

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 547**

21 Número de solicitud: 201031811

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2006.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A61P 37/02** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **07.12.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**29.10.2012**

71 Solicitante/s:  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC)  
SERRANO, 117  
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:  
**SANZ HERRANZ, Yolanda;  
ARLETTE SANTACRUZ, Yolanda y  
GAUFFIN, Paola**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **BIFIDOBACTERIUM CECT 7765 Y SU USO EN LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DEL SOBREPESO, LA OBESIDAD Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS.**

57 Resumen:

Bifidobacterium CECT 7765 y su uso en la prevención y/o tratamiento del sobrepeso, la obesidad y patologías asociadas.

La presente invención se refiere a la cepa Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765, a sus componentes celulares, metabolitos, y moléculas secretadas, a sus combinaciones con otros microorganismos, y a composiciones que comprenden los productos anteriores, así como al uso de una cepa de la especie Bifidobacterium pseudocatenulatum o al uso de la cepa CECT 7765 para la prevención y/o tratamiento de la obesidad; el sobrepeso; la hiperglicemia y diabetes, preferiblemente diabetes Mellitus tipo 2; la esteatosis hepática o hígado graso; la displemia; el síndrome metabólico; la disfunción del sistema inmune asociado a la obesidad y sobrepeso; y el desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal asociado a la obesidad y sobrepeso.

ES 2 389 547 A1

## DESCRIPCIÓN

**Bifidobacterium CECT 7765 y su uso en la prevención y/o tratamiento del sobrepeso, la obesidad y patologías asociadas**

La presente invención se encuadra dentro del campo de la actividad  
5 terapéutica de composiciones o preparaciones farmacéuticas, así como dentro  
del campo de la alimentación. En concreto, la presente invención se refiere a la  
cepa *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765, a sus componentes  
celulares, metabolitos, y moléculas secretadas, a sus combinaciones con otros  
microorganismos, y a composiciones que comprenden los productos anteriores,  
10 así como al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* o al uso de la  
cepa CECT 7765 para la prevención y/o tratamiento de la obesidad; el  
sobrepeso; la hiperglicemia y diabetes, preferiblemente diabetes Mellitus tipo 2;  
la esteatosis hepática o hígado graso; la displemia; el síndrome metabólico; la  
disfunción del sistema inmune asociado a la obesidad y sobrepeso; y el  
15 desequilibrio en la composición de la microbiota intestinal asociado a la  
obesidad y sobrepeso.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

20 El sobrepeso y la obesidad constituyen, actualmente, uno de los principales  
problemas de salud pública debido a su creciente prevalencia y co-  
morbididades. Entre éstas se incluyen por ejemplo el síndrome metabólico, la  
hipertensión, la dislipemia, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la  
ateroesclerosis, la esteatosis hepática o hígado graso y algunos tipos de  
25 cáncer.

La obesidad se produce como consecuencia de un desequilibrio positivo y  
prolongado entre la ingesta y el gasto energético, que conlleva aumento  
excesivo de la grasa corporal. En el control del balance energético intervienen  
30 péptidos y hormonas sintetizados por el sistema neuroendocrino que permiten  
la comunicación entre diversos tejidos y órganos periféricos y, el sistema  
nervioso central que, globalmente, contribuyen a regular el peso corporal. En el

control de la ingesta a largo plazo son primordiales las señales que emanan del tejido adiposo (leptina) y el páncreas (insulina) (Konturek *et al.*, 2004. *J Physiol Pharmacol.*, 55: 137-154). La insulina es la hormona más importante en la regulación del buen funcionamiento del tejido adiposo y la acumulación de triglicéridos en el mismo, y en la captación de la glucosa. En el tejido adiposo normal sensible a la insulina el almacenamiento de grasa se produce aquí, como respuesta a la insulina y otras hormonas (leptina), mediante la estimulación de la lipoproteín lipasa e inhibición de la lipólisis. Sin embargo, el acumulo excesivo de ácidos grasos en el tejido adiposo asociado a la obesidad reduce la sensibilidad a la insulina, lo que desvía el acumulo de ácidos grasos libres en forma de triglicéridos a diversos órganos y tejidos (hígado, músculo, corazón, etc.), y causa alteraciones en la producción o sensibilidad a la leptina, y el aumento de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, lo que conlleva a su vez mayor riesgo de desarrollo de enfermedades asociadas (síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, etc). En el sistema nervioso central, la señalización por insulina también es esencial para el control del balance energético y la homeostasis de la glucosa, y es dependiente de su interacción con otros factores reguladores, como la leptina, que actúan conjuntamente como factores anorexigénicos, reduciendo la ingesta (Gerozissis K., 2004. *Eur J Pharmacol.*, 490(1-3): 59-70). La leptina es una hormona/adipoquina sintetizada principalmente por el tejido adiposo y, en menor medida, por otros tejidos como el estómago, y su secreción es estimulada por la insulina. A nivel del sistema nervioso central, la leptina suprime el apetito, aumenta el gasto energético e interviene en procesos vitales como la función de células  $\beta$  pancreáticas favoreciendo la secreción de insulina (La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 May;4(5):371-9). A nivel periférico, la leptina actúa reduciendo la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, y aumentando la oxidación lipídica. No obstante, en sujetos obesos las concentraciones periféricas de esta adipoquina son anormalmente elevadas y se produce una resistencia a la misma. Las altas concentraciones de leptina en sujetos obesos, además de constituir un

marcador de alteraciones metabólicas, puede modificar la respuesta inmunitaria y contribuir al estado de inflamación asociado a la obesidad.

La obesidad también se considera un estado de inflamación crónica leve, caracterizado por una elevada producción de citoquinas, adipocinas y otras proteínas pro-inflamatorias en el tejido adiposo y a nivel sistémico, que contribuyen a las alteraciones metabólicas que pueden sufrir estos individuos de forma permanente, como la diabetes Mellitus tipo 2 (Tilg y Moschen, 2006. *Nat Rev Immunol.*, 6: 772-783). Entre los factores inflamatorios relacionados con la obesidad y alteraciones metabólicas, destacan las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL6 y la proteína quimioatrayente de macrófagos MCP1. En particular, el TNF- $\alpha$  reduce la expresión de genes involucrados en la acción de la insulina (por ejemplo la del gen de su receptor), atenúa la señalización por insulina e inhibe la acción de la lipoproteína lipasa estimulada por la insulina. La MCP1 favorece la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo asociada al aumento de peso, lo que contribuye al aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ ), y al desarrollo de resistencia a insulina y de esteatosis hepática. La función de citoquinas proinflamatorias en este proceso se ha puesto de manifiesto también mediante el uso de fármacos basados en anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  para mejorar patologías como la esteatosis, y la resistencia a insulina y diabetes Mellitus tipo 2 (Tilg y Moschen, 2006. *Nat Rev Immunol.*, 6: 772-783).

La obesidad también se caracteriza por alteraciones en las funciones de diversas células del sistema inmunitario, como los macrófagos, las células dendríticas y las células T, asociadas a deficiencias en la defensa frente a patógenos y otros antígenos, y a un mayor riesgo de infecciones y complicaciones postoperatorias. Los macrófagos del tejido adiposo presentan menor capacidad fagocítica y reducción del estallido respiratorio, que son procesos implicados en la respuesta del sistema inmune innato frente a agentes infecciosos (Zhou *et al.*, 2009. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(26):10740-5.). Además, las células dendríticas presentan alteraciones en

su capacidad para estimular las células T, implicadas en la respuesta inmune adaptativa responsable, por ejemplo, de la producción de anticuerpos en vacunación y de la respuesta de células T de memoria en casos de infección (Karlsson *et al.*, 2010. *J Immunol.*, 184:3127-33).

5

Los cambios sociales asociados al aumento regular de la ingesta de alimentos con alta carga energética y una baja actividad física se consideran las principales causas del aumento de la incidencia de la obesidad en todo el mundo. No obstante, los tratamientos tradicionales basados en dietas hipocalóricas y aumento de la actividad física muestran una eficacia reducida en el control de la obesidad y, por lo general, conducen a reducciones de peso limitadas y temporales. El uso de estrategias farmacológicas tampoco ha sido satisfactorio ya que conlleva efectos secundarios. Como consecuencia, se siguen buscando nuevas estrategias de intervención que mejoren el tratamiento y posibiliten la prevención de estas patologías.

15

La microbiota que coloniza el intestino humano se considera un nuevo factor implicado en la obesidad y las enfermedades asociadas, a través de su capacidad para regular las funciones metabólicas e inmunológicas del individuo (Sanz *et al.*, 2010. *Proc Nutr Soc.*, 14: 1-8.). La detección de alteraciones en la composición de la microbiota asociadas a la obesidad también ha dado lugar a proponer la manipulación intencionada del ecosistema intestinal como alternativa para controlar la obesidad (Ley *et al.*, 2006. *Nature*, 444: 1022-1023; Nadal *et al.*, 2008. *Int J Obes.*, 33(7): 758-67). En este sentido, el uso de microorganismos del grupo de las bacterias acidolácticas y bifidobacterias para tratar la obesidad o las enfermedades asociadas se ha propuesto en diversas publicaciones o patentes. En la solicitud de patente internacional WO2007/043933 se propone que las cepas *Lactobacillus* F19 y NCFB 1748 y *B. lactis* Bb12 pueden ser usadas para controlar el peso corporal y reducir el apetito en forma de leches fermentadas; no obstante, las proteínas de la leche y el calcio que contiene podrían ser las responsables del efecto en lugar de las cepas y los efectos se basan tan sólo en la modificación de la expresión de

20

25

30

genes relacionados con el metabolismo en el intestino delgado; sin embargo, la obesidad implica a muchos otros órganos y tejidos. En la solicitud de patente US 20100061967 A1 también se ha propuesto el uso de bacterias que modulen la expresión de péptidos que regulan la saciedad tan sólo en el tracto gastrointestinal. En otras solicitudes de patente (WO2009153662) se ha propuesto el uso de bifidobacterias y lactobacilos en diabetes basándose exclusivamente en la capacidad de estos microorganismos para reducir la inflamación de tejidos periféricos, sin tener en cuenta los efectos a nivel del sistema nervioso central ni otros procesos implicados en el origen y evolución de esta patología. En la solicitud de patente US20100150890 se ha propuesto el uso de bacterias probióticas para estimular la función del sistema nervioso simpático, de modo que se acelere el metabolismo y el gasto energético; no obstante, el tono simpático también está aumentado en algunos pacientes obesos. En la solicitud de patente US20100111915 se ha propuesto el uso genérico de bacterias probióticas en la infancia para prevenir la obesidad basándose en su efecto bifidogénico (aumento del total de bifidobacterias en el intestino), sin aportar un fundamento sobre el modo en el que un simple aumento generalizado de bifidobacterias, puede modificar procesos concretos que conducen al desarrollo de la obesidad; más aún, si se tiene en cuenta que las propiedades de las bifidobacterias son específicas de cada cepa. Además, los estudios realizados relacionados con el documento de patente mencionado no se han llevado a cabo con una cepa del género *Bifidobacterium* sino con cepas del género *Lactobacillus* o su combinación con *B. lactis* Bb12 y modificaciones en la dieta, por lo que los resultados no se pueden atribuir a las bifidobacterias (US20100111915; Luoto *et al.*, 2010. *Br J Nutr.*, 103(12): 1792-9; Luoto *et al.* 2010. *Int J Obes* (Lond). Mar 16) y, en cualquier caso, se trata de cepas diferentes a las de la presente invención. En otra solicitud de patente US20050112112 se propone el uso de microorganismos que generen polímeros a partir de mono y disacáridos, reduciendo la absorción particular de estos compuestos por el individuo o bien el uso de sustancias como el quitosano combinadas con bifidobacterias para reducir la absorción de forma específica del colesterol (JP10306028), lo que constituyen modos parciales de

reducir el problema de la obesidad asociada a componentes específicos de la dieta.

5 Por tanto, persiste el problema de encontrar estrategias más idóneas para prevenir y/o tratar enfermedades como el sobrepeso, la obesidad, y las patologías asociadas, como por ejemplo la diabetes, la dislipemia, la esteatosis hepática y el síndrome metabólico, actuando conjuntamente sobre su relación con el malfuncionamiento del sistema inmunitario y su conexión con el metabolismo de la glucosa y la resistencia a la insulina a nivel periférico y  
10 central, y con alteraciones en la acumulación de lípidos en sangre y tejidos periféricos responsables de diversas patologías crónicas.

### **EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN**

15 La presente invención se refiere a la cepa *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT 7765, a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de dicha cepa, y a sus combinaciones con otros microorganismos, y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a su uso para la prevención y/o tratamiento del sobrepeso y/o de la obesidad, y de las  
20 alteraciones asociadas como la diabetes, la dislipemia, la esteatosis hepática, el síndrome metabólico o la disfunción del sistema inmune con consecuencias sobre otras patologías como las infecciones. La presente invención también se refiere al uso de dicha cepa para la prevención y/o tratamiento de éstas alteraciones cuando no se presentan asociadas con un problema de sobrepeso  
25 y/o de obesidad.

La cepa CECT 7765, que pertenece a la especie *B. pseudocatenulatum*, presenta propiedades inmunológicas comparativamente más favorables que otras cepas de la misma especie, de otras especies del género *Bifidobacterium*  
30 y de otros géneros de bacterias lácticas. La cepa CECT 7765 induce significativamente menor producción de la citoquina pro-inflamatoria TNF-alfa en macrófagos, en comparación con cepas de otras especies y de la misma

especie (entre aproximadamente 2,5 y 12,6 veces menor; Tabla 1); además, también induce una producción menor de MCP1 (entre aproximadamente 1,2 y 38,2 veces menor; Tabla 1). Tal como se ha argumentado en el apartado del estado de la técnica, la síntesis de estas citoquinas y quimioquinas por macrófagos se ha relacionado directamente por ejemplo con la obesidad, la diabetes, la dislipemia y otras alteraciones metabólicas relacionadas. Por otro lado, la cepa CECT 7765 induce la síntesis de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL10, relacionadas inversamente con estas patologías en mayor proporción que otras cepas del género *Bifidobacterium* (entre 1,9 y 4,8 veces mayor; Tabla 2). Las propiedades inmunológicas de la bacteria seleccionada no son comunes a todas las cepas bacterianas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y la hacen especialmente idónea para su aplicación en el tratamiento y prevención del sobrepeso y/o de la obesidad y de las patologías asociadas, cuando se presentan conjuntamente o de forma independiente a la obesidad y sobrepeso, ya que la característica común de todas ellas es su asociación con un estado de inflamación crónica de bajo grado.

