

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902035457A1

Publication Date

20130926

Applicant

MOGNA GIOVANNI

Title

COMPOSIZIONE A BASE DI CEPPI DI BATTERI BIFIDOBACTERIUM
LONGUM IN GRADO DI AIUTARE IL PROLUNGAMENTO DELLA VITA

153937

Hoffmann · Eitle S.r.L.

Milano

DESCRIZIONE dell'invenzione avente per titolo:

"Composizione a base di ceppi di batteri Bifidobacterium longum in grado di aiutare il prolungamento della vita"

A nome: Giovanni Mogna
Di nazionalità: Italiana
Con domicilio in: Via Roma 13/b 28100 Novara
Inventori designati: Giovanni Mogna

La presente invenzione si riferisce a una composizione a base di batteri appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum* in grado di aiutare il prolungamento della vita e promuovere una buona funzionalità renale e/o intestinale, nonché garantire il benessere dell'organismo.

E' noto che la microflora intestinale (microbiota) gioca un ruolo essenziale per il benessere dell'organismo e per la salute umana. E' altresì noto che la microflora intestinale è caratterizzata dalla presenza di un delicato equilibrio tra una popolazione complessa di specie di batteri patogeni e un'altrettanto complessa popolazione di batteri che svolgono un'attività benefica ed essenziale per l'organismo. Ad oggi, molti sforzi

sono stati compiuti per conoscere e capire il complesso sistema microbiota al fine di determinare quali siano le popolazioni di patogeni che colonizzano l'apparato gastro-intestinale e le specie di batteri benefiche per l'organismo. Soprattutto, molti sforzi sono stati compiuti per capire e determinare quali siano i fattori che contribuiscono a modificare il complesso equilibrio all'interno della popolazione delle specie patogene, all'interno della popolazione dei batteri che apportano beneficio all'organismo e tra queste due popolazioni. Pertanto, rimane la necessità di poter individuare e selezionare, all'interno della popolazione delle specie di batteri benefiche per l'organismo, le specie batteriche prevalenti che sono presenti nel complesso sistema microbiota e, una volta isolate, si rende altresì necessario poter determinare i loro effetti sull'organismo al fine di poter preparare specifiche composizioni farmaceutiche o prodotti integratori o dispositivi medici o composizioni alimentari.

La Richiedente ha condotto una fase sperimentale nella quale ha individuato, selezionato, isolato e caratterizzato alcuni ceppi di batteri i quali, una volta testati, hanno evidenziato eccellenti e inaspettate proprietà salutistiche nell'aiutare il prolungamento della vita, nel promuovere una buona

funzionalità intestinale nonché garantire il benessere dell'organismo e uno stato di salute prolungato nel tempo.

Forma oggetto della presente invenzione un ceppo di batterio appartenente alla specie *Bifidobacterium longum*, come rivendicato nell'unità rivendicazione.

Forma oggetto della presente invenzione un processo per la preparazione di colture batteriche appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum*, in cui detto processo comprende una fase nella quale almeno due ceppi di batteri, appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum*; preferibilmente, scelti tra quelli selezionati e isolati nella presente invenzione, sono fatti con crescere assieme in maniera sinergica in uno stesso substrato colturale, come rivendicato nell'unità rivendicazione.

Forma un altro oggetto della presente invenzione una composizione farmaceutica o un dispositivo medico o un prodotto integratore o una composizione alimentare o una composizione cosmetica comprendente almeno due ceppi di batteri appartenenti alla stessa specie *Bifidobacterium longum*, ottenuti da un processo di concrescita di batteri, come rivendicato nell'unità rivendicazione.

Ulteriori realizzazioni preferite della presente invenzione saranno di seguito riportate e illustrate

nella descrizione dettagliata che segue senza voler limitare in alcun modo la portata della presente invenzione.

La Richiedente ha condotto un'intensa attività di ricerca durante la quale ha individuato, selezionato, isolato e caratterizzato i seguenti ceppi di batteri che formano oggetto della presente invenzione, come rivendicato nella rivendicazione 1.

I seguenti ceppi di batteri sono stati depositati in data 16.02.2012 dalla Società Probiotical SpA Via Mattei, 3 -28100 Novara (NO) Italia in accordo con il Trattato di Budapest presso il DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Germany:

- 1) *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
- 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
- 11) *Bifidobacterium longum* DLBL 17 = DSM 25679

Il seguente ceppo di batteri è stato depositato in data 24.02.2012 dalla Società Probiotical SpA Via Mattei, 3 - 28100 Novara (NO) Italia in accordo con il Trattato di Budapest presso il DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Germany:

12) *Bifidobacterium longum* DLBL 18 = DSM 25708

I seguenti ceppi di batteri sono stati depositati in data 01.03.2012 dalla Società Probiotical SpA Via Mattei, 3 -28100 Novara (NO) Italia in accordo con il Trattato di Budapest presso il DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Germany:

13) *Bifidobacterium longum* DLBL 19 = DSM 25717

14) *Bifidobacterium longum* DLBL 20 = DSM 25718

I sopra citati ceppi di batteri sono validamente impiegati per preparare una composizione farmaceutica o un dispositivo medico o un prodotto integratore o una composizione alimentare o una composizione cosmetica (in breve nel prosieguo "le composizioni della presente invenzione"), come di seguito descritto e rivendicato. Tutte queste composizioni della presente invenzione comprendono o, alternativamente, consistono di almeno due ceppi di batteri appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum*. Questi ceppi di batteri sono preparati con un processo di "concrecita" sinergica di singoli ceppi di batteri appartenenti alla stessa specie

