBL 10 = DSM 25672
 - *Bifidobacterium longum* DLBL 11 = DSM 25673.