A diferencia del estado de la técnica, la presente invención aborda el tratamiento de la obesidad con una perspectiva multifactorial y, además, actúa sobre nuevas dianas claves para la prevención y/o tratamiento de esta patología o patologías asociadas, no descritas para ninguna cepa del género *Bifidobacterium* conocida. El hecho más interesante es que ninguna de las cepas conocidas de este género o especie ha mostrado ser útil para el tratamiento simultáneo y eficaz de todas las afecciones indicadas a lo largo de la presente invención.

Por tanto, la presente invención aporta al estado de la técnica una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* de alto valor para el tratamiento del sobrepeso y/o de la obesidad así como determinadas patologías asociadas como por ejemplo pero sin limitarse, la diabetes, la esteatosis hepática, la dislipemia o el síndrome metabólico.

Esencialmente, las ventajas que presenta el uso de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 de la presente invención son las siguientes:

- La administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 produce una  
5 reducción del tamaño de los adipocitos en sujetos obesos y no obesos (ver  
ejemplo 4). En particular, la administración de la cepa CECT 7765 a animales  
obesos da lugar a un aumento de adipocitos de pequeño tamaño (1000-2000  
 $\mu\text{m}^2$ ), mientras que en los animales obesos a los que no se les ha administrado  
la cepa se produce un aumento de los adipocitos de mayor tamaño (4000-6000  
10  $\mu\text{m}^2$ )(Ejemplo 4, FIG. 5).

El hecho de que la cepa CECT 7765 reduzca el tamaño de los adipocitos,  
demuestra que es útil para el tratamiento de la hipertrofia de los adipocitos, que  
si se mantiene en el tiempo y sucede en un gran número de adipocitos, puede  
15 provocar sobrepeso y obesidad. Esto es debido a que los adipocitos de mayor  
tamaño secretan mayor concentración de factores de crecimiento que  
desencadenan la adipogénesis a través de la diferenciación de los  
preadipocitos, generándose un proceso de retroalimentación. Además, los  
adipocitos con hipertrofia producen una concentración anormalmente elevada  
20 de citoquinas y quimioquinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-6, resistina, etc.)  
que inhiben la señalización por insulina en los hepatocitos y provocan  
resistencia a la insulina y otras complicaciones. El aumento del tamaño de los  
adipocitos también está relacionado con el aumento del aporte de ácidos  
grasos al hígado, que da lugar a esteatosis hepática y sus complicaciones. Por  
25 tanto, la cepa puede asimismo contribuir a prevenir o mejorar estas patologías  
asociadas.

- La administración de la cepa objeto de la invención da lugar a una reducción  
de la grasa acumulada en el hígado en sujetos obesos y no obesos (Ejemplo 4,  
30 FIG. 6). Concretamente, la cepa produce una disminución del número de  
hepatocitos de grado 4 de máximo contenido en grasa (> 66%) y un aumento  
de los de grado 3 (contenido en grasa del 34-66%); sin embargo, en animales

obesos a los que no se les administra la cepa, la proporción del tipo de hepatocitos es inversa, predominando los de máximo contenido en grasa. En animales controles, la administración de la cepa produce un aumento de hepatocitos de grado 2 (contenido en grasa < 33%) y una reducción de los hepatocitos de grado 3 (contenido en grasa del 34-66%); a la inversa de lo que ocurre en animales que no han recibido la cepa. De este modo se demuestra que la administración de la cepa reduce la acumulación total de grasa en el hígado inducida o no por la dieta.

Por tanto, la cepa CECT 7765 puede ser usada para la prevención y/o el tratamiento de la esteatosis hepática. Esta patología puede ser considerada una patología asociada a dietas con alta carga energética y a la obesidad (se presenta en un 60-90% de sujetos obesos), pero hay casos en los que su causa no es debida al sobrepeso y/o a la obesidad, sino por ejemplo y sin limitar puede ser causa de infecciones y trastornos nutricionales o metabólicos hereditarios.

-La cepa *B. pseudocatenuatum* CECT 7765 reduce el número de quilomicrones en los enterocitos, es decir, reduce la cantidad de grasa de la dieta que puede ser absorbida y pasar a linfa y sangre en forma de quilomicrones y, de este modo, a tejidos periféricos (Ejemplo 6, FIG. 7). Esta propiedad se refleja también en una reducción de las concentraciones de triglicéridos en sangre periférica (Ejemplo 5). La absorción aumentada de la grasa de la dieta, además, de poder ser causa de sobrepeso y/o de la obesidad por provocar un incremento de su acumulación en el tejido adiposo, puede ser la causa de otras patologías sin que se llegue a provocar sobrepeso u obesidad, como por ejemplo y sin que limite el alcance de la invención, la aterosclerosis, la dislipemia, el síndrome metabólico, las patologías cardiovasculares y otras alteraciones derivadas de la relación entre el metabolismo de lípidos y el de la glucosa. La dislipemia también puede ser consecuencia no sólo de la grasa de la dieta absorbida sino de otras alteraciones del metabolismo como la resistencia a insulina de los adipocitos

que, sin que esté necesariamente asociada a obesidad, hace que estos liberen ácidos grasos que se utilizarán en el hígado para aumentar la síntesis de triglicéridos y su secreción y aumento en sangre periférica. La dislipemia también puede presentarse en sujetos predispuestos genéticamente a esta alteración metabólica, sin estar necesariamente asociada a la obesidad, a la resistencia a la insulina, o al aumento de la absorción de grasa de la dieta. Por tanto, la cepa CECT 7765 puede ser eficaz en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con la absorción excesiva de grasas a partir de la dieta y para la prevención y/o el tratamiento de la dislipemia (e.g. hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia).

- La cepa CECT 7765 regula las alteraciones del metabolismo de la glucosa y el aumento de su concentración en sangre periférica (hiperglicemia), relacionadas con la síntesis y función de la insulina (Ejemplo 5). El aumento de glucosa se puede producir, entre otras causas, por resistencia a insulina o falta de síntesis de insulina pero no necesariamente asociado a obesidad.

- La cepa CECT 7765 mejora el funcionamiento de células del sistema inmunitario innato y adaptativo, incrementando su capacidad para responder a agentes infecciosos, antígenos o alérgenos en sujetos obesos y sin obesidad. En particular, la administración de la cepa a animales modelo de obesidad inducida por una dieta rica en grasa mejora, entre otras, la función de los macrófagos en la fagocitosis y en la síntesis de citoquinas (Ejemplo 3, FIG. 2 y 3). La cepa objeto de la invención también mejora la función de las células dendríticas y células T del sistema inmune adaptativo (Ejemplo 3, FIG. 4).

Por tanto, la cepa CECT 7765 tiene un efecto positivo adicional porque puede ser útil para la prevención y el tratamiento de infecciones y la mejora de las respuestas protectoras por ejemplo en procesos de vacunación e inmunización, debido a que estas funciones del sistema inmunitario están alteradas en sujetos con sobrepeso y obesidad. Además, la cepa de la invención puede ser útil para el tratamiento o prevención de otras enfermedades (por ejemplo,

diabetes) que cursen con inmunodepresión (fundamentalmente de macrófagos, células dendríticas y células T), asociadas o no a la obesidad y el sobrepeso.

- La cepa CECT 7765 es capaz de inducir menor cantidad de proteínas pro-inflamatorias a nivel periférico y central, en sujetos obesos y normo-peso  
5 tratados con dicha cepa respecto a los no tratados con la misma. Así, la cepa objeto de la invención también reduce la síntesis de TNF- $\alpha$  en periferia y en el sistema nervioso central, cuya síntesis está incrementada en la obesidad y otras patologías y contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina y a la  
10 leptina, inhibiendo sus efectos anorexigénicos (reducción de la sensación de hambre) y su función en la regulación del peso corporal y el metabolismo de glucosa (Ejemplo 3). La cepa también reduce la concentración de leptina en sangre periférica en sujetos obesos, en los que está aumentada, y favorece la inflamación, y la aumenta en sujetos nomo-peso en los que, inversamente,  
15 contribuye a la reducción del apetito y la ingesta, y al aumento del gasto energético y la oxidación lipídica y, por tanto, a la reducción del peso corporal (Ejemplo 3, FIG. 8).

Por tanto, la cepa CECT 7765 regula la producción de proteínas y hormonas  
20 (citoquinas, quimioquinas y adipoquinas), cuya síntesis está alterada en la obesidad y en determinadas enfermedades asociadas a la misma, como por ejemplo y sin limitar la diabetes, la dislipemia, el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y la esteatosis, tanto en sangre periférica como en el sistema nervioso central, y en otras enfermedades no necesariamente  
25 asociadas al sobrepeso y/o a la obesidad y, por tanto, se puede utilizar para el tratamiento y prevención de estas patologías.

- Además, la cepa CECT 7765 restablece la composición de la microbiota intestinal, normalizando las alteraciones asociadas al sobrepeso y la obesidad  
30 y el efecto inflamatorio que causan estas alteraciones, y que se ha relacionado con el aumento de peso, la resistencia a la insulina, la endotoxemia metabólica, la esteatosis hepática y la alteración de la función barrera intestinal (Ejemplo 3).

La cepa de la invención también puede emplearse para la reducción de sobrecrecimiento de enterobacterias intestinales patógenas u oportunistas, que puedan estar asociadas de forma primaria o secundaria a otras patologías subyacentes o que constituyan un riesgo para su desencadenamiento. Por tanto, la cepa CECT 7765 tiene aplicación adicionalmente en la prevención y el tratamiento de infecciones y enfermedades asociadas a alteraciones en la microbiota intestinal.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una cepa de *B. pseudocatenulatum* con número de depósito CECT 7765. Dicha cepa ha sido depositada en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 21 de Julio de 2010 y le correspondió el nº de depósito CECT 7765. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia / Edificio de investigación / Campus de Burjassot / 46100 Burjassot (Valencia).

La clasificación científica de la cepa CECT 7765 de la presente invención es: Reino: *Bacteria* / Filo: *Actinobacteria* / Orden: *Bifidobacteriales* / Familia: *Bifidobacteriaceae* / Género: *Bifidobacterium* / Especie: *pseudocatenulatum*.

Las características de dicha cepa son:

- Los sustratos que la bacteria CECT 7765 oxida o fermenta son: D-arabinosa, ribosa, B-metil-D-xilósido, galactosa, D-glucosa,  $\alpha$ -metil-D-manósido, N-acetil glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, melezitosa y xilitol.

-La cepa CECT 7765 posee las siguientes actividades enzimáticas: orto nitrofenil- $\beta$ D-galactopiranosidasa y arginina dihidrolasa.

- La cepa crece en un intervalo de temperaturas comprendido entre 31 y 42 °C, con un óptimo a 37 °C.

- La cepa crece en un intervalo de pH comprendido entre 5 y 8, con un óptimo a pH 7.

Además, la cepa es estable en las condiciones de estrés gastrointestinal (pH ácido y alta concentración de bilis). Su viabilidad tras su incubación en condiciones gástricas (pepsina 3g/l a pH 3 y 2.5) durante el tiempo medio de vaciado gástrico (2 h) es del 64-95% y su crecimiento en presencia de sales biliares (0.5 y 1%) se mantiene entre el 80 y el 90%. También es resistente a las condiciones de los procesos tecnológicos de conservación (congelación, liofilización, etc.), y a las condiciones de elaboración de alimentos (refrigeración, liofilización, fermentación, etc.) y crece en diversos medios de producción del microorganismo a escala industrial. Por ejemplo, la cepa muestra un crecimiento en leche prácticamente igual al obtenido en el medio de laboratorio comercial MRS y una unidad logarítmica superior en medio GEM de producción industrial. *In vivo* es capaz de sobrevivir el tránsito intestinal tras su administración por vía oral, mostrando reducciones de tan sólo 1-2 unidades logarítmicas en relación a la dosis inicial administrada, en función de los sujetos y del tipo de muestra analizada y tiempo transcurrido tras la administración. Todas estas propiedades garantizan su viabilidad y persistencia y efectividad en el intestino.

20

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a una cepa derivada de la cepa *B. pseudocatenuatum* CECT 7765, donde dicha cepa mantiene o mejora las capacidades descritas a lo largo de la presente invención. El microorganismo derivado puede producirse de forma natural o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo pero sin limitarse, el crecimiento del microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Según una realización más preferida la cepa derivada de la cepa *B. pseudocatenuatum* CECT 7765 es un mutante genéticamente modificado. Los términos cepa mutante o cepa derivada pueden ser utilizados indistintamente.

30

- La cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 o cualquier mutante o derivado de la misma puede ser utilizada en cualquier forma que ejerza los efectos descritos, como por ejemplo, según una realización preferida de la presente invención, la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 está en forma de células
- 5 viables (cultivables o no cultivables), o según otra realización preferida de la invención la cepa está en forma de células no viables (células “muertas” inactivadas por cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, calor, congelación o radicación ultravioleta).
- 10 En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de las cepas bacterianas de la especie *B. pseudocatenulatum* descritas en el aspecto y realizaciones preferidas anteriores como la “cepa de la presente invención” o la “cepa de la invención”.
- 15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la combinación de microorganismos que comprende la cepa de la invención. La combinación de microorganismos es un conjunto de células de la cepa de la invención, o al menos una célula de la cepa de la invención, junto con un conjunto de células de otra cepa de la misma especie o de diferente especie u otro grupo
- 20 taxonómico de microorganismos. Las células de la combinación de microorganismos pueden ser no viables o viables y estar en cualquier fase del estado de desarrollo o crecimiento (latente, exponencial, estacionaria, etc.), independientemente de la morfología que presente.
- 25 Una realización preferida de la presente invención se refiere a la combinación de microorganismos donde dicha combinación comprende al menos otro microorganismo diferente a la cepa de la invención, por ejemplo, pero sin limitarse, el microorganismo que puede formar parte de dicha combinación es:
- al menos otra cepa del género *Bifidobacterium*, por ejemplo y sin limitarse, la
- 30 cepa *B. longum* CECT 7347 u otras cepas de las especies *B. pseudocatenulatum*, *B. catenulatum*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum*, *B.*

*longum* subsp. *infantis*, *B. lactis* subsp. *lactis*, *B. lactis* subsp. *animalis*, o *B. adolescentes*.

- al menos una bacteria láctica de origen intestinal, alimentario o ambiental. La bacteria láctica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, una  
 5 bacteria del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* o *Streptococcus*.