B. longum. Preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati da (1) a (14), come di seguito descritto.

La Richiedente ha trovato utile eseguire una fermentazione mediante un processo di "concrecita" sinergica di singoli ceppi di batteri appartenenti alla stessa specie *B. longum* utilizzando un numero di ceppi uguale o maggiore di 2. Preferibilmente, il numero di ceppi utilizzati nel processo di concrecita è compreso da 2 a 14 ceppi; preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati sopra da (1) a (14). Il numero dei ceppi utilizzati nel processo di concrecita varia da 2 a 14 (ad esempio, 2 ceppi o 3 ceppi o 4 ceppi o 5 ceppi o 6 ceppi o 7 ceppi o 8 ceppi o 9 ceppi o 10 ceppi o 11 ceppi o 12 ceppi o 13 ceppi o 14 ceppi). I ceppi utilizzati, in un processo di "concrecita" sinergica di batteri della stessa specie *B. longum*, sono scelti tra quelli che appartengono alla specie *B. longum*. Preferibilmente, detti ceppi sono quelli indicati sopra da (1) a (14). E' stato osservato che i singoli ceppi di batteri appartenenti alla stessa specie *B. longum*, durante la "concrecita" batterica, sinergizzano vantaggiosamente tra loro. In pratica, una fermentazione realizzata mediante una "concrecita" di batteri della stessa specie *B. longum* (cioè realizzata

utilizzando più di 2 ceppi, ad esempio tra quelli indicati da (1) a (14)) produce un numero di cellule batteriche totale che è maggiore rispetto al numero di cellule batteriche totale ottenuto da una fermentazione realizzata utilizzando un singolo ceppo. Inoltre, si vengono a produrre, durante la concrescita batterica, metaboliti che caratterizzano il substrato di coltura sia da un punto di vista qualitativo e quantitativo sia da un punto di vista delle proprietà intrinseche del substrato di coltura stesso. Il processo di concrescita sinergica di batteri della stessa specie *B. longum* produce in realtà effetti migliorativi sia in fase produttiva (fermentazione) che in fase di utilizzo in umano (in particolare nell'intestino). Gli effetti migliorativi si riferiscono alla quantità e all'attività biologica delle cellule batteriche ottenute ma, si riferiscono, anche alla quantità e qualità dei metaboliti batterici.

Pertanto, tutte le composizioni della presente invenzione sono preparate utilizzando i ceppi di batteri prodotti mediante una fermentazione realizzata con un processo di "concrecita" di batteri della stessa specie *B. longum*; preferibilmente, detti ceppi sono quelli indicati da (1) a (14). Per questo motivo le

composizioni della presente invenzione si distinguono vantaggiosamente da quelle presenti nella tecnica nota. Tutti i ceppi di batteri preparati mediante la concrescita evidenziano eccellenti e inaspettate proprietà salutistiche nell'aiutare il prolungamento della vita, nel promuovere una buona funzionalità renale e/o intestinale, nonché garantire il benessere dell'organismo e uno stato di salute prolungato nel tempo.

Nel contesto della presente invenzione, i ceppi di batteri appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum* possono essere presenti in dette composizioni della presente invenzione sottoforma di cellule vive e/o cellule morte e/o come un loro metabolita e/o come un loro derivato cellulare e/o come un loro componente cellulare o enzimatico.

Le composizioni della presente invenzione possono essere somministrate a tutte le categorie di persone senza alcuna limitazione per aiutare il prolungamento della vita di un soggetto; per rallentare e/o contrastare e/o ridurre i processi biologici d'invecchiamento, ad esempio invecchiamento fisico e/o della cute; per ridurre i processi di invecchiamento che portano alla perdita di memoria o memoria visiva e/o capacità di concentrazione; per inibire la produzione di batteroidi

(*Bacteroides*) mediante un meccanismo di inibizione aspecifico (produzione di metaboliti) e/o specifico (produzione di batteriocine); per stimolare la produzione di *Clostridi* butirrici in grado di produrre butirrati che sono in grado di inibire i fenomeni che portano all'insorgere di coliti, coliche ulcerose, IBD (Inflammatory Bowel Disease) e malattia di Crohn; per inibire e/o ridurre la produzione di Enterobatteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, in particolare ridurre il numero degli enterobatteri normalmente presenti in un microbiota; per modificare l'equilibrio presente nella microflora intestinale al fine di far prevalere la specie *Bifidobacterium longum*; per influenzare in modo positivo l'attività antiossidante, l'attività immunomodulante con produzione di citochine; per ridurre il contenuto dei metaboliti tossici prodotti o derivati dalla degradazione proteica aiutando in questo modo la funzionalità renale o migliorando la stessa funzionalità renale.

Vantaggiosamente, tutte le composizioni della presente invenzione trovano valida applicazione nel mantenere una buona ed efficiente funzionalità renale e/o nel trattamento della funzionalità renale in soggetti che soffrono di patologie e/o disturbi renali. I disturbi connessi a un'alterazione della funzionalità renale o a

un'insufficienza renale (spesso presenti negli anziani) comportano un aumento dei metaboliti tossici dovuti alla degradazione proteica. Questi disturbi sono principalmente collegati alle cardiopatie e alle encefalopatie.

I ceppi di batteri appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum*, oggetto della presente invenzione, possono aiutare a contribuire al prolungamento della vita di un essere umano in quanto detti ceppi possono intervenire in modo significativo grazie al loro proteasoma (UPS= ubiquitina-proteasoma-system). L'azione del proteasoma consente di contrastare i fenomeni biologici che portano all'invecchiamento preservando lo stato fisico e/o mentale di un essere umano.

