

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 210**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61P 13/04 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61K 31/733 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
C12R 1/225 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2012 PCT/IB2012/000895**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050831**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2012 E 12731647 (9)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2707477**

54 Título: **Cepas bacterianas capaces de metabolizar oxalatos**

30 Prioridad:

09.05.2011 IT MI20110791

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.11.2018

73 Titular/es:

**PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)
 Via E. Mattei 3
 28100 Novara, IT**

72 Inventor/es:

**MOGNA, GIOVANNI;
 STROZZI, GIAN PAOLO y
 MOGNA, LUCA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 690 210 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 bacterianas capaces de metabolizar oxalatos

- 5 La presente invención se refiere a una selección de cepas bacterianas lácticas y bifidobacterias de origen intestinal humano capaces de metabolizar ácido oxálico y/o las sales del mismo (oxalatos). Además, la presente invención se refiere a una composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica que contiene dichas cepas bacterianas.
- 10 El oxalato (sal de ácido oxálico) es un compuesto ubicuo en el reino vegetal, ampliamente presente en todas las dietas humanas. La ingestión diaria oscila entre 70 y 920 mg (promedio 495 mg ~ 5,6 mM), pero estos valores se superan fácilmente en las dietas de vegetarianos.
- 15 El ácido oxálico (ácido dicarboxílico) es uno de los compuestos orgánicos más altamente oxidados y, por tanto, actúa como un agente quelante potente para cationes, en particular el ion Ca^{2+} .
- 20 Debido a esta propiedad, las sales de ácido oxálico (oxalatos) tienen muy poco uso en procesos catabólicos y producción de energía. Además, el ácido oxálico es tóxico para la mayoría de los seres vivos y particularmente para los mamíferos.
- 25 Por este motivo, la acumulación de ácido oxálico y oxalatos en el hombre puede desencadenar y exacerbar una serie de estados patológicos, entre los que se mencionarán hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, miocardiopatías y otros trastornos cardíacos. En particular, el ácido oxálico se combina con calcio para formar el oxalato de calcio correspondiente, una sal insoluble que es responsable de más del 70 % de los cálculos renales diagnosticados. Además, el ácido oxálico es un agente inflamatorio potente que afecta a la mucosa intestinal. Por tanto, una presencia en exceso de este ácido en la luz puede poner en peligro la función de barrera natural del epitelio alterando su permeabilidad y provocando, por consiguiente, una absorción aumentada de oxalato.
- 30 En particular, el colon es el principal sitio de absorción de oxalato, con una ingestión del 3-5 % en condiciones fisiológicas normales. Reducir el oxalato en la luz intestinal podría, por tanto, contribuir a reducir la absorción. Esto conduciría entonces a una disminución en la concentración de oxalatos en plasma y en orina, reduciendo por tanto la peligrosidad de los mismos.
- 35 Además, niveles altos de oxalatos en la sangre pueden conducir a diverticulosis o diverticulitis. La diverticulosis, también conocida como "enfermedad diverticular", es un estado médico caracterizado por divertículos en el colon; hay eversiones de la mucosa y submucosa del colon a través de áreas de relativa debilidad de la capa muscular en la pared del colon. Los divertículos son claramente más comunes en el colon sigmoide, que es una porción del intestino caracterizada por mayor presión, un factor que facilita la formación de divertículos. La diverticulitis es una patología del tubo digestivo, caracterizada por la inflamación de uno o más divertículos. La mayoría de casos de diverticulitis se localizan en el colon (en particular, en el colon descendente y sigmoide).
- 40 El documento WO 2010/099824 A1 divulga cepas bacterianas de *L. acidophilus* que tiene el número de depósito DSM 21717, *L. gasseri* que tiene el número de depósito DSM 18299 y *L. gasseri* que tiene el número de depósito DSM 18300 como cepas bacterianas probióticas que tienen actividad antiinflamatoria.
- 45 El documento WO 2008/038075 A2 divulga cultivos de cepas de *L. gasseri* que tienen los números de depósito DSM 18299 y DSM 18300 como cultivos líquidos microbianos que tienen alta estabilidad y actividad fermentativa.
- 50 El documento CA 2739345 divulga composiciones que comprenden cepas de *Lactobacillus*, incluyendo cepas de *L. gasseri*, que tienen una tasa de degradación de ácido oxálico de no más del 67 % en condiciones de cultivo definidas durante 72 h, y composiciones que comprenden dichas cepas para su uso en forma de alimento o para su uso en el tratamiento o la prevención de cálculos renales y/o hiperoxaluria.
- 55 El documento US 2006/0121571 A1 se refiere a secuencias de ácido nucleico aisladas de especies de *Lactobacillus*, incluyendo *L. gasseri* y *L. acidophilus*, que codifican para polipéptidos potencialmente útiles para modular la actividad de degradación de oxalato de una célula u organismo. El documento US 2006/0121571 A1 divulga que la degradación de oxalato en un sujeto puede aumentarse administrando un microorganismo que tiene al menos uno de los dichos polinucleótidos. El documento también divulga métodos para identificar variantes bacterianas naturales que tienen actividad de degradación de oxalato potenciada. Los usos divulgados en el documento US 2006/0121571 A1 incluyen la prevención o el tratamiento de hiperoxaluria, insuficiencia renal, cálculos renales y trastornos de conducción cardíaca.
- 60 Por tanto, es importante poder reducir la cantidad de oxalatos en la luz intestinal, plasma y orina de modo que se eviten las complicaciones relacionadas con altos valores de oxalatos, tales como, por ejemplo, hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, miocardiopatías y otros trastornos cardíacos, cálculos renales, diverticulosis y diverticulitis.
- 65