- al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariontes de origen intestinal, alimentario o ambiental, como por ejemplo pero sin limitarse a *Archaea*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*,  
 10 *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Metanobacteria*, *Spirochaetes*, *Fibrobacters*, *Deferribacteres*, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cianobacteria*, *Methanobrevibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*,  
 15 *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio* o *Clostridium*;

- Al menos una cepa de hongo o levadura como por ejemplo, pero sin limitarse, perteneciente al género *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*,  
 20 *Torulopsis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Penicillium*.

En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de las combinaciones de microorganismos descritos en el párrafo anterior como la “combinación de microorganismos de la presente invención” o la “combinación de  
 25 microorganismos de la invención”.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de la invención, o a partir de la combinación de  
 30 microorganismos de la invención. En la presente invención también se contempla la combinación de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de

la cepa CECT 7765, o a partir de la combinación de microorganismos de la invención con otros componentes de alimentos, productos vegetales y fármacos.

5 Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como por ejemplo pero sin limitarse, peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana, u otros como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones, como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas. Los metabolitos incluyen cualquier

10 molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, pero sin limitarse, procesos de elaboración de alimentos o fármacos), durante el almacenamiento del producto o durante el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse, los

15 ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula exportada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo de

20 elaboración de alimentos o fármacos), el almacenamiento del producto o el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende la cepa de la invención; o la combinación de microorganismos de la invención; o los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cualquiera de sus combinaciones.

30 La composición, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está formado al menos por la cepa de la invención en cualquier

concentración; o al menos por los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cualquiera de sus combinaciones.

- 5 La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formado al menos por la cepa de la invención en cualquier concentración; o al menos por los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cualquiera de sus combinaciones, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un  
10 sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud.

El término medicamento tiene un significado más limitado que el significado de "composición farmacéutica", tal como se define en la presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto preventivo o terapéutico  
15 es decir, un efecto fisiológico en el sujeto. Más adelante se definirá debidamente el término "medicamento".

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la composición, donde dicha composición es una composición farmacéutica. En una realización  
20 aún más preferida, la composición farmacéutica además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente  
25 invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del  
30 medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la

disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término “excipiente” se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para  
5 posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente “farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con dichos componentes.

10

La “forma galénica o forma farmacéutica” es la disposición a que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir un medicamento. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

15

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el  
20 medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente  
25 aceptable es el diluyente.

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

30

En otra realización aún más preferida, la composición farmacéutica además comprende otra sustancia activa. Además del requerimiento de la eficacia

terapéutica, donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico. El término “principio activo” es toda materia, cualquiera que sea su origen, humano, animal, vegetal, 5 químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento.

En cada caso la forma de presentación del medicamento se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se 10 puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, 15 cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. Según una realización aún más preferida de la presente invención, la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

20 La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

25 Otra posibilidad es que la composición farmacéutica se presente en una forma adaptada a la administración sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica o inhalada. La cepa de la invención; la combinación de microorganismos de la invención; los componentes celulares, metabolitos, 30 moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de la invención, o a partir de la combinación de microorganismos de la

invención; pueden ir asociados, por ejemplo, pero sin limitarse, con liposomas o micelas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad de la cepa de la invención; de la combinación de microorganismos de la invención; de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, en cualquier forma de presentación; la cantidad terapéuticamente efectiva variará también según la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a la composición, donde dicha composición es una composición nutritiva. Una realización más preferida de la presente invención se refiere a la composición nutritiva donde dicha composición es un alimento, un nutraceutico, un suplemento, un probiótico o un simbiótico.

El término “composición nutritiva” de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento

de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término "composición nutritiva" de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal.

5

El término "nutracéutico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto beneficioso sobre la salud.

10 El término "probiótico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo hospedador.

15 El término "simbiótico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a aquellos alimentos que contienen una mezcla de prebióticos y probióticos. Por regla general contienen un componente prebiótico que favorece el crecimiento y/o actividad metabólica y en definitiva el efecto del probiótico con el que se combina, como por ejemplo y sin limitar puede ser la asociación de la fructooligosacáridos o galactooligosacáridos a las bifidobacterias.

20

El término "suplemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético", "suplementos nutricional" o "suplemento alimenticio" es un "ingrediente alimenticio" destinado a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos son, pero sin limitarse, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia sino como complemento de la dieta.

25  
30 Según una realización aún más preferida, el alimento se selecciona de la lista que comprende: producto lácteo, producto vegetal, producto cárnico, aperitivo, chocolate, bebida o alimento infantil. El producto lácteo se selecciona de la lista

que comprende, pero sin limitarse, producto derivado de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitar yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitar, helado, mantequilla, margarina, suero lácteo). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitarse, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado o no fermentado. La bebida puede ser, pero sin limitarse, cualquier zumo de frutas o leche no fermentada.

Otra realización más preferida de la presente invención se refiere a cualquiera de las composiciones descritas en la invención, donde dicha composición tiene una concentración de la cepa de entre  $10^3$  y  $10^{14}$  unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final. La concentración de la cepa es aquella concentración terapéuticamente efectiva o nutritivamente efectiva, según el caso. La composición nutritiva y la composición farmacéutica, pueden formularse, pero sin limitarse, en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, microcápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, pasta, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol.

En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de las composiciones, composición general, composición farmacéutica o composición nutritiva, definidas en párrafos anteriores por medio del término "composición de la presente invención" o "composición de la invención".

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una cepa CECT 7765 de la especie *B. pseudocatenuatum* para la fabricación de una composición farmacéutica, de un medicamento o de una composición nutritiva. Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de una composición nutritiva, de un medicamento o de una composición nutritiva.

Cualquier composición farmacéutica definida en párrafos anteriores puede usarse para la fabricación de un medicamento.

5 El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

20 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenuatum*, de la cepa de la invención CECT 7765; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para la prevención y/o tratamiento de sobrepeso, obesidad o para la prevención y/o tratamiento de cualquier patología o disfunción (por ejemplo del sistema inmunitario) asociada con las mismas.

30 El término “tratamiento” tal como se entiende en la presente invención se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una

enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 5 (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste  
10 en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

15 El término “sobrepeso” tal como se usa en la presente invención se refiere a una patología caracterizada porque el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 25. El IMC es una medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo. El IMC tiene la siguiente fórmula para su cálculo: Masa (Kg) / estatura<sup>2</sup> (m). El sobrepeso se caracteriza por un IMC de entre ≥  
20 25 a < 30.

Cuando el IMC es igual o mayor de 30, el sujeto padece “obesidad”. La obesidad se clasifica en diferentes niveles, considerando que sujetos con IMC > 40 padecen de obesidad mórbida. La obesidad es una condición clínica en la  
25 que las reservas de energía, almacenadas en el tejido adiposo de humanos y otros mamíferos, exceden de límites saludables. La acumulación de lípidos conduce a la deposición de grasa en diversos tejidos, sobrepeso, obesidad y a una serie de patologías asociadas a dicho sobrepeso u obesidad, como por ejemplo pero sin limitarse; diabetes Mellitus tipo 2 y diabetes gestacional, la  
30 dislipemia (preferiblemente hiperlipidemia e hipercolesterolemia), la patología cardiovascular, la hipertensión, el hígado graso (preferiblemente hígado graso no alcohólico o esteatosis hepática, esteatohepatitis no alcohólica, cirrosis o

hepatitis), el síndrome metabólico, el cáncer, las infecciones, etc. Es ampliamente conocida en el estado de la técnica la relación entre dichas patologías y su asociación con el sobrepeso o con la obesidad (como por ejemplo en WO/2010086454 o WO/2008119110). Por tanto, el uso del medicamento, la composición farmacéutica o la composición nutritiva en la prevención y/o tratamiento de patologías asociadas a sobrepeso y/o a obesidad, está justificada debido a que dicha asociación ha sido ampliamente demostrada y, por tanto, el uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* o de cepa de la invención podría prevenir la aparición de enfermedades cuya causa sea el sobrepeso y/o la obesidad, tal como esperaría el experto en la materia.

Aunque el IMC es comúnmente utilizado para determinar si un sujeto padece o no obesidad, existen otros parámetros para ello. La circunferencia de cintura absoluta (el sujeto padece obesidad cuando es >102 cm en hombres [obesidad central] y >88 cm en mujeres) o el índice cintura-cadera (el sujeto padece obesidad cuando es >0,9 para hombres y >0,85 para mujeres) son usados como medidas de obesidad central. Una vía alternativa para determinar la obesidad es medir el porcentaje de grasa corporal (el sujeto padece obesidad cuando tiene aproximadamente >25% de grasa corporal en un hombre y aproximadamente >30% de grasa corporal en la mujer). La obesidad central (tipo masculino u obesidad de cintura predominantemente, caracterizada por un radio cintura cadera alto), es un factor de riesgo importante para el síndrome metabólico, que constituye un cúmulo de alteraciones y factores de riesgo que predisponen fuertemente, pero sin limitarse, a sufrir enfermedad cardiovascular y diabetes Mellitus tipo 2.

Las consecuencias de la obesidad sobre la salud se consideran el resultado de un incremento de la masa grasa en diversas células y tejidos y, además, son el resultado de un estado de inflamación crónica y disfunción del sistema inmunitario que junto a las alteraciones del metabolismo son causa de diversas patologías mencionadas con anterioridad.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para disminuir el crecimiento y la diferenciación del tejido adiposo en sujetos obesos o con sobrepeso, y un estadio anterior al sobrepeso o a la obesidad y, por tanto, se usa para la prevención y/o tratamiento de la hipertrofia de los adipocitos. Tal como se demuestra en el ejemplo 4 y en la FIG. 5, la cepa objeto de la invención reduce el tamaño de los adipocitos, cuyo aumento (hipertrofia) en determinadas etapas de la vida (sobre todo en la infancia y adolescencia) favorece especialmente el desarrollo del sobrepeso y obesidad en la edad adulta y otras complicaciones asociadas. En particular, la administración de la cepa CECT 7765 a animales obesos da lugar a un aumento del número de adipocitos de pequeño tamaño, y a una reducción del número de los de mayor tamaño (Ejemplo 4, FIG. 5).

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para el tratamiento de la esteatosis hepática, también conocida como hígado graso. Tal como se demuestra en el ejemplo 4 de la presente invención, la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 tanto a animales modelo de obesidad como a animales control (no obesos) produce un reducción del número de hepatocitos con alta acumulación de grasa. Globalmente, esto supone que la cepa de la invención reduce la acumulación de grasa en el hígado.

Una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* o la cepa de la invención puede ser usada para el tratamiento o prevención de la esteatosis hepática o hígado graso, definida en un párrafo anterior como una enfermedad asociada a sobrepeso y/o a la obesidad. La presente invención también se refiere a la

5 prevención y/o el tratamiento de patologías relacionadas con la agravación de la esteatosis hepática, como por ejemplo, pero sin limitarse la hepatitis no alcohólica, esteatohepatitis, fibrosis, cirrosis, enfermedad hepática terminal o carcinoma hepático. Además, una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* o la cepa de la invención puede ser usada para éstas u otras patologías que

10 cursan con acumulación de lípidos en el hígado e inflamación, pero que no necesariamente se presentan en sujetos con obesidad o sobrepeso, sino que son consecuencia de otros trastornos. Entre éstos, se incluyen por ejemplo pero sin limitarse; alteraciones nutricionales (por ejemplo pero sin limitarse malabsorción, malnutrición proteocalórica o nutrición parenteral); trastornos

15 metabólicos hereditarios o no hereditarios (por ejemplo pero sin limitarse a diabetes Mellitus tipo 2, abetalipoproteinemia, o deficiencia sistémica de carnitina); enfermedades causadas por la exposición a fármacos (por ejemplo pero sin limitarse a corticoides o ibuprofeno) o tóxicos (por ejemplo pero sin limitarse a alcohol); hepatitis crónica o aguda debida a infecciones; cirrosis;

20 fibrosis; enfermedad hepática terminal; carcinoma hepático; o alteraciones de la hipófisis. En particular, la esteatosis afecta aproximadamente a un 50% de los pacientes con diabetes Mellitus tipo 2.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una

25 cepa de la especie *B. pseudocatenulatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva para la

30 prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por alteraciones en las concentraciones de lípidos en sangre (por ejemplo la dislipemia) y, preferentemente de triglicéridos, respecto de un control, por tanto se usa para

normalizar su concentración en sangre. Preferiblemente el medicamento o composición nutritiva se usan para el tratamiento de dislipemia (sinónimo de dislipidemia). Preferiblemente la dislipemia es hipertrigliceridemia o hipercolesterolemia. La dislipidemia es una condición patológica cuyo único  
 5 elemento común es una alteración del metabolismo de los lípidos, con su consecuente alteración de las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre. La dislipemia puede estar o no asociada a la obesidad y a la ingesta de dietas ricas en grasas y al aumento de su absorción. A su vez, estas alteraciones están relacionadas con un mayor riesgo de enfermedades  
 10 cardiovasculares y diabetes, entre otras patologías. La cepa de la invención tanto en sujetos normales como obesos reduce la absorción de lípidos y los niveles de triglicéridos en sangre demostrando ser eficaz para las aplicaciones descritas, tal y como se demuestra en el Ejemplo 5.

15 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un  
 20 medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para reducir la cantidad de lípidos absorbidos a partir de la dieta, respecto a un control no tratado.

Tal como se muestra en el ejemplo 6, la cepa de la invención reduce el número  
 25 de quilomicrones en los enterocitos intestinales, es decir, reduce la cantidad de grasa de la dieta que es absorbida en más de un 50% (Ejemplo 6; FIG: 7). Los quilomicrones son la forma en la que los lípidos de la dieta son empaquetados y transportados desde el intestino a la linfa y a la sangre para ser utilizados por los tejidos periféricos y, por este mecanismo la cepa administrada limitaría su  
 30 absorción y acumulación en el organismo. La absorción de la grasa en la dieta, además de poder ser causa de sobrepeso y/u obesidad por provocar un incremento de su acumulación en el tejido adiposo, puede ser la causa de otras

patologías sin que se llegue a provocar obesidad, como por ejemplo y sin que limite el alcance de la invención: la aterosclerosis, que se caracteriza por un engrosamiento de la túnica íntima de una arteria con placas donde queda incrustada la grasa, y la dislipemia, caracterizada por alteraciones en las concentraciones en plasma de lípidos (triglicéridos y/o colesterol y lipoproteínas asociadas); patologías asociadas a mayor riesgo cardiovascular; u otras alteraciones derivadas de la relación del metabolismo de lípidos con el de la glucosa (por ejemplo pero sin limitarse a resistencia a insulina o diabetes).

10 Una realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por niveles mayores de glucosa en sangre, respecto de un control, por tanto se usa para disminuir la concentración de glucosa en sangre (hiperglicemia), respecto de un sujeto no tratado.