Vantaggiosamente, tutte le composizioni della presente invenzione comprendono o, alternativamente, consistono di un numero variabile di ceppi di batteri, appartenenti alla specie *B. longum*, compreso da 2 a 14 (ad esempio, 2 ceppi o 3 ceppi o 4 ceppi o 5 ceppi o 6 ceppi o 7 ceppi o 8 ceppi o 9 ceppi o 10 ceppi o 11 ceppi o 12 ceppi o 13 ceppi o 14 ceppi) i quali sono prodotti mediante un processo di "concrecita" di singoli ceppi di batteri appartenenti alla stessa specie *B. longum*;

preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati sopra da (1) a (14).

Vantaggiosamente, le composizioni della presente invenzione possono comprendere la N-acetilcisteina (NAC) come tale o una sostanza a base di N-acetilcisteina (NAC) o un suo derivato in associazione con almeno due ceppi di batteri prodotti mediante un processo di "concrecita" di singoli ceppi di batteri appartenenti alla stessa specie *B. longum*; preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati sopra da (1) a (14).

In questo caso si ha un ulteriore miglioramento della funzionalità renale dovuto anche alla diminuzione di metaboliti tossici da alterata degradazione proteica prodotti da decarbossilazione di amminoacidi (ammine biogene prodotte da *E.coli*). Pertanto, è previsto nella presente invenzione l'utilizzo di N-acetilcisteina sia in forma libera che microincapsulata gastroprotetta (da 10 a 1000 mg/die) che ha un effetto di barriera meccanica nel contrastare le capacità adesive di *E.coli* alla parete intestinale. Inoltre, l'N-acetilcisteina stimola la produzione di glutathione e, quindi, ha capacità antiossidante. Le composizioni della presente invenzione sono in grado di preservare l'attività del proteasoma. Per questo motivo possono essere validamente

somministrate alle persone per aiutarle nel prolungamento della vita.

Detti ceppi di batteri sono presenti in una quantità compresa da 0,1 a 65% in peso, preferibilmente da 0,5 al 15% in peso; ancora più preferibilmente da 1 a 10% in peso, rispetto al peso totale della composizione. Tuttavia, detta percentuale rispetto al peso totale della composizione, dipende dalla tipologia merceologica della composizione che s'intende preparare. Ad esempio, in una capsula la quantità di detti batteri è preferibilmente superiore al 40%.

Le composizioni della presente invenzione contengono una carica batterica avente una concentrazione compresa da 1×10^6 a 1×10^{11} UFC /g, preferibilmente da 1×10^8 a 1×10^{10} UFC /g.

Le composizioni possono contenere batteri in una concentrazione compresa da 1×10^6 a 1×10^{11} UFC/dose, preferibilmente da 1×10^8 a 1×10^{10} UFC/dose.

La dose può essere compresa da 0,2 a 10 g, ad esempio è di 0,25 g, 1 g, 3 g, 5 g o 7 g.

I batteri utilizzati nella presente invenzione possono essere in forma solida, in particolare sottoforma di polvere, polvere disidratata, sprayzzata o liofilizzata.

La composizione alimentare o il prodotto integratore o il dispositivo medico o la composizione farmaceutica

possono inoltre comprendere anche alcune fibre prebiotiche e carboidrati ad azione bifidogena quali ad esempio inulina, frutto-oligosaccaridi (FOS), galatto e trans-galatto-oligosaccaridi (GOS e TOS), gluco-oligosaccaridi (GOS α), xilo-oligosaccaridi, (XOS), chitosan-oligosaccaridi (COS), soia-oligosaccaridi (SOS), isomalto-oligosaccaridi (IMOS), amido resistente, pectine, psyllium, arabino-galattani, gluco-mannani, galatto-mannani, xilani, lattosaccarosio, lattulosio, lattitolo e vari altri tipi di gomme, preferibilmente la gomma di tara, fibra di acacia, di carruba, di avena, di bamboo, fibre di agrumi e, in generale, fibre contenenti una porzione solubile e una insolubile, in rapporto variabile tra di loro.

Vantaggiosamente, detta fibra è scelta dal gruppo comprendente FOS, inulina e fibre di agrumi, preferibilmente in un rapporto in peso da 1:3 a 3:1.

La quantità delle fibre prebiotiche e/o dei carboidrati ad azione bifidogena, se presenti, risulta compresa in peso dallo 0,5 al 75%, preferibilmente dall'1% al 40% ed ancora più preferibilmente dal 2 al 20% rispetto al peso totale della composizione. In questo caso si ha una composizione o integratore ad attività simbiotica.

Le composizioni della presente invenzione possono inoltre comprendere uno o più additivi o eccipienti

fisiologicamente accettabili nonché comprendere inoltre anche altri ingredienti e/o componenti attivi quali vitamine, minerali, peptidi bioattivi, sostanze ad attività antiossidante, ipocolesterolemizzante, ipoglicemizzante, antiinfiammatoria, edulcoranti in una quantità in peso generalmente compresa da 0,001% al 10% in peso, preferibilmente da 0,5 al 5% in peso, comunque dipendente dal tipo di componente attivo e dalla sua eventuale dose giornaliera consigliata, rispetto al peso totale della composizione.

Le composizioni della presente invenzione sono preparate mediante le tecniche note e alla portata del tecnico del settore il quale è in grado di utilizzare i macchinari e le apparecchiature note e i metodi di produzione idonei.

Le composizioni della presente invenzione possono contenere elementi o sostanze ad attività antiossidante in una quantità in peso compresa da 0,0001% a 30% rispetto al peso della composizione finale, in funzione della concentrazione delle sostanze ad attività antiossidante e/o della dose giornaliera raccomandata (RDA), ove definita.