En particular, es deseable poder reducir los niveles de oxalato en la orina de dos tipos de sujetos:

- Sujetos hiperoxalúricos que no tienden hacia una dieta con un alto contenido en oxalato.
- Sujetos normooxalúricos que tienden hacia una dieta con un alto contenido en oxalato.

El solicitante ha proporcionado una respuesta a las necesidades mencionadas anteriormente tras una intensa actividad de investigación, al final de la cual identificó, a partir de un conjunto muy amplio de cepas, una selección de cepas bacterianas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*; dichas cepas presentan una marcada capacidad para degradar cuantitativamente oxalatos. Las cepas seleccionadas muestran la capacidad para usar oxalato como fuente de energía, retirándolo del medio en el que dicho oxalato se encontraba originalmente. Por tanto, las cepas seleccionadas son capaces de degradar oxalatos.

El objeto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana que pertenece a los géneros *Lactobacillus* y que tiene la capacidad para degradar oxalatos, tal como se divulga en las reivindicaciones independientes adjuntas.

El objeto de la presente invención también se refiere a una composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica que contiene dichas cepas bacterianas, tal como se divulga en las reivindicaciones independientes adjuntas.

Se ilustrarán realizaciones preferidas de la presente invención en la descripción detallada que sigue a continuación.

La figura 1 muestra una comparación entre el cromatograma para un medio de cultivo que contiene 5 mM de oxalato antes (A) y después de (B) purificación de SPE.

La figura 2 muestra un cromatograma para un medio de cultivo que contiene 5 mM de oxalato (referencia positiva).

La figura 3 muestra un cromatograma para la cepa bacteriana *B. breve* BR03 DSM 16604.

La figura 4 muestra un cromatograma para la cepa bacteriana *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC09 DSM 24243.

La figura 5 muestra curvas de acidificación (valor de pH) obtenidas en función del tiempo (T = 0, 3, 6, 8 y 10 horas) cuando la cepa *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243 se hizo crecer en un medio de cultivo sin azúcar MRS (fuente de carbono), al que se le añadieron respectivamente otras fuentes de carbono (fibras).

El solicitante ha desarrollado un método capaz de identificar y cuantificar la capacidad de degradación de oxalato de cultivos de cepas que pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

El solicitante ha encontrado que las siguientes cepas bacterianas han demostrado capacidad para usar oxalatos como fuente de energía:

(i) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 23/11/2010, con el número de depósito DSM 24243.

(ii) *L. gasseri* LGS 01, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 24/05/2006, con el número de depósito DSM 18299.

(iii) *L. gasseri* LGS 02, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 24/05/2006, con el número de depósito DSM 18300.

(iv) *L. acidophilus* LA 07, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 23/11/2010, con el número de depósito DSM 24303.

(v) *L. acidophilus* LA 02, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 06/08/2008, con el número de depósito DSM 21717.

(vi) *L. plantarum* LP 01, depositada por la empresa Mofin Srl de Novara (Italia) ante la Institución Depositaria BCCMLMG (Bélgica) el 16/10/2001, con el número de depósito LMG-P-21021.

(vii) *L. reuteri* LRE 03, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 05/08/2010, con el número de depósito DSM 23879.

(viii) *L. reuteri* LRE 02, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 05/08/2010, con el número de depósito DSM 23878.