20 El aumento de glucosa en sangre (hiperglicemia) se puede producir por resistencia a insulina (sujetos que producen suficiente insulina pero el cuerpo no responde normalmente) o por falta de síntesis insulina, con o sin obesidad, debido a otras alteraciones metabólicas o interacciones con fármacos. En el ejemplo 5 de la presente invención se ofrece soporte experimental a esta realización preferida. El término “enfermedad causada por niveles mayores de glucosa en sangre” se refiere a una alteración de la salud causada por concentraciones de glucosa en sangre más elevadas que las que cabría esperarse de un individuo sano con valores normales de glucosa, es decir de aproximadamente entre 72 a 110 mg/dl sangre ó 4 – 7 mmol/l en ayunas, o de aproximadamente <180mg/dl (ó 10 mmol/l) si se mide una hora y media después de las comidas. Dichos valores son valores medios aproximados ya

- que debe tenerse en cuenta la variación experimentada por condiciones propias de cada sujeto. La enfermedad causada por niveles mayores de glucosa en sangre se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, neuropatía (lesión de los nervios de las extremidades y/o de los órganos);
- 5 retinopatía (lesión de la retina en los ojos); nefropatía (lesión del riñón que puede ocasionar insuficiencia renal); enfermedades cardiovasculares (por ejemplo hipertensión o infarto de miocardio); enfermedad cerebrovascular (por ejemplo, la trombosis cerebral).
- 10 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum* o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un
- 15 medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para la prevención y/o tratamiento específico de diabetes. Una realización más preferida se refiere a la prevención y/o tratamiento de diabetes Mellitus tipo 2, patología asociada al sobrepeso y/o a la obesidad, aunque no necesariamente.
- 20 La diabetes Mellitus tipo 2 se caracteriza por el déficit relativo de la producción y sensibilidad a la insulina en los tejidos y, por tanto, una deficiente utilización periférica de glucosa. La diabetes Mellitus tipo 2 representa un 80%-90% de todos los pacientes diabéticos. Se desarrolla a menudo en etapas adultas de la vida, y es muy frecuente su asociación con la obesidad. Varios fármacos y
- 25 otras causas pueden, sin embargo, causar este tipo de diabetes. Por ejemplo, es muy frecuente la diabetes asociada a la toma prolongada de corticoides, frecuentemente asociada a la hemocromatosis no tratada, y la diabetes gestacional no siempre asociada a obesidad.
- 30 Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes

celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para disminuir el crecimiento y la diferenciación del tejido adiposo en sujetos obesos o con sobrepeso, y un estadio anterior al sobrepeso o a la obesidad y, por tanto, se usa para la prevención y/o tratamiento del síndrome metabólico. Se denomina síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas que conjuntamente aumentan el riesgo de diabetes y enfermedad cardiovascular, incluyendo la combinación de obesidad, dislipemia (e.g. trigliceridemia e hipecolesterolemia) e hiperglucemia. Tal y como se demuestra en ejemplos previos, la cepa de la invención es útil para la prevención y tratamiento simultáneo de estas alteraciones y, por tanto, del síndrome metabólico.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a una alteración de la respuesta inmune innata y adaptativa, respecto a la de sujetos control, por tanto se usa para mejorar la función del sistema inmune innato y adaptativo, respecto de un sujeto no tratado. Esta patología es preferentemente el sobrepeso, la obesidad y los desórdenes asociados que conllevan una alteración de estas funciones inmunitarias. En el ejemplo 3 se muestran datos experimentales a este respecto.

El término “enfermedad asociada a la disminución de la respuesta inmune innata y adaptativa” se refiere a enfermedades que cursan con una inmunodepresión de la función del sistema inmune innato y adaptativo.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenuatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada con una mayor producción de proteínas pro-inflamatorias, preferiblemente, la producción de las mismas a nivel periférico y central, respecto de un control. En el ejemplo 2 y ejemplo 3 se muestran datos experimentales a este respecto.

Ejemplos de proteínas pro-inflamatorias son, pero sin limitarse, son citoquinas y quimioquinas y adipokinas. Preferiblemente las proteínas pro-inflamatorias se seleccionan de la lista que comprende, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-16, TNF-alfa o MCP1 y leptina, o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente las proteínas pro-inflamatorias se seleccionan de la lista que comprende TNF-alfa, IL-6, MCP1 y leptina o cualquiera de sus combinaciones.

El término “enfermedad asociada con una mayor producción de proteínas pro-inflamatorias” se refiere a enfermedades que son causadas por al menos la producción de una proteína implicada en la inflamación (pro-inflamatorias) de diversos tipos de tejidos. Algunas de las enfermedades asociadas con una mayor producción de proteínas pro-inflamatorias son también asociadas al sobrepeso y/o a la obesidad como por ejemplo, pero sin limitarse la diabetes tipo-2, diabetes gestacional, síndrome metabólico, hígado graso, hepatitis no alcohólica, hipertensión, dislipemia, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, esteatohepatitis, o cáncer. Otras enfermedades asociadas con una mayor producción de proteínas pro-inflamatorias no están asociadas al sobrepeso y/o a la obesidad o pueden presentarse en ausencia de obesidad como por ejemplo, pero sin limitarse las mencionadas anteriormente (por ejemplo, diabetes) y otras como la inflamación alérgica.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para reducir la concentración de leptina en un sujeto obeso y/o para aumentar la concentración de dicha hormona en un sujeto no obeso, respecto de un control no tratado; o se usa para la reducción de la ingesta, y el aumento del gasto energético, en un sujeto no obeso respecto de un sujeto control no tratado. En el sujeto no obeso el incremento en leptina da lugar a la reducción de la ingesta, y al aumento del gasto energético y la oxidación lipídica. En el sujeto obeso, por el contrario, la reducción de la concentración de leptina contribuye a la normalización de las alteraciones metabólicas y la reducción de la inflamación. se usa para la reducción de la ingesta, y el aumento del gasto energético, en un sujeto no obeso respecto de un sujeto control no tratado.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al uso de una cepa de la especie *B. pseudocatenulatum*, o de la cepa de la invención; o de la combinación de microorganismos de la invención; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones; o de la composición de la invención; para la fabricación de un medicamento o para la fabricación de una composición nutritiva, para el para restablecer la composición de la microbiota intestinal, o para reducir la concentración de enterobacterias en el contenido intestinal. En una realización aún más preferida, el restablecimiento de la composición de la microbiota intestinal, o la reducción de la concentración de enterobacterias en el contenido intestinal, se lleva a cabo en un sujeto con sobrepeso, obesidad o cualquier patología asociada con las mismas.

30

El restablecimiento de la microbiota intestinal se puede basar, por ejemplo y sin limitar, en la reducción de la concentración de enterobacterias en el contenido

intestinal así como en el aumento de bifidobacterias y/o lactobacilos, respecto de un control no tratado. Tal como puede observarse en el ejemplo 3.6, la administración de la cepa de la invención da lugar a un aumento de la concentración de bifidobacterias totales de al menos 1 unidad logarítmica en el colon y a una reducción de la concentración de bacterias potencialmente inflamatorias como las enterobacterias en al menos 0.5 unidades logarítmicas. Este hecho también implica una reducción de las señales pro-inflamatorias que pueden transmitirse desde el intestino a tejidos periféricos (por ejemplo el hígado) que pueden estar afectados en sujetos obesos o no obesos por diversas patologías.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 20 DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**FIG. 1. Muestra el efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos durante 7 semanas, en el estallido respiratorio de macrófagos implicado en la fagocitosis.**

ND, animales control con dieta estándar; HFD, dieta rica en grasa; HFD+P, dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.

**30 FIG. 2. Muestra el efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos durante 7 semanas, sobre la función de macrófagos en la síntesis**

**de citoquinas (TNF-alpha) frente a diversos estímulos (lipopolisacárido [LPS] y heces).**

5 ND, animales control con dieta estándar; HFD, con dieta rica en grasa; HFD+P, con dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765. Barras negras: control; gris claro: LPS; gris oscuro: heces.

**FIG. 3. Muestra el efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos durante 7 semanas, en la interacción de las células dendríticas con células T y su capacidad de proliferación.**

15 Los linfocitos T CD4+ (L) fueron incubados con células dendríticas (DC) maduras de distintos grupos experimentales de ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos a los que se les administró la cepa ( $10^8$  ufc/día) durante 7 semanas. La relación de células (L/DC) en la mezcla fue 1:1, 1:2 y 1:4.

20 ND, animales control con dieta estándar; HFD, con dieta rica en grasa; HFD+P, con dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.

**FIG. 4. Muestra el efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos durante 7 semanas, en la función de células dendríticas en la síntesis de citoquinas frente a diversos estímulos (LPS y heces).**

25 ND, animales control con dieta estándar; HFD, con dieta rica en grasa; HFD+P, con dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.

**FIG. 5. Muestra el efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos durante 7 semanas, sobre el desarrollo de los adipocitos, clasificados por intervalos de tamaño.**

ND, animales control con dieta estándar; HFD, con dieta rica en grasa; HFD+P, con dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.

**FIG. 6. Efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos durante 7 semanas, sobre el desarrollo de esteatosis (acumulación de lípidos en el hígado).**

Se muestra el número de hepatocitos grasos en función del grado de acumulación de grasa en la célula en un corte histológico de tejido hepático teñido con eosina hematoxilina.

ND, animales control con dieta estándar; HFD, con dieta rica en grasa; HFD+P, con dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.

**FIG. 7. Efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos durante 7 semanas, sobre el número de quilomicrones formados en los enterocitos en cortes histológicos teñidos con eosina-hematoxilina.**

HFD, animales con dieta rica en grasa; HFD+P, con dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.

**FIG. 8. Muestra el efecto de la administración de la cepa *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 ( $10^8$  ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=6/grupo) obesos y controles durante 7 semanas, sobre la concentración de leptina en sangre periférica.**

L, Leptina expresada en pg/ml; HFD, animales con dieta rica en grasa; HFD+P, con dieta rica en grasa + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765; SD, animales con dieta estándar; SD+P animales con dieta estándar + *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.

**FIG. 9. Identificación de la especie de la cepa de la invención por electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE).**

La columna M1 muestra diferentes bandas Bx que corresponden con fragmentos de ADN de los microorganismos de referencia indicados a continuación: B1 es *B. adolescentis* LMG 11037T; B2 es *B. angulatum* LMG 11039T; B3: *B. longum* subsp. *infantis* CECT4551T; B4: *B. pseudocatenulatum* CECT 5776; B5: *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140T.

En la columna M2: B6 es *B. bifidum* LMG 11041T; B7 es *B. longum* subsp. *longum* CECT 4503T ; B8 es *B. catenulatum* LMG 11043T ; B9 es *B. dentium* CECT 687 ; B10 es *B. animalis* subsp. *animalis* LMG 10508T.

En la columna I1: la banda muestra Cepa de la invención CECT 7765

15

**EJEMPLOS**

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores. Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos no pretenden limitar el campo de aplicación de la misma.

25

**EJEMPLO 1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA *B. pseudocatenulatum* CECT 7765.**

Se procedió al aislamiento de cepas del género *Bifidobacterium* a partir de heces de lactantes sanos que no hubieran ingerido alimentos que contuvieran bifidobacterias durante al menos el mes anterior al análisis y que no hubieran sido sometidos a tratamientos con antibióticos. Las muestras se mantuvieron a 4° C y

30

se analizaron sin que transcurrieran más de dos horas desde su recogida. Dos gramos de cada una de ellas se diluyeron en tampón fosfato 10 mM conteniendo una concentración de NaCl de 130 mM (PBS) y se homogeneizaron en un *stomacher Lab-Blender 400* (Seward Medical, Londres, UK), durante 3 minutos y se diluyeron en agua de peptona. Alícuotas de 0,1 ml de diversas diluciones decimales se inocularon en MRS agar (de *Man Rogosa and Sharpe*; Scharlau, Barcelona) conteniendo un 0,05% de cisteína (Sigma, St. Louis, MO; MRS-C), y 80 µg/ml de mupirocina. Tras una incubación de 48 h a 37 °C en condiciones de anaerobiosis (*AnaeroGen*, Oxoid, UK) se seleccionaron colonias aisladas y su identidad se confirmó por estudio de su morfología bajo tinción de Gram. La identidad de los aislados se confirmó por secuenciación del gen del ARN 16S a partir de ADN total. El fragmento secuenciado se amplificó utilizando los cebadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3': SEQ ID NO: 2) y 1401r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3': SEQ ID NO: 3) y se purificó utilizando el sistema comercial GFX<sup>TM</sup>PCR (Amershan, Bioscience, UK). Para la secuenciación se emplearon además los cebadores 530f (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG-3': SEQ ID NO: 4) y U-968f (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3': SEQ ID NO: 5), de acuerdo con los procedimientos descritos por otros autores (Gerhard *et al.*, 2001. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 504-513; Satokari *et al.*, 2001. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504-513; Favier *et al.*, 2002. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 219-22). La secuenciación se realizó utilizando un secuenciador automático de ADN ABI 3700 (*Applied Biosystem, Foster City, CA*).

La secuencia de 1,28 kb del gen del ARN ribosómico 16S de la cepa CECT 7765 es SEQ ID NO: 1. La búsqueda de secuencias más próximamente relacionadas se realizó en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990. *J. Mol Biol.*, 215: 403-410).

De acuerdo con la comparación de SEQ ID NO: 1 con respecto a las secuencias más similares, se obtuvo una identidad de 99 % con respecto a otras bacterias de la especie *B. pseudocatenulatum* (por ejemplo con respecto a la cepa *B. pseudocatenulatum* B1279 (nº de acceso del GeneBank

NR\_037117.1). Estos resultados indican que la cepa de la presente invención puede pertenecer muy probablemente a dicha especie.

La identificación de la especie también se confirmó por DGGE tal y como se describe en un estudio previo (Satokari et al., 2001. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 504-513). La secuencia del gen del ARNr 16S (520 pbb) se amplificó con los cebadores Bif164 y Bif662-GC y los fragmentos amplificados se separaron en un equipo de electroforesis *Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad, Richmond, CA). En el gel se estableció un gradiente desnaturalizante del 45-55%, en el que el 100% se correspondió con una concentración de urea del 7 M y de formamida del 40% (vol/vol). La movilidad electroforética se comparó con cepas de colección utilizadas como referencia de cada especie.

Como se muestra en la FIG. 9, la movilidad electroforética de la banda de la cepa de la invención (Carrera del gel I1: *B. pseudocatenulatum* CECT 7765) coincide con la de otra cepa de la misma especie utilizada como referencia (*B. pseudocatenulatum* CECT 5776).