Il selenio può essere presente in forma di sodio seleniato, L-seleniometionina, sodio selenito, selenito acido di sodio, acido selenioso, nonché in forma di microrganismi, ad esempio lieviti, arricchiti in

selenio, in una quantità in peso compresa da 0,0005% a 0,005% rispetto al peso della composizione finale, in ogni caso sufficiente ad apportare un quantitativo di selenio preferibilmente compreso da 10 µg a 150 µg. Vantaggiosamente, il selenio è presente sottoforma di selenio internalizzato in cellule di batteri probiotici. La composizione della presente invenzione può inoltre comprendere almeno un ceppo di batterio depositato dalla Società BIOMAN S.r.l., Via Alfieri 18, 10100 Torino, Italia, quali:

- *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositato in data 05/04/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16341, e/o
- *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositato in data 17/01/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16144, e/o
- *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositato in data 17/01/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16143.

Le composizioni della presente invenzione possono inoltre contenere almeno un'altro ceppo scelto tra quelli che seguono.

I seguenti ceppi di batteri sono stati depositati in data 16.02.2012 dalla Società Probiotical SpA Via Mattei, 3 -28100 Novara (NO) Italia in accordo con il

Trattato di Budapest presso il DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH, Germany:

- 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
- vi) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 09 = DSM 25685
- vii) *Bifidobacterium infantis* BI 03 = DSM 25709
- viii) *Lactobacillus plantarum* LP 09 = DSM 25710

Forma oggetto della presente invenzione un processo per la preparazione di colture batteriche appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum* in cui detto processo comprende una fase di concrescita sinergica di singoli ceppi di batteri appartenenti alla specie *B. longum* nel quale almeno due ceppi di batteri; preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati da (1) a (14), sono fatti concrescere e replicare assieme in uno stesso substrato colturale.

La composizione farmaceutica o cosmetica o il dispositivo medico o il prodotto integratore o la composizione alimentare (in breve le composizioni della presente invenzione) comprende almeno due ceppi di batteri. Detti ceppi sono ottenuti mediante una "concrescita" sinergica di batteri della stessa specie

B. longum; preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati da (1) a (14). Detti almeno due ceppi di batteri sono ottenuti da un processo di fermentazione che prevede una fase di concrescita batterica nella quale detti almeno due ceppi di batteri sono fatti concrescere e replicare assieme in uno stesso substrato colturale. Le composizioni sono per uso in un trattamento per aiutare il prolungamento della vita di un essere umano; o per uso in un trattamento per rallentare e/o contrastare e/o ridurre i processi biologici di invecchiamento fisico e della pelle o della cute; o per uso in un trattamento per rallentare e/o contrastare e/o ridurre i processi biologici di invecchiamento che portano alla perdita di memoria e/o capacità di concentrazione.

In una realizzazione, la composizione farmaceutica o cosmetica o il dispositivo medico o il prodotto integratore o la composizione alimentare (in breve le composizioni della presente invenzione) comprende almeno due ceppi di batteri appartenenti alla specie *B. longum*; preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati da (1) a (14), ottenuti mediante una "concrecita batterica", per uso in un trattamento di inibizione della produzione di batteroidi mediante un meccanismo di inibizione aspecifico che prevede la

produzione di metaboliti da parte di detto batterio e/o mediante un meccanismo specifico che prevede la produzione di batteriocine da parte di detto batterio; o per uso in un trattamento di stimolazione della produzione di *Clostridi* butirrici in grado di produrre butirrati per contrastare l'insorgere di una colite, una colica ulcerosa, un'inflammazione dell'intestino o del tratto gastro-intestinale o della malattia di Crohn.

In una realizzazione, la composizione farmaceutica o cosmetica o il dispositivo medico o il prodotto integratore o la composizione alimentare (in breve le composizioni della presente invenzione) comprende almeno due ceppi di batteri appartenenti alla specie *B. longum*; preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati da (1) a (14), ottenuti mediante una "concrescita", per uso in trattamento di inibizione e/o riduzione di Enterobatteri, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, presenti in microbiota.

In una realizzazione, la composizione farmaceutica o cosmetica o il dispositivo medico o il prodotto integratore o la composizione alimentare (in breve le composizioni della presente invenzione) comprende almeno due ceppi di batteri appartenenti alla specie *B. longum*; preferibilmente, detti ceppi sono scelti tra quelli indicati da (1) a (14), ottenuti mediante una

"concrescita", per uso in un trattamento antiossidante o immunomodulante con produzione di citochine.

Detta composizione, preferibilmente, può inoltre comprendere due o tre o quattro o cinque o sei ceppi di batteri in accordo con quelli indicati da (1) a (14) ottenuti mediante una "concrescita"; preferibilmente in associazione con la N-acetilcisteina o una sostanza a base di N-acetilcisteina o un suo derivato; preferibilmente in associazione con il selenio sottoforma di sodio seleniato, L-seleniometionina, sodio selenito, selenito acido di sodio, acido selenioso o selenio internalizzato in cellule di batteri scelti dal gruppo comprendente o, alternativamente consistente di:

- *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositato in data 05/04/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16341, e/o
- *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositato in data 17/01/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16144, e/o
- *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositato in data 17/01/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16143.

Detta composizione, preferibilmente, può inoltre comprendere almeno due ceppi di batteri da (1) a (14),

in associazione con almeno un altro ceppo di batterio scelto dal gruppo comprendente:

- 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
- vi) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 09 = DSM 25685
- vii) *Bifidobacterium infantis* BI 03 = DSM 25709
- viii) *Lactobacillus plantarum* LP 09 = DSM 25710

Le composizioni della presente invenzione possono inoltre contenere almeno un altro ceppo scelto tra quelli indicati nelle Tabelle A.