- (ix) *B. breve* BR 03, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 16/07/2004, con el número de depósito DSM 16604.
- 5 (x) *B. longum* BL 03, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 20/07/2004, con el número de depósito DSM 16603.
- (xi) *L. rhamnosus* GG, ATCC 53103, disponible en la colección pública ATCC.
- 10 (xii) *L. reuteri* LRE 04, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 05/08/2010, con el número de depósito DSM 23880.
- (xiii) *L. rhamnosus* LR 06, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 14/11/2008, con el número de depósito DSM 21981.
- 15 (xiv) *B. lactis* BA 05, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 15/06/2006, con el número de depósito DSM 18352.
- (xv) *L. casei* spp. *rhamnosus* LR 04, depositada por la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia) el 20/07/2004, con el número de depósito DSM 16605.
- 20 En una realización preferida, la composición comprende o, alternativamente, consiste en al menos una cepa seleccionada de entre las indicadas anteriormente por (i) a (iii).
- 25 En el contexto de la presente invención, "cepa bacteriana" significa las células vivas y/o muertas y/o partes, componentes/ derivados y/o enzimas de las mismas.
- Las cepas bacterianas seleccionadas pertenecen al género *Lactobacillus* y tienen una capacidad para degradar y usar oxalato como fuente de energía en una cantidad mayor del 50 %.
- 30 Ventajosamente, dicha capacidad es mayor del 60 %.
- Ventajosamente, dicha capacidad es mayor del 70 %.
- 35 Las cepas bacterianas seleccionadas pertenecen a la especie *Lactobacillus paracasei*. Una cepa preferida es *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243.
- Las cepas bacterianas seleccionadas pertenecen a la especie *Lactobacillus gasseri*. Varias cepas preferidas se seleccionan del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en *L. gasseri* LGS 01 DSM 18299 y *L. gasseri* LGS 02 DSM 18300.
- 40 Las cepas bacterianas seleccionadas pertenecen a la especie *Lactobacillus acidophilus*. Varias cepas preferidas se seleccionan del grupo que comprende o, alternativamente, que consiste en *L. acidophilus* LA02 DSM 21717 y *L. acidophilus* LA 07 DSM 24303.
- 45 Una composición según la presente invención comprende al menos una cepa bacteriana, para su uso en el tratamiento de hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, cardiopatías, cálculos renales, diverticulosis y diverticulitis.
- 50 La composición puede ser una composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica.
- La composición para su uso en el tratamiento de hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, cardiopatías, cálculos renales, diverticulosis y diverticulitis comprende o, alternativamente, consiste en al menos dos cepas seleccionadas de entre las indicadas anteriormente por (i) a (v).
- 55 La composición para su uso en el tratamiento de hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, cardiopatías, cálculos renales, diverticulosis y diverticulitis comprende o, alternativamente, consiste en al menos dos cepas seleccionadas de entre las indicadas anteriormente por (i) a (v).
- 60 La composición para su uso en el tratamiento de hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, cardiopatías, cálculos renales, diverticulosis y diverticulitis comprende o, alternativamente, consiste en:
- (a) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 -DSM 24243; o
- 65 (b) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 -DSM 24243 y *L. gasseri* LGS 01 -DSM 18299; o

(c) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 -DSM 24243 y *L. gasseri* LGS 02 -DSM 18300; o

(d) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 -DSM 24243, *L. gasseri* LGS 01 -DSM 18299 y *L. gasseri* LGS 02 -DSM 18300; o

(e) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 -DSM 24243, *L. gasseri* LGS 01 -DSM 18299, *L. gasseri* LGS 02 -DSM 18300 y *L. acidophilus* LA 07 -DSM 24303; o

(f) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 -DSM 24243, *L. gasseri* LGS 01 -DSM 18299, *L. gasseri* LGS 02 -DSM 18300 y *L. acidophilus* LA 02 -DSM 21717; o

(g) *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 -DSM 24243, *L. gasseri* LGS 01 -DSM 18299, *L. gasseri* LGS 02 -DSM 18300, *L. acidophilus* LA 07 -DSM 24303 y *L. acidophilus* LA 02 -DSM 21717.

15 Todas las composiciones descritas anteriormente, y particularmente las composiciones (a) a (g) enumeradas anteriormente, pueden comprender además fructooligosacáridos (FOS) y/o inulina. Se incluyen fructooligosacáridos (FOS) y/o inulina en una cantidad comprendida entre el 1 al 30 % en peso, en relación con el peso de la composición, preferiblemente entre el 3 y el 15 %, incluso más preferiblemente entre el 5 y el 10 % en peso.