La cepa de la invención se tipó molecularmente mediante análisis por RAPDs utilizando los cebadores M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3': SEQ ID NO: 6) y Del (5'-CCGCAGCCAA-3': SEQ ID NO: 7) y de acuerdo con la metodología descrita con anterioridad (Hoffmann et al., 1998. *Zentralbl Bakteriologie*. 288, 351-60; Svec et al. 2010. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 98: 85-92). Los perfiles de los fragmentos de ADN amplificados de forma aleatoria demostraron que la cepa objeto de la invención (*B. pseudocatenulatum* CECT 7765) es diferente de otras cepas de la misma especie.

**EJEMPLO 2. SELECCIÓN DE LA CEPA *B. pseudocatenuatum* CECT 7765 EN FUNCIÓN DE SU CAPACIDAD PARA MODULAR *in vitro* LA RESPUESTA DE MACRÓFAGOS IMPLICADOS EN LA INFLAMACIÓN CRÓNICA DE BAJO GRADO.**

5

**2.1. Preparación de los cultivos y sobrenadantes de bacterias intestinales.**

Las cepas se inocularon en 10 ml de caldo MRS (*Scharlau Chemie S.A.*,  
10 Barcelona, España), conteniendo un 0,05% de cisteína (MRS-C), al 1% con un cultivo de 24 h y se incubaron durante 22 h a 37°C en anaerobiosis. (*AnaeroGen; Oxoid, Basingstoke, UK*). Las células se recogieron por centrifugación (6,000 g, 15 minutos), se lavaron dos veces en PBS (10 mM fosfato de sodio, 130 mM cloruro de sodio, pH 7.4), y se re-suspendieron en PBS conteniendo un 20% de glicerol.  
15 Alícuotas de estas suspensiones se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C. El número de células viables tras el ciclo de congelación-descongelación se determinó mediante recuento en placas de agar MRSC tras incubar durante 48 h. La viabilidad fue superior al 90% en todos los casos. Cada alícuota se utilizó para un solo ensayo. A fin de evaluar los efectos de bacterias  
20 muertas, algunas de las alícuotas se inactivaron por frío (3 ciclos de congelación a -20°C y descongelación) y por calor (30 minutos a 80°C). Los valores de pH de los sobrenadantes obtenidos se ajustaron a 7.2 con NaOH y se esterilizaron por filtración (0.22-µm tamaño de poro, *Millipore, Bedford, MA*) para eliminar la posible presencia de células viables. Alícuotas de los sobrenadantes libres de células se  
25 conservaron a -80°C hasta su uso.

**2.2. Cultivo y estimulación de macrófagos.**

Células de la línea celular de macrófagos murinos Raw 264.7 se crecieron en  
30 medio *Dulbecco's modified Eagle* (DMEM, Sigma, USA), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España), estreptomycin (100 µg/ml, Sigma) y penicillina (100 U/ml, Sigma). Para realizar los experimentos de

estimulación, las células se incubaron a una concentración de  $10^6$  células/ml en placas de poliestireno de fondo plano de 24 pocillos (*Corning*, Madrid, España) a  $37^\circ\text{C}$ , al 5% de  $\text{CO}_2$ . Como estímulo se utilizaron suspensiones de bacterias vivas y muertas de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, y volúmenes de  
 5 sobrenadantes de 150  $\mu\text{l}$ . Como control positivo se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Como control negativo se ensayó la producción de citoquinas en PBMCs no estimuladas. Cada tipo de estímulo fue ensayado por duplicado en cada experimento. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron por centrifugación,  
 10 se fraccionaron y se almacenaron en alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta la detección de citoquinas y quimioquinas.

### 2.3. Determinación de citoquinas y quimioquinas.

15 Las concentraciones de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL10 y MCP1) de los sobrenadantes se midieron mediante kits ELISA (*BD Biosciences*, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

La cepa objeto de la invención se seleccionó entre otras de los géneros  
 20 *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* por su capacidad para inducir bajas concentraciones de moléculas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) y quimiotácticas (MCP1) implicadas en la migración de macrófagos al tejido adiposo y en el estado de inflamación crónica asociado a la obesidad que provoca resistencia a la acción de la insulina y leptina (Tabla 1). La cepa CECT 7765 fue la que indujo la  
 25 producción de menor concentración de TNF- $\alpha$ , IL-6 y una de las dos cepas que indujeron menor producción de MCP1 (Tabla 1). La cepa de la invención también se seleccionó por inducir la síntesis de altas concentraciones de citoquinas anti-inflamatorias y reguladoras (IL-10, Tabla 2) por macrófagos, que pueden contribuir a reducir la inflamación en el contexto de la obesidad (Tabla 2). Las propiedades  
 30 inmunológicas de la bacteria seleccionada no son comunes a todas las bacterias intestinales de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, ni tampoco a las de otras cepas de la misma especie y, por tanto, la hacen especialmente idónea para

su aplicación en el tratamiento y prevención del sobrepeso, la obesidad y las alteraciones asociadas, así como de otras enfermedades según se ha comentado en apartados precedentes.

- 5 El aumento de la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP1 se ha asociado al sobrepeso, la obesidad y las patologías relacionadas, pero no solamente se asocia a dichas patologías sino a cualquier patología causada por un incremento de TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP1 respecto de un control, tal como se ha descrito en párrafos anteriores de la descripción.

**TABLA 1. Ejemplo del efecto de la estimulación con células viables de diversas cepas bacterianas en la síntesis de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias por macrófagos.**

Estímulo	TNF-alpha		IL6		MCP1	
	(pg/ml)		(pg/ml)		(pg/ml)	
<b><i>Lactobacillus</i></b>	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<i>L. plantarum</i> 850	4543,8	2238,2	135,7	2,1	1174,0	22,3
<i>L. plantarum</i> v299	4785,1	2643,5	93,8	3,3	1013,1	23,3
<i>L. plantarum</i> Bif L1	7993,4	3725,8	352,3	20,5	3187,2	32,9
<i>L. reuteri</i> Lac A8	3389,6	415,4	38,4	4,5	1297,1	108,2
<i>L. casei</i> 2E11	3159,6	1412,3	37,6	3,4	808,0	25,0
<i>L. casei</i> AD	1523,9	994,1	23,8	9,2	378,4	31,5
<i>L. casei</i> ATCC 393	4943,1	3150,8	134,8	26,7	1013,1	23,3
<i>L. ruminis</i> ATCC27780	12854,0	941,4	355,9	6,5	14455,0	41,4
<b><i>Bifidobacterium</i></b>						
<i>B. catenulatum</i>						
LMG 10437	5812,7	522,5	121,2	22,5	2575,3	52,6
<i>B. pseudocatenulatum</i>						
CECT 5776	5037,5	3143,1	11,4	3,6	3070,1	133,0
<i>B. pseudocatenulatum</i>						
CECT 7765	1019,3	374,6	12,3	4,8	378,4	31,5
<i>B. longum</i> F1	8141,8	1171,1	41,5	13,5	3082,6	16,6
<i>B. longum</i> BB536	2586,2	1319,7	47,9	4,5	444,1	4,0

5 Nota: Se han sombreado los datos correspondientes a la cepa de la invención.

**TABLA 2. Ejemplo del efecto de la estimulación con células viables de diversas cepas bacterianas en la síntesis de la citoquina anti-inflamatoria y reguladora IL-10 por macrófagos.**

Estímulo	IL-10 (pg/ml)	
	Media	SD
<i>Bifidobacterium</i>		
<i>B. catenulatum</i>		
LMG 10437	42,7	5,5
<i>B. pseudocatenulatum</i>		
CECT 5776	24,5	3,5
<i>B. pseudocatenulatum</i>		
CECT 7765	117,5	10,3
<i>B. longum</i> F1	31,7	6,1
<i>B. longum</i> BB536	61,3	7,9

Nota: Se han sombreado los datos correspondientes a la cepa de la invención.

5

**EJEMPLO 3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CEPA *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 SOBRE LA FUNCIÓN DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO; SOBRE PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS Y ENDOCRINOS EN SANFRE PERIFÉRICA Y EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL; Y SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SUS PROPIEDADES INFLAMATORIAS.**

10

### **3.1. Preparación de cultivos de la cepa objeto de la invención.**

15 La cepa CECT 7765 se creció en caldo MRS (*Scharlab*, SL- Barcelona, España) suplementado con 0,05 % (p/v) cisteína a 37 °C en anaerobiosis (*AnaeroGen*; *Oxoid*, *Basingstoke*, UK) durante 22 h. Las células se recogieron por centrifugación (6.000 g durante 15 minutos), se lavaron con solución salina fosfato (PBS, 10 mM fosfato sódico, 130 mM cloruro sódico, pH 7.4), y se re-suspendieron en leche

20 desnatada al 10%. Alícuotas de estas suspensiones se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su uso. La viabilidad de las bacterias se

comprobó por recuento en placas de agar MRS con 0.05% cisteína tras 48 horas de incubación y fue aproximadamente del 90%. Cada alícuota se descongeló una sola vez.

### 5           **3.2. Modelo animal de obesidad y toma de muestras.**

Se utilizaron ratones C57BL-6 machos adultos (6–8 semanas; *Harlan* Laboratorios). Los animales se mantuvieron a temperatura controlada (23°C), con un ciclo de 12-h de luz/oscuridad y en una atmósfera de un 40–50% de humedad  
10 relativa. Los ratones C57BLACK6 abreviada como C57BL-6 o *black 6*, es la cepa endogámica de ratón de laboratorio más ampliamente usada para ser manipulada genéticamente en el estudio de las enfermedades humanas.

Los grupos de animales obesos se generaron por medio de una alimentación con  
15 una dieta rica en grasa (HFD) que proporcionó el 60% de la energía en forma de lípidos (60/Fat, Harlan Laboratories) durante 7 semanas, mientras que a los no obesos se les administró una dieta convencional. Los ratones tuvieron acceso libre al agua y a la dieta. El peso se monitorizó semanalmente. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del comité de ética animal.

20 Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n=6/grupo): alimentados con una dieta convencional (controles), controles a los que se les administró la cepa objeto de la invención (controles-cepa), alimentados con una dieta rica en grasa (obesos) y obesos a los que se administró la cepa CECT 7765 (obesos-  
25 cepa). La cepa se administró a una dosis diaria de  $10^8$  ufc/día mediante sonda intragástrica durante 7 semanas. A los grupos controles y obesos se les administró agua del mismo modo como placebo.

Tras este tiempo, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación  
30 cervical y se tomaron diversas muestras biológicas. En sangre periférica se determinaron los parámetros inmunológicos (citoquinas, adipoquinas y quimioquinas) mediante el uso de ELISA. La concentración de citoquinas

inflamatorias (TNF-alfa) también se determinó en el sobrenadante de muestras de cerebro previamente homogeneizadas con un politrón mediante un ensayo ELISA, tal como se ha descrito en el apartado anterior. También se tomaron muestras de heces para determinar el efecto de la administración de la cepa en la composición de la microbiota y su efecto estimulador de respuestas inmunológicas en cultivos *in vitro* de macrófagos, células dendríticas y células T obtenidas como se describe a continuación.

### 3.3. Evaluación del efecto en macrófagos.

10

A fin de demostrar el efecto de la administración de la cepa CECT 7765 en la mejora de la respuesta de células del sistema inmunitario innato, se obtuvieron macrófagos asépticamente inyectando por vía intraperitoneal la solución *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) (*Sigma*<sup>TM</sup>– St. Louis, MO/USA), suplementada con un 10% de suero fetal bovino inactivado a 56°C durante 30 minutos (Gibco, Barcelona, España), 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml de penicilina (*Sigma Chemical Co.*). Los macrófagos obtenidos de cada grupo experimental de ratones se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml en medio DMEM y tras su incubación durante 1 h a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, los pocillos se lavaron con DMEM sin suero para eliminar las células no adheridas. Las células adheridas se incubaron durante 24 h y, tras este período, se estimularon con heces (dilución 1/9 en PBS) de cada grupo experimental de ratones y con 1 µg/ml de LPS de *Salmonella typhimurium* (Sigma Chemical Co, Madrid, España) como control positivo. En paralelo se evaluaron macrófagos no estimulados a fin de conocer la producción basal de citoquinas. Tras la estimulación, se recogieron los sobrenadantes y en ellos se determinaron las concentraciones de las siguientes citoquinas: TNF-α, IL6 y IL-10 por ELISA (*Ready SET Go! Kit, BD Bioscience, San Diego, CA, USA*).

15

20

25

### 3.4. Evaluación del efecto en células dendríticas y células T.

A fin de demostrar el efecto de la administración de la cepa objeto de la invención en la mejora de la capacidad de células dendríticas de estimular la respuesta de linfocitos T y, por tanto, de la respuesta inmunitaria adaptativa, se determinó la capacidad de células dendríticas maduras para inducir la respuesta proliferativa de linfocitos T CD4+ en una reacción linfocitaria mixta. El ensayo se realizó comparando las respuestas de las células extraídas de ratones obesos y controles a los que se les suministró o no la cepa objeto de la invención tal como se ha descrito anteriormente.

Las células dendríticas fueron generadas a partir de médula ósea de tibias y fémur de los ratones. Las tibias y fémures de cada ratón fueron extraídas y el tejido circundante fue eliminado asépticamente. Tras cortar los extremos, la médula ósea fue extraída haciéndola fluir con PBS, utilizando una jeringa y aguja de 0,45 mm de diámetro. Las células obtenidas fueron lavadas una vez con PBS y alícuotas de  $10^6$  células diluidas en RPMI, suplementado con antibióticos (Penicilina 100IU/ml y estreptomycin 100µg/ml), 10% SFB y 20 ng/ml de GM-CSF de ratón, fueron sembradas en botellas de 100mm. Al tercer día, se adicionaron 10 ml de medio de cultivo y al séptimo día, el medio fue reemplazado por medio fresco. Al octavo día las células no adheridas fueron cosechadas mediante pipeteo suave. Las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en medio de cultivo sin GM-CSF de ratón.