Parte sperimentale

E' stato preso in esame il microbiota intestinale di 14 persone aventi un'età compresa da 100 a 104 anni (gruppo dei soggetti centerari) e il microbiota intestinale di 10 persone aventi un'età compresa 27 a 54 anni (gruppo dei soggetti adulti). Sono stati analizzati i batteri appartenenti ai seguenti gruppi: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridia*, *Bacteroides*, yeasts. La Tabella 1, in maniera statisticamente significativa, riporta: Anaerobi totali, Enterobacteriaceae, Bifidobacteria, Bacteroides e Clostridia. Un mese prima dell'inizio dello studio clinico

(raccolta dei campioni), nessuno dei soggetti ha assunto antibiotici, anti-stipsi o anti-diarroici, farmaci inibitori della pompa protonica o prodotti contenenti batteri probiotici. I soggetti affetti da malattie croniche intestinali o malattie metaboliche (diabete, obesità, malattie connesse a un male assorbimento) sono stati esclusi dallo studio clinico. I campioni fecali freschi sono stati raccolti in tubi sterili e conservati a -80°C per un periodo massimo di un mese prima della loro analisi. Ogni soggetto ha fornito due campioni in due settimane successive. Il valore principale dei due campioni è stato valutato. I campioni sono stati omogeneizzati in una soluzione sterile di un sale peptone (caseina digerita con enzimi 1 g/l, cloruro di sodio 8,5 g/l). Una diluizione seriale (10 volte) è stata eseguita e 100 μl di tre appropriate diluizioni sono state piastrate nei seguenti mezzi: Tryptic Soy Agar (TSA) + 5% sangue per gli aerobi totali; Schaedler agar (SCH) + 5% sangue per gli anaerobi totali; De Man Rogosa and Sharpe agar (MRS) per Lattobacilli; Bifidobacterium Selective Medium (BSM) per Bifidobatteri; MacConkey agar (MC) per Enterobacteriaceae; Slanetz agar (SZ) per enterococchi; Schaedler + Kanamicina/Vancomicina (KV) per Batteroidi; Clostrisel agar (CLOS) per Clostridia; Sabouraud agar (SAB) + Cloramphenicol 500 mg/l per lieviti. Le piastre sono state

incubate come segue: TSA a 37°C per 24 ore in aria arricchita al 10% in CO₂; MC, SZ e SAB a 37°C in anaerobiosi per 24 ore, 24 e 48 ore rispettivamente; SCH, MRS, BSM, KV e CLOS a 37°C in anaerobiosi per 72 ore. Dopo l'incubazione le colonie visibili sono state inizialmente identificate in accordo alla loro morfologia, colorazione per Gram positivi, colorazione per Gram negativi, test per la catalasi e ossidasi. Successivamente, sono stati cresciuti in condizioni selezionate. Poi le colonie sono state contate e il numero dei microorganismi è stato espresso come unità formanti colonie per grammo di feci umide (UFC/g). Il livello di detezione era 10² UFC/g. I Bifidobatteri e i Lattobacilli, per i quali le colonie sono state precedentemente contate e differenziate in accordo con la loro morfologia, sono stati ulteriormente identificati a livello di specie attraverso il sequenziamento 16S rDNA usando la metodica denominata tecnicamente Pyrosequencing. Il DNA batterico è stato estratto da una coltura pura. Le sospensioni di circa 10¹⁰ UFC/ml sono state riscaldate a 100°C per 10 minuti e centrifugate a 18000 giri per 2 minuti. I sopranatanti sono stati conservati a -20°C fino all'analisi. Il 16S rDNA batterico è stato sequenziato e confrontato con il database online descritto da Jonasson et al.; (*Classification, identification and subtyping of bacteria based on*

pyrosequencing and signatura matching of 16S rDNA fragments
 - APMIS2002; 110:263-272). Le differenze tra le conte batteriche determinate nei 14 soggetti centenari e nei 10 soggetti adulti piú giovani sono state analizzate statisticamente (Wilcoxon-Mann-Whitney Test). I risultati sono riportati in Tabella 2.

Tabella 1: Conta batterica principale (valore principale $\pm$ SD log10 per grammo di feci umide) per i 14 soggetti centenari e per i 10 soggetti adulti piú giovani.

	Centenari	Adulti	
	(Etá 100-104 anni)	(Etá 24-57 anni)	
Totale Aerobi	7.7 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 1.2	n.s.
Totale Anaerobi	8.3 $\pm$ 0.6	9.1 $\pm$ 0.2	p < 0.05
Enterobacteriaceae	4.2 $\pm$ 1.7	6.6 $\pm$ 1.4	p < 0.05
Enterococchi	6.3 $\pm$ 1.8	6.9 $\pm$ 1.4	n.s.
Staphylococchi	3.6 $\pm$ 1.2	4.9 $\pm$ 1.2	n.s.
Lactobacilli	4.8 $\pm$ 2.3	5.4 $\pm$ 1.2	n.s.
Bifidobacteria	6.7 $\pm$ 1.4	8.3 $\pm$ 0.7	p < 0.05
Bacteroides	5.9 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 0.8	p < 0.05
Clostridia	4.1 $\pm$ 2.3	2.0 $\pm$ 0.0 *	p < 0.05

Yeasts	2.5 ± 0.9	2.0 ± 0.0 *	n.s.
--------	-----------	-------------	------

n.s. = non statisticamente significativo

* Le counte piú basse del limite di rilevabilitá (10^2 UFC/g)
sono state considerate come 90 UFC/g.

Tabella 2: Specie di batteri appartenenti al genere *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* isolati dai centenarie e dai soggetti adulti piú giovani.