20 El objeto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana que pertenece a las especies *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus gasseri* y que es capaz de degradar ácido oxálico y/o las sales del mismo en una cantidad mayor del 60 %. Dicha cepa es capaz de degradar ácido oxálico y/o las sales del mismo en una cantidad mayor del 70 %.

25 Dicha cepa que pertenece a la especie *Lactobacillus paracasei* es *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243. Dicha cepa que pertenece a la especie *Lactobacillus gasseri* se selecciona del grupo que comprende la cepa *L. gasseri* LGS 01 DSM 18299 y la cepa *L. gasseri* LGS 02 DSM 18300. Dicha cepa que pertenece a la especie *Lactobacillus gasseri* se selecciona del grupo que consiste en la cepa *L. gasseri* LGS 01 DSM 18299 y la cepa *L. gasseri* LGS 02 DSM 18300.

30 El objeto de la presente invención se refiere a una composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica que comprende una composición bacteriana; dicha composición bacteriana comprende al menos una cepa bacteriana tal como se describió anteriormente, para su uso en el tratamiento preventivo y curativo de hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, cardiopatías, cálculos renales, diverticulosis y diverticulitis. Dicha composición bacteriana comprende la cepa *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243. Dicha composición bacteriana comprende la cepa *L. gasseri* LGS 01 DSM 18299 y la cepa *L. gasseri* LGS 02 DSM 18300. Dicha composición bacteriana comprende además la cepa *L. acidophilus* LA02 DSM 21717 y la cepa *L. acidophilus* LA 07 DSM 24303. Dicha composición bacteriana consiste en *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243, *L. acidophilus* LA02 DSM 21717 y/o *L. acidophilus* LA 07 DSM 24303. Dicha composición comprende además fructooligosacáridos y/o inulina.

Parte experimental

1. Cepas bacterianas analizadas

45 Se estudiaron aproximadamente 70 cepas que pertenecían a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*; procedían de la colección de cepas internas de la empresa Probiotal SpA de Novara y de colecciones internacionales tales como, por ejemplo, la DSMZ, Alemania, o se encontraron en la bibliografía. Las cepas seleccionadas se muestran en la tabla 1, que muestra el porcentaje de degradación de oxalato mediante las cepas bacterianas sometidas a prueba. Se llevó a cabo el experimento usando un medio de cultivo que contenía oxalato de amonio 5 mM.

Tabla 1

N.º de depósito	Especie/cepa	% de degradación
DSM 24243	<i>L. paracasei</i> LPC 09	73,50
DSM 18299	<i>L. gasseri</i> LGS 01	73,40
DSM 18300	<i>L. gasseri</i> LGS 02	71,20
DSM 24303	<i>L. acidophilus</i> LA 07	59,25
DSM 21717	<i>L. acidophilus</i> LA 02	56,35
LMG P-21021	<i>L. plantarum</i> LP 01	40,31
DSM 23879	<i>L. reuteri</i> LRE 03	33,86
DSM 23878	<i>L. reuteri</i> LRE 02	31,42
DSM 16604	<i>B. breve</i> BR 03	28,16
DSM 16603	<i>B. longum</i> BL 03	25,29

ATCC 53103	<i>L. rhamnosus</i> GG	23,59
DSM 23880	<i>L. reuteri</i> LRE 04	16,79
DSM 21981	<i>L. rhamnosus</i> LR 06	15,70
DSM 18352	<i>B. lactis</i> BA 05	15,45
DSM 16605	<i>L. rhamnosus</i> LR 04	12,89

Las cepas bacterianas (i) a (v), (vii) a (x) y (xii) a (xv) enumeradas en la tabla 1 las depositó la empresa Probiotal SpA de Novara (Italia). La empresa Mofin Srl de Novara (Italia) depositó la cepa (vi). La cepa (xi) está disponible de la colección ATCC. Todas las cepas están disponibles y son accesibles al público en las condiciones establecidas por el Tratado de Budapest.

2. Condiciones de cultivo adoptadas

La preparación de las cepas que van a presentarse a análisis consistió en una serie de tres subcultivos secuenciales en caldo MRS (+1 % de cys-HCl, anaerobiosis, para los bífidos) incubados a 37 °C hasta que se alcanzó un crecimiento adecuado. Esta estrategia de cultivo permite la activación completa de la cepa. Las cepas se inocularon posteriormente al mismo porcentaje de inóculo (2 %) en un medio experimental, concebido específicamente para garantizar el crecimiento máximo de lactobacilos y bifidobacterias, complementado con oxalato de amonio 5 mM (cantidad igual a la ingestión diaria promedio de ácido oxálico).