Las células dendríticas (CD) se activaron adicionando LPS (100ng/ml) durante 24 h antes de realizar la reacción linfocitaria mixta. Las CD maduras fueron usadas para estimular linfocitos T CD4+. Los LT CD4+ fueron aislados de bazos de ratones C57BL/6 de 7-8 semanas de edad. Tras ser extirpados, los bazos fueron suspendidos en PBS con SFB y pasados a través de una maya de nylon, la suspensión celular obtenida fue lavada una vez y resuspendida en un tampón de lisis durante 5 minutos. Después de dos lavados con PBS, las células T (CT) CD4+ fueron separadas inmunomagnéticamente por selección positiva con *microbeads*

L3T4-CD4+ (*Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5 Para realizar la reacción linfocitaria mixta, se distribuyeron alícuotas de CD en placas de 96 pocillos por triplicado para estimular, en cada caso,  $1 \times 10^5$  linfocitos T CD4+ (L) en las siguientes relaciones (L/CD): 1:1, 1:2, 1:4 en 100  $\mu$ l de medio de cultivo y se incubaron a 37°C durante 72 h, en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Como controles se usaron CD y LT CD4+ con y sin ConA (5 $\mu$ g/ml; Sigma), utilizada como mitógeno. La proliferación de linfocitos se determinó con un kit ELISA (BrdU-  
10 colorimetric assay; Roche, Diagnostic, Germany) y se cuantificó midiendo la absorbancia a 440 nm.

La cepa de la invención mejora el funcionamiento de células del sistema inmunitario innato y adaptativo cuando se administra *in vivo* a sujetos con obesidad  
15 inducida por la dieta, incrementando su capacidad para responder a agentes infecciosos, antígenos o alérgenos. En particular, la administración de la cepa a animales modelo de obesidad inducida por una dieta rica en grasa mejora, entre otras, la función de los macrófagos en la fagocitosis y en la síntesis de citoquinas (FIG. 1 y 2). La administración de la cepa incrementa el estallido respiratorio de  
20 macrófagos peritoneales en respuesta a un estímulo o alérgeno extraño (levadura/patógeno), mejorando la capacidad fagocítica y por tanto las defensas inmunológicas (FIG. 1). Esta capacidad está disminuida significativamente en animal obesos respecto los controles no obesos (FIG. 1). Estudios precedentes también demuestran que el estallido respiratorio de células fagocíticas responsable  
25 de la eliminación de patógenos también está alterado en sujetos con diabetes (Marhoffer *et al.*, 1992. *Diabetes Care*, 15(2): 256-60). Además, el cultivo de macrófagos peritoneales extraídos de animales obesos y controles y su estimulación *in vitro* con el lipopolisacárido (LPS) de un patógeno, demuestra que la administración de la cepa objeto de la invención mejora la síntesis de citoquinas  
30 responsables de detener una posible infección como el TNF- $\alpha$  (FIG. 2). La cepa objeto de la invención también mejora la función de las células dendríticas y células T cuando se administra *in vivo*. Las células dendríticas extraídas de ratones obesos

a los que se ha administrado la cepa, incubadas en presencia de células T en diversas proporciones (1:1, 1:2 y 1:4), incrementan su capacidad de proliferación y activación, propiedades que están disminuidas en los animales obesos a los que no se ha administrado la cepa (FIG. 3). El mejor funcionamiento de las células dendríticas en los animales obesos a los que se administró la cepa también se pone de manifiesto porque tras su estimulación con LPS *in vitro* son capaces de inducir mayor secreción de citoquinas implicadas en la respuesta a patógenos (por ejemplo TNF- $\alpha$ ) (FIG. 4). Estas propiedades de la cepa objeto de la patente la hacen idónea ya que la funcionalidad de células dendríticas y células T está alterada en la obesidad y enfermedades asociadas como la diabetes. En particular las células dendríticas presentan alteraciones funcionales asociadas al aumento de peso, caracterizadas por una reducción de su capacidad para presentar antígenos y estimular las células T alogénicas (Macia *et al.*, 2006. *J Immunol.*, 177(9): 5997-6006; Verwaerde *et al.*, 2006. *Scand J Immunol.*, 64(5): 457-66). Las propiedades pro-inflamatorias de las células T *naive* ante un estímulo (mitógeno o antígeno) están incrementadas, pudiendo contribuir al estado inflamatorio crónico de bajo grado asociado a la obesidad; y, por el contrario, las células T previamente expuestas a antígenos presentan un defecto en la proliferación y secretan preferentemente citoquinas de tipo Th2. Todo ello explica la alta incidencia de infecciones en sujetos obesos y la falta de respuesta a vacunación y a infecciones mediada por células T de memoria (Karlsson *et al.*, 2010. *J Immunol.*, 184: 3127-33). La función de células T también es deficiente en diabéticos, mostrando reducida capacidad para proliferar en respuesta a un estímulo y para sintetizar IL2 (Chang y Shaio. 1995. *Diabetes Res Clin Pract.*, 28(2): 137-46).

25

La cepa de la invención administrada *in vivo* regula la producción de citoquinas, quimioquinas y adipoquinas, cuya síntesis está alterada en la obesidad y las enfermedades asociadas en sangre periférica. Entre los cambios inducidos en animales modelo de obesidad y controles se incluye la reducción de las concentraciones de la citoquina inflamatoria TNF- $\alpha$ . En animales obesos se produce una reducción de la adipoquina leptina, aumentada en la obesidad y que pueden contribuir al proceso inflamatorio. Sin embargo en animales controles la

30

cepa induce la síntesis de leptina que contribuye a reducir la ingesta, aumentar el gasto energético y la oxidación lipídica y prevenir el sobrepeso y la obesidad.

**3.5. Evolución del efecto sobre la concentración de citoquinas inflamatorias en el cerebro.**

La cepa objeto de la invención también reduce significativamente la síntesis de TNF- $\alpha$  en el sistema nervioso central, cuya síntesis está incrementada en la obesidad y contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina y a la leptina, inhibiendo sus efectos anorexigénicos (reducción de la sensación de hambre) y su función en la regulación del peso corporal y el metabolismo de glucosa (De Souza *et al.*, 2005. *Endocrinology.*, 146: 4192-9).

**3.6. Evaluación del efecto en la composición de la microbiota intestinal y sus propiedades inflamatorias.**

La cepa CECT 7765 restablece la composición de la microbiota intestinal, normalizando las alteraciones asociadas al sobrepeso y/o la obesidad y el efecto inflamatorio que causan estas alteraciones, así como las alteraciones asociadas a otras condiciones patológicas no asociadas únicamente al sobrepeso y/o la obesidad. La administración de la cepa de la invención aumenta el número de lactobacilos y de bifidobacterias y reduce el de enterobacterias en el contenido intestinal al menos en media unidad logarítmica. Estos cambios en la composición de la microbiota se traducen adicionalmente en una reducción de las propiedades pro-inflamatorias y en un aumento de las propiedades anti-inflamatorias de la misma. Tanto en macrófagos como en células dendríticas, la microbiota de los animales obesos a los que se les administra la cepa induce menor síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , y mayor de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 que la de los animales obesos a los que no se les administra la cepa (Ejemplo 3; FIG. 2 y 4). Las alteraciones de la microbiota intestinal se consideran uno de los posibles estímulos inflamatorios causantes de aumento de peso, resistencia

a insulina, obesidad y diabetes (Cani y Delzenne 2009. *Curr Opin Pharmacol.*, 9(6): 737-43), además, dichas alteraciones causan otro tipo de condiciones patológicas.

5 **TABLA 3. Ejemplo del efecto de la administración de la cepa en la composición de la microbiota intestinal de animales obesos.**

Grupo bacteriano	Obesos (n=6)		Obesos+ CECT 7765		<sup>2</sup> Valor P
	<sup>1</sup> Mediana	IQR	<sup>1</sup> Mediana	IQR	
Bacterias totales	8,9	8,-9,2	9,0	8,8-9,1	0.855
<i>Lactobacillus</i>	7,9	7,7-8,0	8,3	8,1-8,6	0.004*
<i>Bifidobacterium</i>	5,4	5,2-5,8	8,2	7,8-8,7	0,011*
<i>Enterobacteriaceae</i>	6,6	6,3-6,7	6,0	5,8-6,4	0,035*

<sup>1</sup>Datos expresados en log nº de copias del gen del ARNr 16 S/ mg de heces (mediana, intercuartil).

10 <sup>2</sup>Diferencias estadísticamente significativas establecidas a un valor de \*P <0.050 aplicando el test de Mann-Whitney.

**EJEMPLO 4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CEPA *B. pseudocatenuatum* CECT 7765 EN TEJIDO ADIPOSO E HÍGADO.**

15 Se utilizaron los mismos ratones descritos en el ejemplo 3 y los mismos grupos experimentales a dos de los cuales se les administró la cepa objeto de la invención siguiendo la misma pauta. Tras el tiempo de tratamiento, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical y se tomaron muestras de tejido adiposo (epididimal) y hepático, que fueron lavadas con solución salina y  
20 fijadas en un tampón con un 10% de formalina, embebidas en parafina, y cortadas en secciones de 4-5 µm, que fueron teñidas con eosina hematoxilina. La severidad de la esteatosis (acumulación de lípidos en el hígado) se determinó analizando 10 campos de cada sección fijada con microscopio óptico de campo claro (Olympus), según la siguiente escala: grado 1 (sin esteatosis); grado 2, cuando la grasa del los  
25 hepatocitos ocupaba menos del 33% de la célula; grado 3, cuando la grasa del los hepatocitos ocupaba entre el 34-66% de la célula; grado 4, cuando la grasa del los

hepatocitos ocupaba más del 66% de la célula. El tamaño de los adipocitos se midió mediante análisis de imagen con el uso del software *NIS Elements BR 2.3*, evaluando un mínimo de 100 células por cada grupo experimental y tipo de tejido.

5 La cepa objeto de la invención reduce el tamaño de los adipocitos en el tejido epididimal cuyo aumento (hipertrofia) en determinadas etapas de la vida (infancia y adolescencia) favorece el desarrollo del sobrepeso y obesidad en la edad adulta y está asociado a un desequilibrio positivo entre la ingesta y el gasto energético (Macia *et al.*, 2006. *Genes Nutr.*, 1: 189-212). Por el contrario, la reducción en el  
 10 tamaño de los adipocitos está relacionada con la reducción de la resistencia a insulina y de las concentraciones de glucosa (Varady *et al.*, 2009. *Metabolism* 58: 1096-101). En particular, la administración de la cepa objeto de la invención *in vivo* a animales modelo de obesidad da lugar a un aumento de adipocitos de pequeño tamaño, en el rango entre 1,000 y 2000  $\mu\text{m}^2$ , mientras que en los animales obesos,  
 15 a los que no se les ha administrado la cepa, se produce un aumento de los adipocitos de mayor tamaño, en el rango entre 4000 y 6000  $\mu\text{m}^2$  (FIG. 5). Un efecto similar se observa en animales no obesos.

El aumento del tamaño de los adipocitos también está relacionado con el  
 20 aumento del aporte de ácidos grasos al hígado, que da lugar a esteatosis hepática y sus complicaciones, de modo que la cepa puede asimismo contribuir a evitar o mejorar estas alteraciones. Por tanto, la cepa *B. pseudocatenuatum* CECT 7765 reduce el tamaño de los adipocitos, es decir, es útil para el tratamiento de alteraciones en el desarrollo de este tipo de células que conduce  
 25 a su hipertrofia, que mantenida en el tiempo puede provocar sobrepeso y obesidad, así como otras patologías no necesariamente asociadas a la obesidad.

La cepa objeto de la invención reduce el acumulo de grasa en el hígado  
 30 (esteatosis) asociado a la ingesta de dietas ricas en grasa, a la obesidad y a diversas patologías como la hepatitis no alcohólica (Musso *et al.*, 2010. *Hepatology* 52: 79-104). En particular, la administración de la cepa objeto de la invención *in*

vivo a animales modelo de obesidad da lugar a una reducción de hepatocitos de grado 4 con alta acumulación de grasa (ocupa más del 66% de la célula), y un aumento de los hepatocitos de grado 3 con menor contenido en grasa (ocupa el 34-66% de a célula), mientras que en animales obesos a los que no se le ha administrado la cepa el efecto es inverso. En animales controles, la administración de la cepa produce un aumento de hepatocitos de grado 2 (la grasa ocupa menos del 33% del hepatocito) a expensas de los de grado 3, a la inversa de lo que ocurre en animales que no han recibido la cepa (FIG. 6).

10 **EJEMPLO 5. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CEPA *B. pseudocatenuatum* CECT 7765 EN LAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, INSULINA, TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL EN SANGRE PERIFÉRICA.**

Se utilizaron los mismos ratones descritos en el ejemplo 3 y los mismos grupos experimentales a dos de los cuales se les administró la cepa de la invención siguiendo la misma pauta. Tras el tiempo de tratamiento, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical y se tomaron muestras de sangre periférica para la determinación de la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol mediante métodos colorimétricos (Química Clínica Aplicada, SA, Amposta, España) y la de insulina por ELISA (*BD Bioscience, San Diego, CA, USA*).

La cepa de la invención administrada *in vivo* regula el metabolismo de la glucosa reduciendo su concentración en sangre periférica en animales obesos; por ejemplo las concentraciones elevadas de glucosa en suero de 492,7 (SD 18,3) mg/dl detectadas en ratones obesos tienden a normalizarse mediante la administración de la cepa objeto de la invención, alcanzando valores de 316,5 (SD 20,5) mg/dl, de forma proporcional a la reducción de la concentración de insulina. El aumento de la concentración de glucosa en plasma es indicativo de una alteración en la síntesis o respuesta a la insulina u otras causas, y puede ser regulada positivamente por la cepa objeto de la invención, reduciendo el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina y diabetes, y mejorando su tratamiento.

La cepa de la invención administrada *in vivo* regula el metabolismo de los lípidos reduciendo en particular la concentración de triglicéridos y colesterol en sangre periférica en animales obesos; por ejemplo las concentraciones elevadas de triglicéridos en suero de 196,0 (SD 14,3) mg/dl detectadas en ratones obesos se reducen significativamente mediante la administración de la cepa objeto de la invención alcanzando valores de 147,5 (SD 12,5) mg/dl Asimismo, las concentraciones elevadas de colesterol sérico en animales obesos de 146,9 (SD 12,7) mg/dl se reducen significativamente mediante la administración de la cepa objeto de la invención alcanzando valores de 94,4 (SD 5,7) mg/dl.

10

**EJEMPLO 6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CEPA *B. pseudocatenulatum* CECT 7765 EN LA ABSORCIÓN DE LÍPIDOS DE LA DIETA EN EL INTESTINO.**

Se utilizó el mismo modelo de obesidad descrito en el ejemplo 3 y los mismos grupos experimentales a dos de los cuales se les administró la cepa objeto de la invención siguiendo la misma pauta. Tras el tiempo de tratamiento, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical y se tomaron muestras de tejido intestinal que fueron lavadas con solución salina y fijadas en un tampón con un 10% de formalina, embebidas en parafina, y cortadas en secciones de 4-5  $\mu\text{m}$ , que fueron teñidas con eosina hematoxilina. El número de quilomicrones por entericito se determinó contando 10 campos de cada sección fijada con el microscopio óptico de campo claro (Olympus), y se expresó en número de quilomicrones por entericito. Como puede observarse en la FIG. 7, la cepa de la invención reduce el número de quilomicrones que se forman en los entericitos en más de un 50%. Estos resultados son coherentes con los del ejemplo 5, que demuestran que la cepa de la invención reduce la concentración de triglicéridos en sangre.