Species	Numero dei soggetti e intervalli di conta	
	Centenari	Adulti
	(100-104 anni)	(24-57 anni)
<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</i>		
<i>pseudocatenulatum</i>	0	4 (10^7)
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	0	2 (10^7 - 10^8)

E' stata inoltre valutata la concrescita di alcuni ceppi della stessa specie di *Bifidobacterium longum* isolati da soggetti centenari, cresciuti singolarmente e concresciuti in associazione. Il presente studio si riferisce ai 5 differenti biotipi di *Bifidobacterium longum* riportati nella seguente Tabella 3.

Tabella 3

Sigla	ID ceppoteca	Numero deposito
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

I suddetti ceppi sono stati prelevati dal freezer a -80°C e scongelati alla temperatura di 37°C per 5 minuti. In seguito sono stati trapiantati sia singolarmente alla percentuale del 3%, sia in miscela in ragione dello 0,6% per ciascun ceppo (per ottenere un 3% di inoculo complessivo) nel brodo colturale per bifidobatteri TPY (secondo Scardovi) la cui composizione viene descritta di seguito:

Trypticase peptone	10 g
Soytone peptone	5 g
Glucosio	10 g

Estratto di lievito	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
Acqua distillata	1000	ml

Soluzione L(-) cisteina cloridrato al 5%*
sterilizzata con filtro 0.20 µm
(2,5g in 50 ml di acqua) 10 ml

Il terreno è stato precedentemente ricostituito e sterilizzato a 121°C per 15 minuti. Il pH dopo sterilizzazione era pari a 6.60 (25°C). Al momento dell'utilizzo è stata aggiunta asetticamente al terreno base la soluzione di L(-) cisteina cloridrato al 5%.

L'incubazione dei 5 ceppi e della loro miscela è avvenuta alla temperatura di 37°C in condizioni di anaerobiosi, mediante giare Gaspac contenenti sistemi per anaerobiosi AnaeroGen Oxoid (cod.AN0035A). Dopo 5 ore di incubazione le colture dei bifidobatteri sono state raffreddate e sottoposte alla valutazione di pH, densità ottica alla lunghezza d'onda di 560 nm e conteggio del numero di cellule vitali secondo metodica ISO 29981:2010 (E) IDF 220:2010(E) con il terreno TOS-propionate agar medium + mupirocina di seguito descritto:

Trypticase peptone	10	g
Estratto di lievito	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)-cisteina•HCl•H ₂ O	0,5	g
Sodio propionato	15,0	g
TOS*	10,0	g
Acqua distillata	965	ml

*TOS: miscela di galattosio e glucosio ottenuta per idrolisi enzimatica del lattosio utilizzando una β -galattosidasi da *Aspergillus oryzae*.

Il brodo di cui sopra è stato ricostituito e sterilizzato a 121°C per 15 minuti. Prima dell'utilizzo è stata aggiunta una soluzione di mupirocina filtrata per sterilizzazione in modo tale da ottenere una concentrazione finale dell'antibiotico nel terreno pari a 50 mg/litro.

Risultati

I risultati ottenuti sono riferiti ai ceppi cresciuti singolarmente e in miscela (dopo 5 ore di incubazione), vedi Tabella 4.

Tabella 4

Sigla	pH	OD	Cellule vitali
DLBL 07	5,54	0,239	27 milioni/ml
DLBL 08	5,67	0,316	38 milioni/ml
DLBL 09	5,66	0,178	21 milioni/ml
DLBL 10	5,53	0,288	29 milioni/ml
DLBL 11	5,82	0,385	47 milioni/ml
Miscela di (DLBL 07, DLBL 08, DLBL 09, DLBL 10, DLBL 11)	5,41	0,405	53 milioni/ml

Come si può notare, i valori della carica in cellule vitali dei bifidobatteri cresciuti singolarmente sono inferiori a quella della loro miscela. La media aritmetica dei valori riferiti ai ceppi singoli risulta essere 32,4 milioni / ml, mentre nella miscela sono stati riscontrati 53 milioni/ml, pari ad un incremento del 63%. I risultati migliori in termini di pH, densità ottica e carica in cellule vitali riscontrati nella miscela dei 5 bifidobatteri concesiuti sono ascrivibili ad un effetto sinergico tra i ceppi.

Tabella A

No.	Nome	Sigla comm	Istituto di deposito	Numero di deposito	Data di deposito	Titolare
1	<i>Lactobacillus casei</i>	LF1i	CNCM I.P.	I-785	21.07.1988	Anidral Srl
2	<i>Lactobacillus gasseri</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>pseudoplanarum</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 ai ai	LPC00	BCCM LMG	LMG P-21380	31.01.2002	Anidral Srl
15	<i>Lactobacillus</i> belonging to the <i>acidophilus</i> group 192A/1 ai ai	LA 02	BCCM LMG	LMG P-21381	31.01.2002	Anidral Srl
16	<i>Bifidobacterium longum</i> 175A/1 ai ai		BCCM LMG	LMG P-21382	31.01.2002	Anidral Srl
17	<i>Bifidobacterium breve</i> 195A/1 ai ci		BCCM LMG	LMG P-21383	31.01.2002	Anidral Srl
18	<i>Bifidobacterium lactis</i> 32A/3 ai ai	BS 01	BCCM LMG	LMG P-21384	31.01.2002	Anidral Srl
19	<i>Lactobacillus plantarum</i> 501/2 gi	COAKTI V	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</i> <i>adolescentis</i>	BA 03	DSMZ	DSM 16594	21.07.2004	Anidral Srl
33	<i>Bifidobacterium</i> <i>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</i> <i>pseudocatenulatum</i>	BP 01	DSMZ	DSM 16597	21.07.2004	Anidral Srl
36	<i>Bifidobacterium</i> <i>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. <i>rhamnosus</i>	LR 04	DSMZ	DSM 16605	20.07.2004	Anidral Srl
40	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	LDB 01	DSMZ	DSM 16606	20.07.2004	Anidral Srl
41	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	LDB 02	DSMZ	DSM 16607	20.07.2004	Anidral Srl
42	<i>Staphylococcus xylosus</i>	SX 01	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	<i>Bifidobacterium</i>	BA 03	DSMZ	DSM 18350	15.06.2006	Anidral Srl