Los cultivos así preparados se incubaron durante 24 horas a 37 °C.

3. Purificación de SPE (extracción en fase sólida) de las muestras

Al final del periodo de incubación, se centrifugaron los cultivos del caldo y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,22 μ m. La inyección de HPLC de las muestras sacó a la luz un perfil cromatográfico incierto. En particular, el pico cromatográfico de ácido oxálico parecía superponerse con el pico de glucosa presente en las muestras. Con el fin de remediar el problema mencionado anteriormente, se purificaron las muestras usando columnas de SPE (extracción en fase sólida) específicas para ácidos orgánicos.

El protocolo para la purificación mediante columnas de SPE requería una etapa de optimización con el fin de obtener el mejor rendimiento final.

En particular, se usaron diferentes reactivos en relación con la etapa de acondicionamiento de columna y elución final del analito. Esta purificación en fase sólida hizo posible obtener un pico cromatográfico claramente más limpio de ácido oxálico, tal como puede observarse en la figura 1A-B. El protocolo usado fue el siguiente

Tipo de columna de SPE: Phenomenex Strata-XA

Acondicionamiento: 1 ml de metanol

Acondicionamiento: 2 ml de formiato de sodio 20 mM

Carga de muestra: 1 ml de muestra

Lavado de impurezas: 1 ml de acetato de amonio 25 mM + 1 ml de metanol

Elución: 2 \times 500 μ l de HCl 1 M + 2 \times 500 μ l de HCl 3 M

4. Análisis de HPLC

La cantidad de oxalato degradada por cada cepa individual se analizó mediante HPLC, calculando la diferencia entre la concentración de oxalato presente en el medio de cultivo (5 mM) a T0 (antes de la fermentación) y la concentración residual tras el crecimiento del microorganismo. Los resultados de las cepas individuales se expresan como porcentajes, considerando que la concentración de oxalato a T0 es de 100.

Por ejemplo, el resultado de la cepa *L. paracasei spp. paracasei* LPC 09 DSM 24243, igual a aproximadamente el 70 %, indica que la última puede usar una cantidad de oxalato igual a aproximadamente 3,5 mM de oxalato (el 70 % de 5 mM). El protocolo de HPLC usado fue el siguiente:

Tipo de columna: Phenomenex Hydro-RP 250 \times 4,6 mm

Tipo de detector: UV-Vis con lectura a 220 nm

Velocidad de flujo de elución: 0,7 ml/min

Volumen de inyección: 20 μ l

Temperatura de la columna: 30 °C

5

Tipo de elución: isocrática

Fase móvil: fosfato de potasio 20 mM pH 2,0

10 Las cepas bacterianas que pertenecen al género *Lactobacillus* que mostraron una alta actividad de degradación hacia el ácido oxálico son las indicadas anteriormente por (i) a (v).

A. Determinación de las curvas de acidificación para la cepa *L. paracasei spp. paracasei* LPC 09 DSM 24243.

15 Se reactivó la cepa LPC09 antes del experimento mediante subcultivo en MRS y se incubó en aerobiosis a 37 °C.

Se repitieron las etapas de reactivación tres veces antes del experimento con incubación durante la noche. Al final de la tercera etapa de reactivación, se sedimentaron las células, se lavaron con agua estéril y se resuspendieron antes de inocularse en los medios de cultivo complementados con fibra. Los medios usados se basaron en MRS sin azúcar (fuentes de carbono), se complementaron respectivamente con:

20

- Glucosa (disolución esterilizada mediante tratamiento térmico, 121 °C 15'), medio de control.

- Fructooligosacáridos - FOS (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 μ l).

25

- GOS-Gl, - Galactooligosacáridos con glucosa residual (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 μ l)

- GOS-Gal, - Galactooligosacáridos con galactosa residual (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 μ l).

30

- XOS, - xilooligosacáridos (disolución esterilizada mediante filtración, filtro de 0,20 μ l).

- Larex, - fibra de alerce (disolución esterilizada mediante tratamiento térmico, 121 °C 15').

35

- Inulina (disolución esterilizada mediante tratamiento térmico, 121 °C 15'). La concentración final de fuentes de carbono para todos los medios fue de 20 g/l.

Entonces, se inocularon los medios así preparados con la cepa LPC09, a un porcentaje del 4 %, y se incubaron a 37 °C en aerobiosis.

40

En el momento 0 y a las 3, 6, 8 y 10 horas, se realizaron mediciones del pH con el fin de construir las curvas de acidificación mostradas en el gráfico de la figura 5.