**REIVINDICACIONES**

1. Cepa de *Bifidobacterium pseudocatemulatum* con número de depósito CECT 7765.
- 5 2. Cepa derivada de la cepa según la reivindicación 1, en donde dicha cepa derivada mantiene o mejora las capacidades de la cepa según la reivindicación 1.
3. Cepa derivada según la reivindicación 2, donde dicha cepa es un mutante genéticamente modificado.
- 10 4. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha cepa está en forma de células viables.
5. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha cepa está en forma  
15 de células no viables.
6. Combinación de microorganismos que comprende la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y al menos otro microorganismo seleccionado del grupo que consiste en:  
20
  - al menos otra cepa del género *Bifidobacterium*;
  - al menos una bacteria láctica de origen intestinal, alimentario o ambiental;
  - al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariontes de origen intestinal, alimentario o ambiental; y
  - al menos una cepa de hongo o levadura.
- 25 7. Combinación de microorganismos según la reivindicación 6, en donde:  
30
  - la al menos otra cepa del género *Bifidobacterium* se selecciona del grupo que consiste en la cepa *B. longum* CECT 7347 u otras cepas de las especies *B. pseudocatemulatum*, *B. catemulatum*, *B. breve*, *B. longum subsp. longum*, *B. longum subsp. infantis*, *B. lactis subsp. lactis*, *B. lactis subsp. animalis*, o *B. adolescentis*;
  - la al menos una bacteria láctica de origen intestinal, alimentario o ambiental se selecciona del grupo que consiste en una bacteria del género

*Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Propionibacterium, Leuconostoc, Weissella, Pediococcus* o *Streptococcus*;

- 5 - la al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariontas de origen intestinal, alimentario o ambiental se selecciona del grupo que consiste en *Archaea, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Metanobacteria, Spirochaetes, Fibrobacters, Deferribacteres, Deinococcus, Thermus, Cianobacteria, Methanobrevibacterium, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Coprococcus, Subdoligranulum, Dorea, Bulleidia,*
- 10 *Anaerofustis, Gemella, Roseburia, Catenibacterium, Dialister, Anaerotruncus, Staphylococcus, Micrococcus, Propionibacterium, Enterobacteriaceae, Faecalibacterium, Bacteroides, Parabacteroides, Prevotella, Eubacterium, Akkermansia, Bacillus, Butyrivibrio* o *Clostridium*; y
- 15 - la al menos una cepa de hongo o se selecciona del grupo que consiste en el género *Saccharomyces, Candida, Pichia, Debaryomyces, Torulopsis, Aspergillus, Rhizopus, Mucor* o *Penicillium*.

8. Combinación de microorganismos según la reivindicación 6, donde el otro  
20 microorganismo es una bacteria intestinal o una bacteria láctica.

9. Componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o a partir de la combinación de microorganismos según cualquiera de las  
25 reivindicaciones 6 a 8.

10. Composición que comprende la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; o la combinación de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8; o los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus  
30 combinaciones, según la reivindicación 9.

11. Composición según la reivindicación 10, donde dicha composición es una composición farmacéutica.

12. Composición según la reivindicación 11, donde además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 5 13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, donde dicha composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.
14. Composición según la reivindicación 13, donde dicha composición se presenta en  
10 una forma adaptada a la administración oral.
15. Composición según la reivindicación 10, donde dicha composición es una composición nutritiva.
- 15 16. Composición según la reivindicación 15, donde dicha composición es un alimento, un nutracéutico, un suplemento, un probiótico o un simbiótico.
17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, donde dicho alimento se selecciona de la lista que comprende: producto lácteo, producto vegetal,  
20 producto cárnico, aperitivo, chocolate, bebida o alimento infantil.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, donde dicha composición tiene una concentración de la cepa de entre 10<sup>3</sup> y 10<sup>14</sup> unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.  
25
19. Uso de la cepa CECT 7765 de la especie *Bifidobacterium pseudocatenulatum* para la fabricación de una composición farmacéutica, de un medicamento o de una composición nutritiva.
- 30 20. Uso de la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; o de la combinación de microorganismos según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8; o de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas, o cualquiera de sus combinaciones, según la reivindicación 9; o de la composición según la reivindicación

10, para la fabricación de una composición farmacéutica, de un medicamento o de una composición nutritiva.

5 21. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para la prevención y/o tratamiento del sobrepeso y/o de la obesidad.

10 22. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para la prevención y/o tratamiento de la hipoglucemia y/o la diabetes.

23. Uso según la reivindicación 22, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para la prevención y/o tratamiento de diabetes Mellitus tipo 2.

15 24. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para el tratamiento y/o la prevención de la esteatosis hepática o hígado graso.

20 25. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para el tratamiento y/o prevención de la dislipemia.

26. Uso según la reivindicación 25, donde la dislipemia es hipertrigliceridemia.

25 27. Uso según la reivindicación 25, donde la dislipemia es hipercolesterolemia.

28. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para el tratamiento y/o prevención del síndrome metabólico.

30 29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para mejorar la función del sistema inmunitario de un sujeto con sobrepeso o de un sujeto con obesidad, respecto de un sujeto no tratado.

30. Uso según la reivindicación 29, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para la prevención y/o tratamiento de infecciones en sujetos con obesidad o sobrepeso.

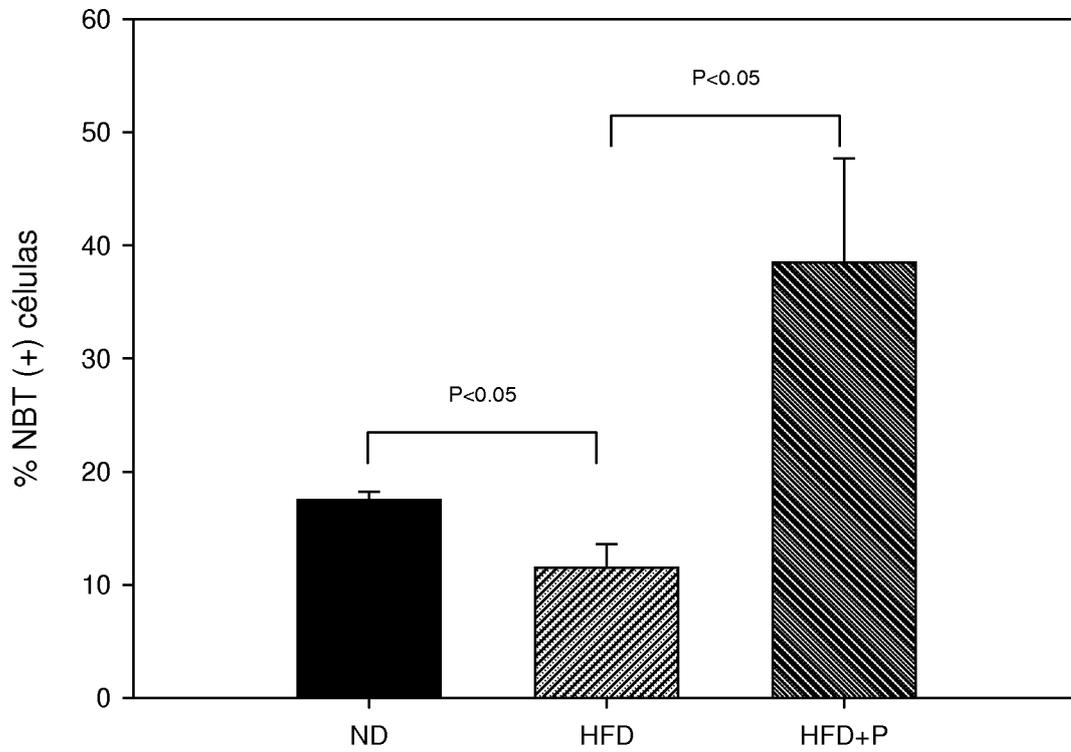
5 31. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para la prevención y/o tratamiento de la hipertrofia de los adipocitos.

10 32. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para la reducción de la ingesta, y el aumento del gasto energético, en un sujeto no obeso respecto de un sujeto control no tratado.

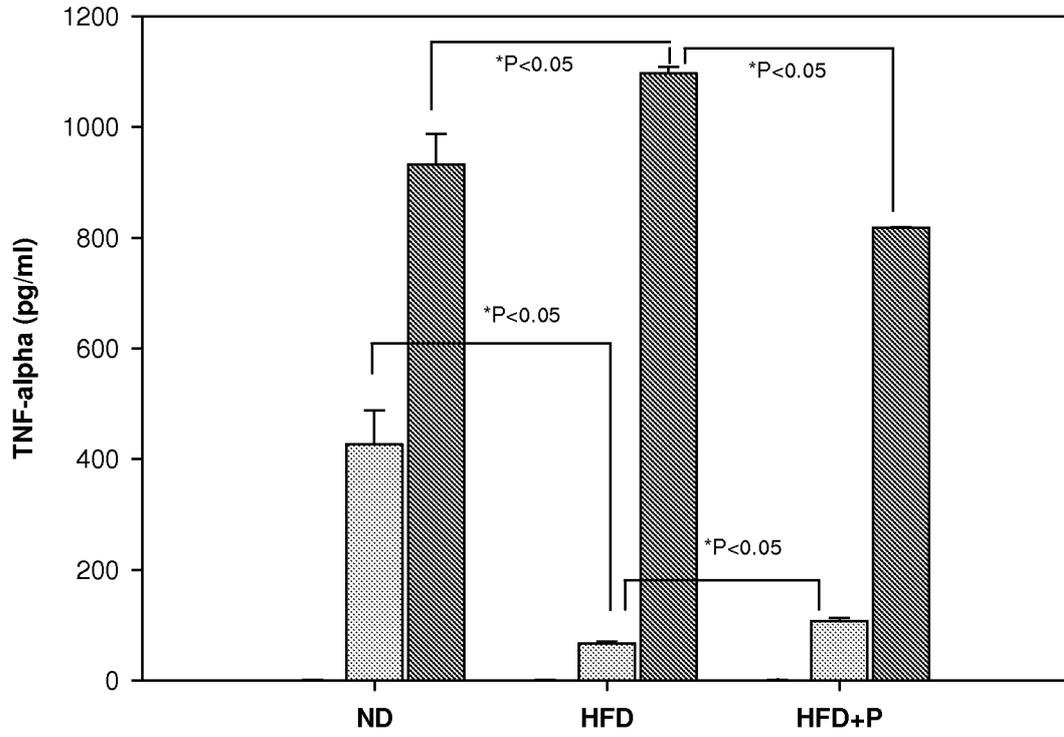
15 33. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para la reducción de la síntesis de proteínas pro-inflamatorias a nivel periférico y central asociadas al desarrollo del sobrepeso, la obesidad, y las patologías relacionadas.

20 34. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 19 ó 20, donde el medicamento o la composición nutritiva, se usa para reducir la concentración de enterobacterias en el contenido intestinal, respecto de un control no tratado.

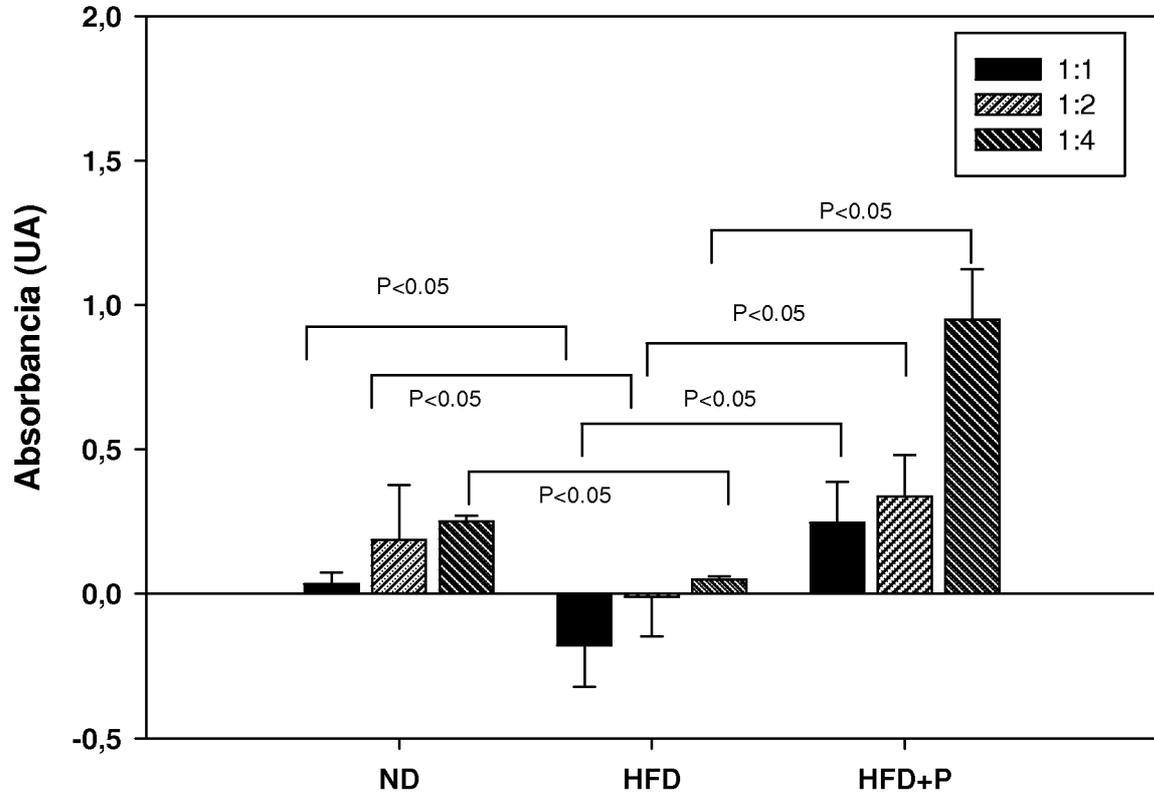
35. Uso según la reivindicación 34, donde la reducción de la concentración de enterobacterias en el contenido intestinal se lleva a cabo en un sujeto con sobrepeso o con obesidad.