= 32	<i>adolescentis</i> EI-3 <i>Bifidobacterium</i> <i>catenulatum</i> <i>sp./pseudocatenulatum</i> EI-3I, ID 09-255	BA 02	DSMZ	DSM 18351	15.06.2006	Anidral Srl
57 = 43	<i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> EI-15	BA 05	DSMZ	DSM 18352	15.06.2006	Anidral Srl
58	<i>Bifidobacterium</i> <i>adolescentis</i> EI-18 <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i> EI-18, ID 09-256	BC 01	DSMZ	DSM 18353	15.06.2006	Anidral Srl
59	<i>Bifidobacterium</i> <i>catenulatum</i> EI-20	MO1	DSMZ	DSM 18613	13.09.2006	Mofin Srl
60	<i>Streptococcus thermophilus</i> FRai	MO2	DSMZ	DSM 18614	13.09.2006	Mofin Srl
61	<i>Streptococcus thermophilus</i> LB2bi	MO3	DSMZ	DSM 18615	13.09.2006	Mofin Srl
62	<i>Streptococcus thermophilus</i> LRci	MO4	DSMZ	DSM 18616	13.09.2006	Mofin Srl
63	<i>Streptococcus thermophilus</i> FP4					

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> 641bi	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
75	<i>Streptococcus thermophilus</i>	GG3	DSMZ	DSM 19059	21.02.2007	Mofin Srl

	GB18	MO2	DSMZ	DSM 19060		
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</i> ssp. WSP 01	EX	DSMZ	DSM 19067	21.02.2007	Anidral Srl
84	<i>Weissella</i> ssp. WSP 02	EX	DSMZ	DSM 19068	21.02.2007	Anidral Srl
85	<i>Lactobacillus</i> ssp. 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</i> ssp. <i>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	Probiotical SpA
99	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA02	DSMZ	DSM 21717	06.08.2008	Probiotical SpA
100	<i>Lactobacillus paracasei</i>	LPC 08	DSMZ	DSM 21718	06.08.2008	Probiotical SpA
101	<i>Lactobacillus pentosus</i>	LPS 01	DSMZ	DSM 21980	14.11.2008	Probiotical SpA
102	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LR 06	DSMZ	DSM 21981	14.11.2008	Probiotical SpA
103	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Delbrueckii</i>	DSMZ 20074	DSMZ	DSM 22106	10.12.2008	Probiotical SpA
104	<i>Lactobacillus plantarum</i>	LP1	DSMZ	DSM 22107	10.12.2008	Probiotical SpA

105	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS01	DSMZ	DSM 22775	23.07.2009	Probiotical SpA
106	<i>Lactobacillus salivarius</i>	LS03	DSMZ	DSM 22776	23.07.2009	Probiotical SpA
107	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB01	DSMZ	DSM 22892	28.08.2009	Probiotical SpA
108	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		DSMZ	DSM 22893	28.08.2009	Probiotical SpA
109	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB03	DSMZ	DSM 22894	28.08.2009	Probiotical SpA
110	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BS05	DSMZ	DSM 23032	13.10.2009	Probiotical SpA
111	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA 06	DSMZ	DSM 23033	13.10.2009	Probiotical SpA
112	<i>Lactobacillus brevis</i>	LBR01	DSMZ	DSM 23034	13.10.2009	Probiotical SpA
113	<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>ssp. lactis</i>	BS06	DSMZ	DSM 23224	12.01.2010	Probiotical 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</i> ssp. <i>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 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

RIVENDICAZIONI

1. Un ceppo di batterio appartenente alla specie *Bifidobacterium longum* depositato presso il DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH - Germany, scelto dal gruppo comprendente:

- 1) *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
- 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
- 11) *Bifidobacterium longum* DLBL 17 = DSM 25679
- 12) *Bifidobacterium longum* DLBL 18 = DSM 25708
- 13) *Bifidobacterium longum* DLBL 19 = DSM 25717
- 14) *Bifidobacterium longum* DLBL 20 = DSM 25718

2. Un processo per la preparazione di colture batteriche appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum*, in cui detto processo comprende una fase nella quale almeno due ceppi di batteri appartenenti alla specie *Bifidobacterium longum*; preferibilmente, detti ceppi di

batteri sono scelti tra quelli rivendicati nella rivendicazione 1, sono fatti concrescere assieme in maniera sinergica in uno stesso substrato colturale.

3. Una composizione farmaceutica o cosmetica o un dispositivo medico o un prodotto integratore o una composizione alimentare comprendente almeno due ceppi di batteri ottenuti da un processo in accordo con la rivendicazione 2, per uso in un trattamento per aiutare il prolungamento della vita di un essere umano; o per uso in un trattamento per rallentare e/o contrastare e/o ridurre i processi biologici di invecchiamento fisico e della pelle o della cute; o per uso in un trattamento per rallentare e/o contrastare e/o ridurre i processi biologici di invecchiamento che portano alla perdita di memoria e/o capacità di concentrazione.

4. La composizione farmaceutica o cosmetica o un dispositivo medico o un prodotto integratore o una composizione alimentare comprendente almeno due ceppi di batteri ottenuti da un processo in accordo con la rivendicazione 2, per uso in un trattamento di inibizione della produzione di batteroidi mediante un meccanismo di inibizione aspecifico che prevede la produzione di metaboliti da parte di detto batterio e/o

mediante un meccanismo specifico che prevede la produzione di batteriocine da parte di detto batterio; o per uso in un trattamento di stimolazione della produzione di *Clostridi* butirrici in grado di produrre butirrati per contrastare l'insorgere di una colite, una colica ulcerosa, un'inflammazione dell'intestino o del tratto gastro-intestinale o della malattia di Crohn.