La tabla 2 muestra las curvas de acidificación (valor de pH) obtenidas en función del tiempo (T = 0, 3, 6, 8 y 10 horas) cuando la cepa *L. paracasei spp. paracasei* LPC 09 DSM 24243 se hizo crecer en un medio de cultivo tal como se describió anteriormente.

45

Tabla 2

		0	3	6	8	10
LPC09	Glu	6,46	5,84	4,65	4,24	4,03
	Fos	6,48	6,02	5,57	4,62	4,13
	Xos	6,47	5,98	5,83	5,76	5,73
	Gos-gal	6,48	6,03	6,02	6,09	6,14
	Gos-glu	6,49	5,9	5,5	5,14	5,09
	Inu	6,5	5,98	4,96	4,3	4,03
	Lar	6,43	5,93	5,95	5,99	6,03

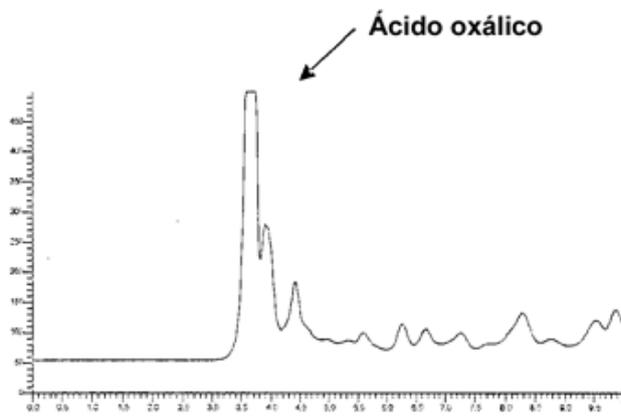
50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica que comprende una composición bacteriana, comprendiendo dicha composición bacteriana al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en la cepa *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243, la cepa *L. gasseri* LGS 01 DSM 18299 y la cepa *L. gasseri* LGS 02 DSM 18300, para su uso en el tratamiento preventivo y/o curativo de hiperoxaluria, urolitiasis, insuficiencia renal, cardiopatías, cálculos renales, diverticulosis y diverticulitis.
- 10 2. Composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha composición bacteriana comprende la cepa *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243.
- 15 3. Composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha composición bacteriana comprende la cepa *L. gasseri* LGS 01 DSM 18299 y la cepa *L. gasseri* LGS 02 DSM 18300.
- 20 4. Composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que dicha composición bacteriana comprende además la cepa *L. acidophilus* LA02 DSM 21717 y la cepa *L. acidophilus* LA 07 DSM 24303.
- 25 5. Composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 4, en el que dicha composición bacteriana consiste en *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243, *L. acidophilus* LA02 DSM 21717 y *L. acidophilus* LA 07 DSM 24303.
- 30 6. Composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que dicha composición comprende además fructooligosacáridos e inulina.
- 35 7. Composición alimenticia o producto de complemento o dispositivo médico o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en el que dicha composición bacteriana consiste en la cepa *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243.
- 40 8. Composición alimenticia o producto de complemento o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en el que la composición alimenticia o producto de complemento o composición farmacéutica consiste en la cepa *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243.
9. Cepa *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 con el número de depósito DSM 24243.

Figura 1 A-B

A)



B)

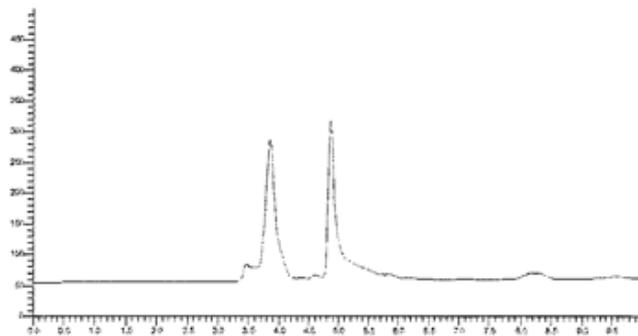


Fig. 1: Comparación entre el cromatograma para el medio de cultivo que contiene 5 mM de oxalato antes (A) y después de (B) purificación de SPE.

Figura 2

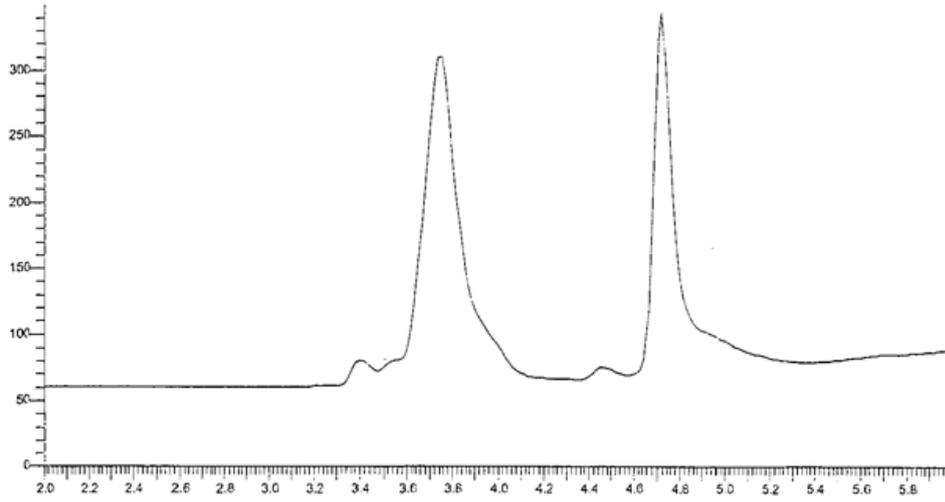


Fig. 2: Cromatograma para el medio de cultivo que contiene 5 mM de oxalato (referencia positiva).

Figura 3

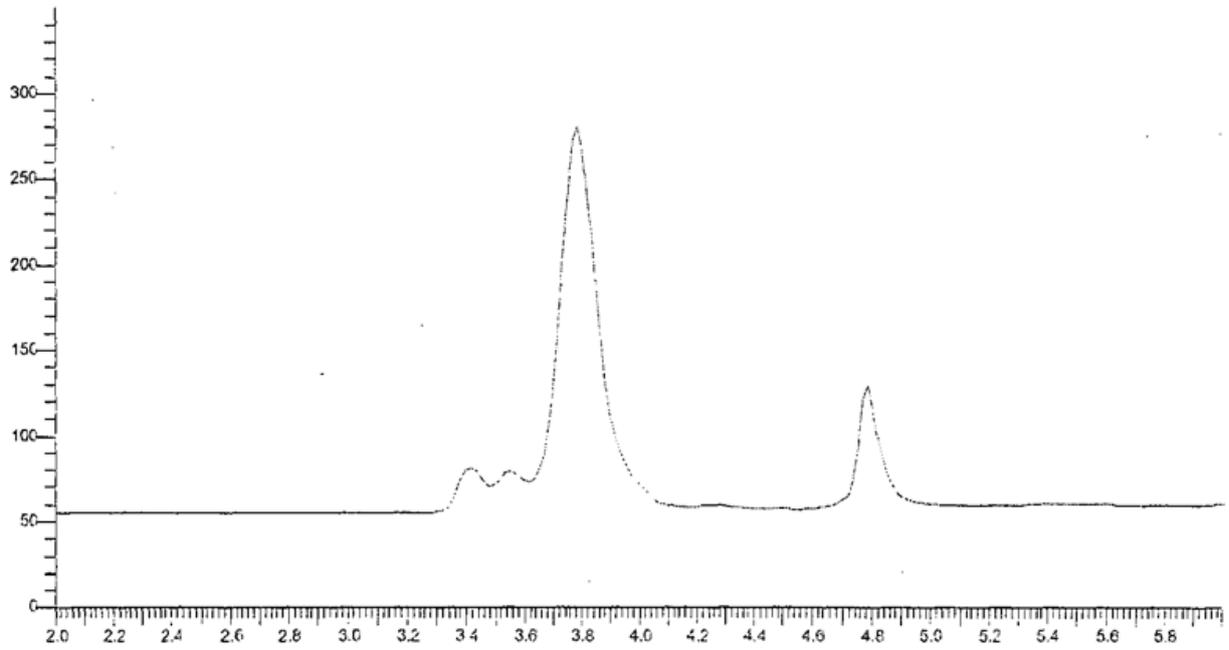


Fig. 3: Cromatograma para la cepa bacteriana *B. breve* BR03 DSM 6604.