5. La composizione farmaceutica o cosmetica o un dispositivo medico o un prodotto integratore o una composizione alimentare comprendente almeno due ceppi di batteri ottenuti da un processo in accordo con la rivendicazione 2, per uso in un trattamento per ridurre il contenuto dei metaboliti tossici prodotti o derivati dalla degradazione proteica per migliorare la funzionalità renale.

6. La composizione farmaceutica o cosmetica o un dispositivo medico o un prodotto integratore o una composizione alimentare comprendente almeno due ceppi di batteri ottenuti da un processo in accordo con la rivendicazione 2, per uso in un trattamento antiossidante o immunomodulante con produzione di citochine.

7. La composizione in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni 3-6, in cui detta composizione inoltre comprende la N-acetilcisteina o una sostanza a base di N-acetilcisteina o un suo derivato.

8. La composizione in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni 3-7, in cui detta composizione inoltre comprende il selenio sottoforma di sodio seleniato, L-seleniometionina, sodio selenito, selenito acido di sodio, acido selenioso o selenio internalizzato in cellule di batteri scelti dal gruppo comprendente o, alternativamente consistente di:

- *Lactobacillus buchneri* LB26BM, depositato in data 05/04/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16341, e/o

- *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, depositato in data 17/01/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16144, e/o

- *Lactobacillus reuteri* LB2BM, depositato in data 17/01/2004 presso la DSMZ e avente numero di deposito DSM 16143.

9. Una composizione in accordo con una qualsiasi delle rivendicazioni 3-8, in cui detta composizione inoltre

comprende almeno un altro ceppo di batterio scelto dal gruppo comprendente:

- 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
- vi) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 09 = DSM 25685
- vii) *Bifidobacterium infantis* BI 03 = DSM 25709
- viii) *Lactobacillus plantarum* LP 09 = DSM 25710

- 1 -

CLAIMS

1. A bacterial strain belonging to the species *Bifidobacterium longum* deposited with the DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH - Germany, selected from the group comprising

- 1) *Bifidobacterium longum* DLBL 07 = DSM 25669
- 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
- 11) *Bifidobacterium longum* DLBL 17 = DSM 25679
- 12) *Bifidobacterium longum* DLBL 18 = DSM 25708
- 13) *Bifidobacterium longum* DLBL 19 = DSM 25717
- 14) *Bifidobacterium longum* DLBL 20 = DSM 25718

2. A process for preparing bacterial cultures belonging to the species *Bifidobacterium longum*, wherein said process comprises a step in which at least two bacterial strains belong to the species *Bifidobacterium longum*; preferably, said bacterial strains are selected

- 2 -

from those claimed in claim 1, and are made to grow together synergistically in the same culture substrate.

3. A pharmaceutical or cosmetic composition or a medical device or a supplement product or a food composition comprising at least two bacterial strains obtained by a process in accordance with claim 2, for use in a treatment for helping to prolong the life of a human being; or for use in a treatment for slowing down and/or combating and/or reducing the biological processes of physical and skin or cutaneous aging; or for use in a treatment for slowing down and/or combating and/or reducing the biological processes of aging that lead to loss of memory and/or capacity of concentration.

4. The pharmaceutical or cosmetic composition or medical device or supplement product or food composition comprising at least two bacterial strains obtained by a process in accordance with claim 2, for use in a treatment for inhibiting the production of bacteroides through an aspecific inhibiting mechanism that involves the production of metabolites by said bacterium and/or through a specific mechanism that envisages the production of bacteriocins by said

- 3 -

bacterium; or for use in a treatment for stimulating the production of butyric *Clostridia* capable of producing butyrates in order to hinder the onset of colitis, ulcerative colitis, an inflammation of the intestine or gastrointestinal tract or Crohn's disease.

5. The pharmaceutical or cosmetic composition or medical device or supplement product or food composition comprising at least two bacterial strains obtained by a process in accordance with claim 2, for use in a treatment for reducing the content of toxic metabolites produced by or deriving from protein degradation in order to improve kidney function.

6. The pharmaceutical or cosmetic composition or medical device or supplement product or food composition comprising at least two bacterial strains obtained by a process in accordance with claim 2, for use in an antioxidant or immunomodulating treatment with the production of cytokines.

7. The composition in accordance with any one of claims 3-6, wherein said composition further comprises N-acetylcysteine or a substance based on N-acetylcysteine or a derivative thereof.

- 4 -

8. The composition in accordance with any one of claims 3-7, wherein said composition further comprises selenium in the form of sodium selenate, L-selenomethionine, sodium selenite, sodium acid selenite, selenous acid or selenium internalized in cells of bacteria selected from the group comprising or, alternatively, consisting of:

- *Lactobacillus buchneri* LB26BM, deposited with the DSMZ on 05/04/2004 and having the deposit number DSM 16341, and/or
- *Lactobacillus ferintoshensis* LB6BM, deposited with the DSMZ on 17/01/2004 and having the deposit number DSM 16144, and/or
- *Lactobacillus reuteri* LB2BM, deposited with the DSMZ on 17/01/2004 and having the deposit number DSM 16143.

9. The composition in accordance with any one of claims 3-8, wherein said composition further comprises at least one other bacterial strain selected from the group comprising:

- 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

- 5 -

- vi) *Lactobacillus reuteri* DLLRE 09 = DSM 25685
- vii) *Bifidobacterium infantis* BI 03 = DSM 25709
- viii) *Lactobacillus plantarum* LP 09 = DSM 25710