Figura 4

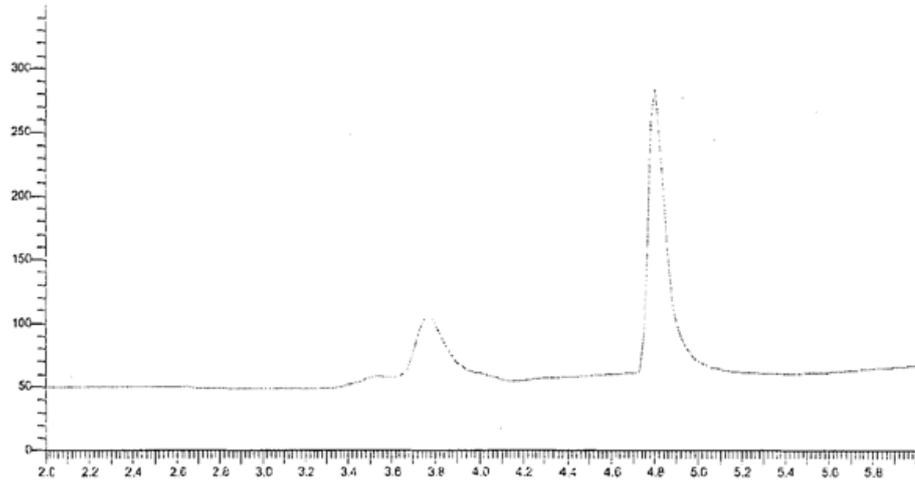


Fig. 4: Cromatograma para la cepa bacteriana *L. paracasei* spp. *paracasei* LPC 09 DSM 24243.

Figura 5

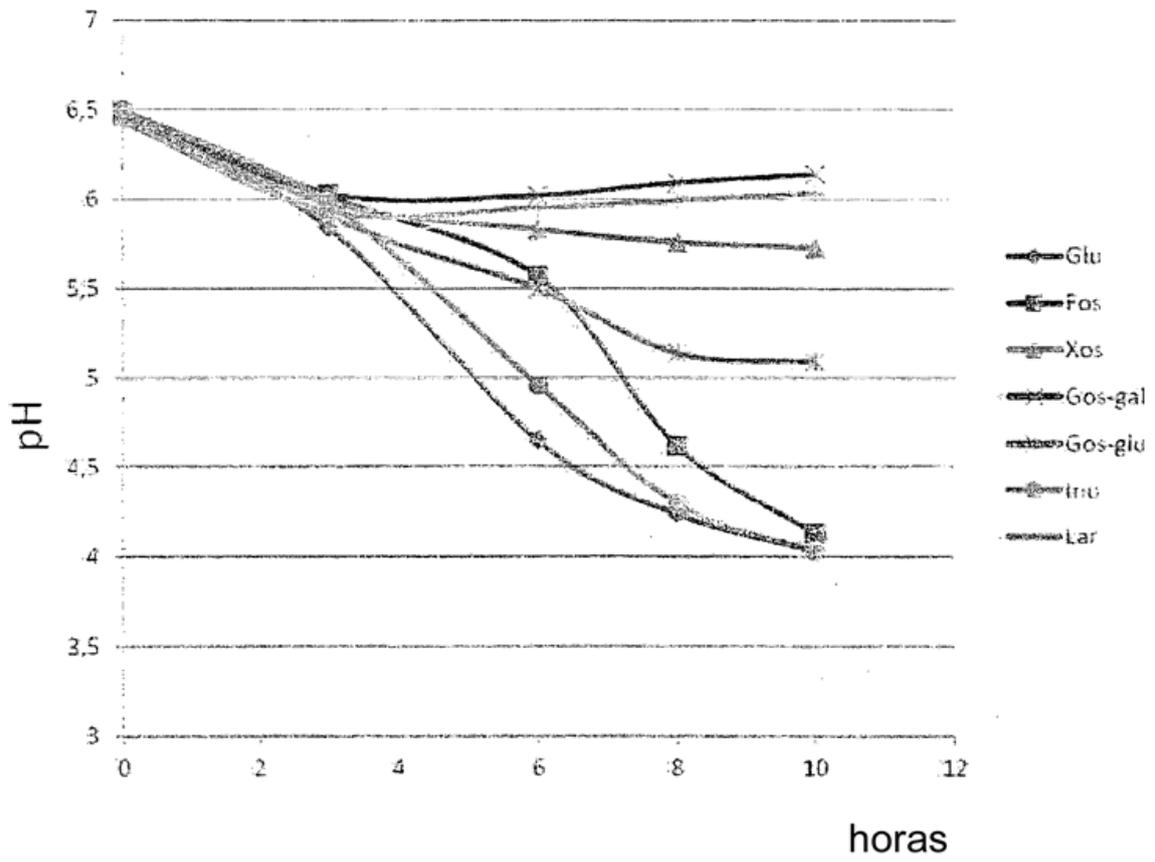


Fig. 5: Curvas de acidificación