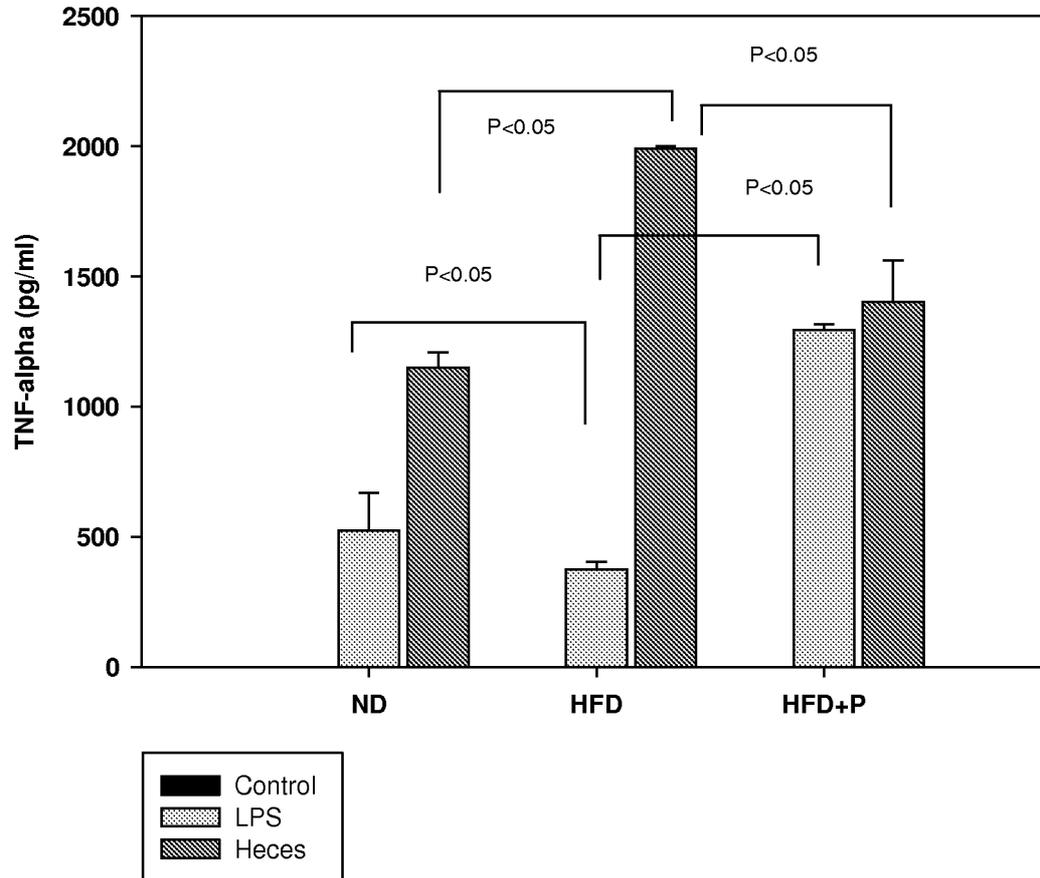
**FIG. 1**



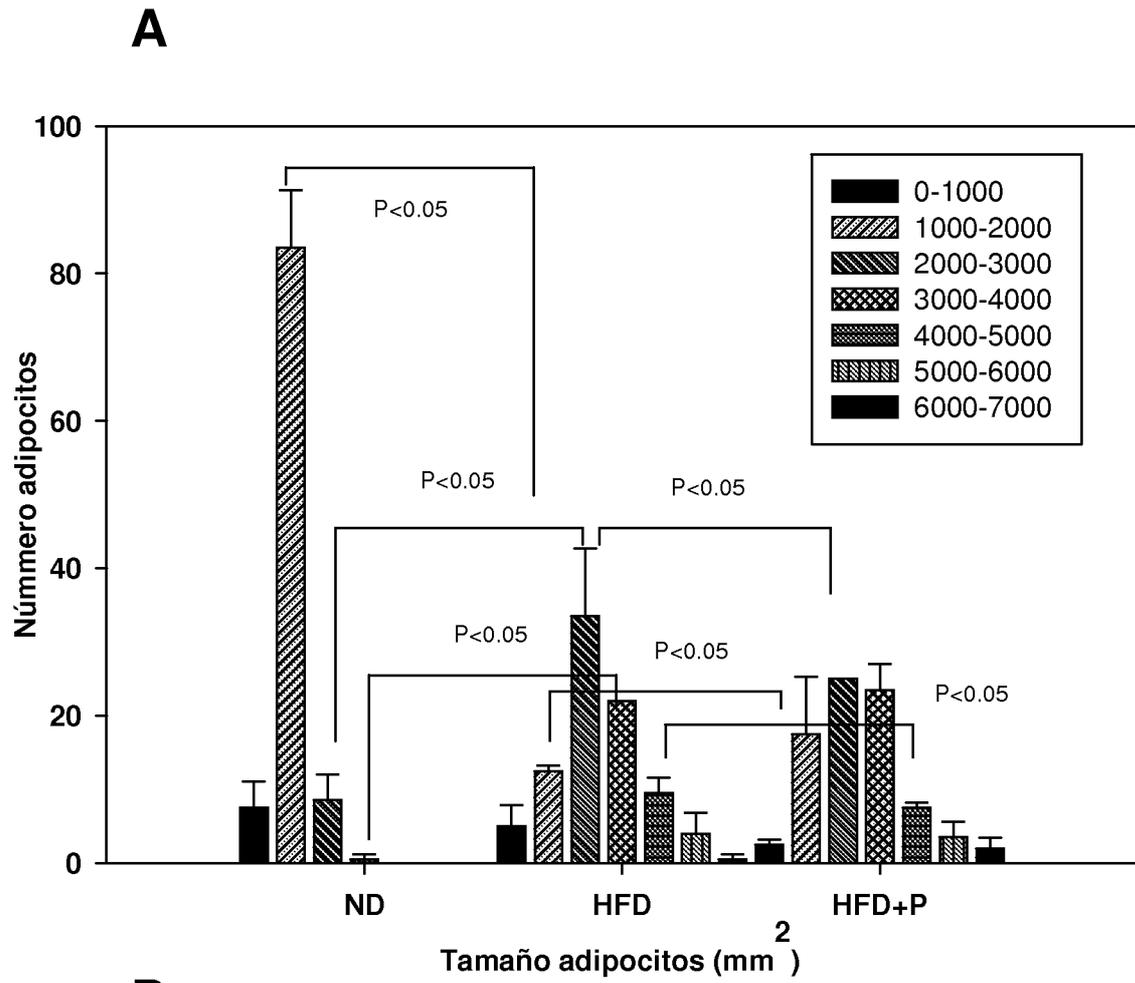
**FIG. 2**



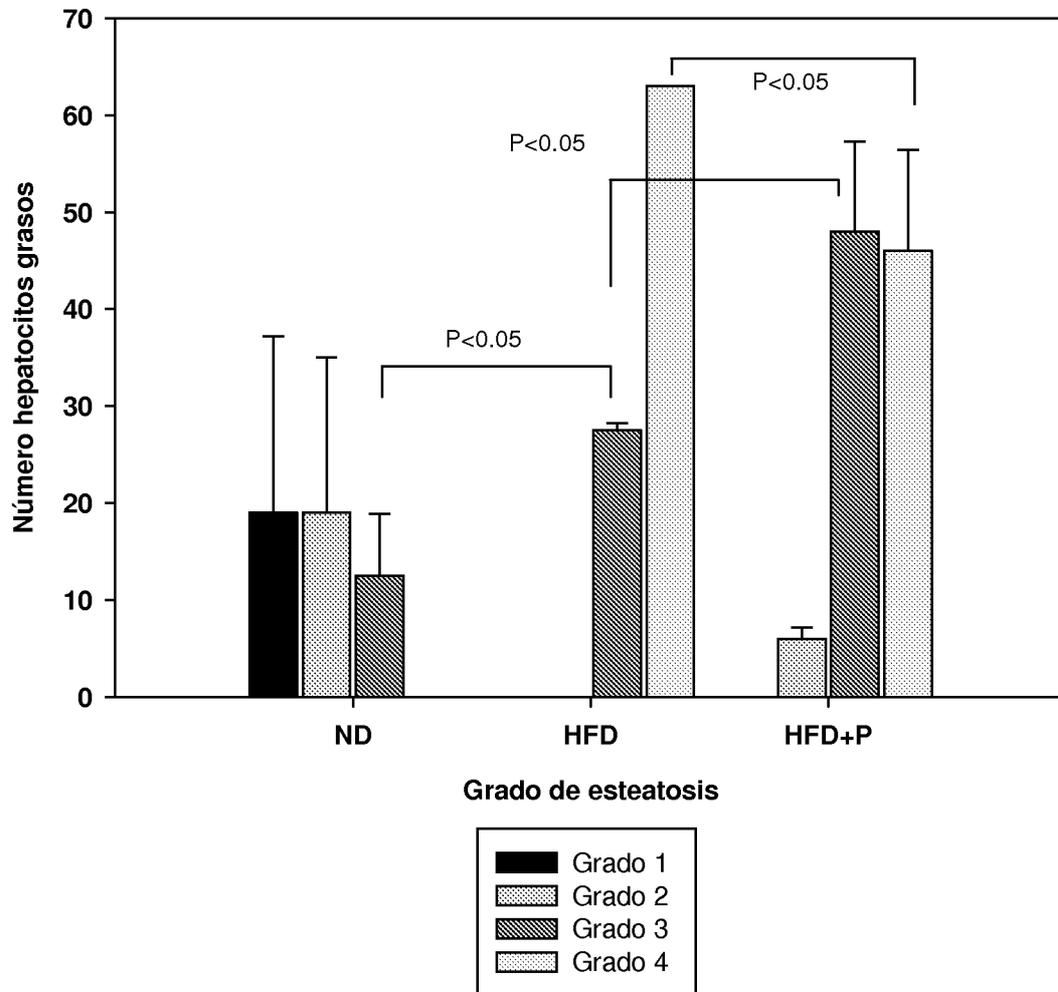
**FIG. 3**



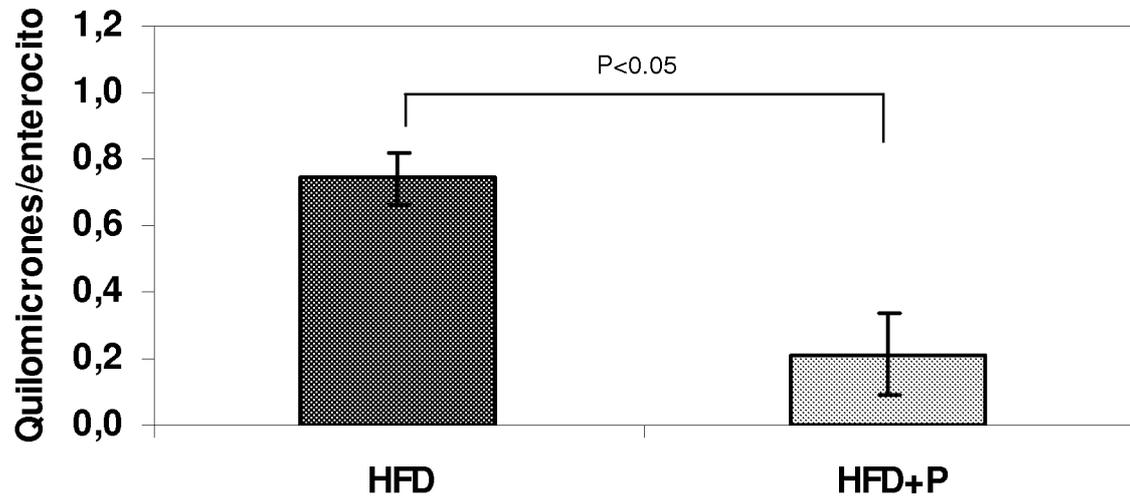
**FIG. 4**



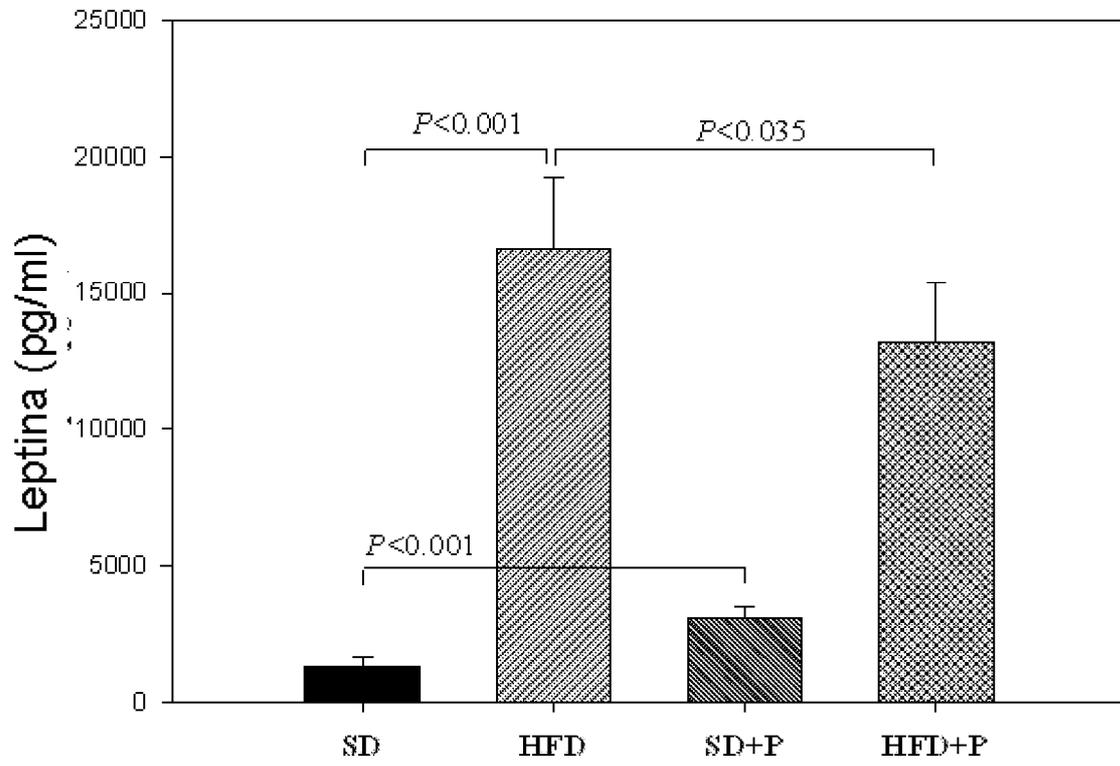
**FIG. 5**



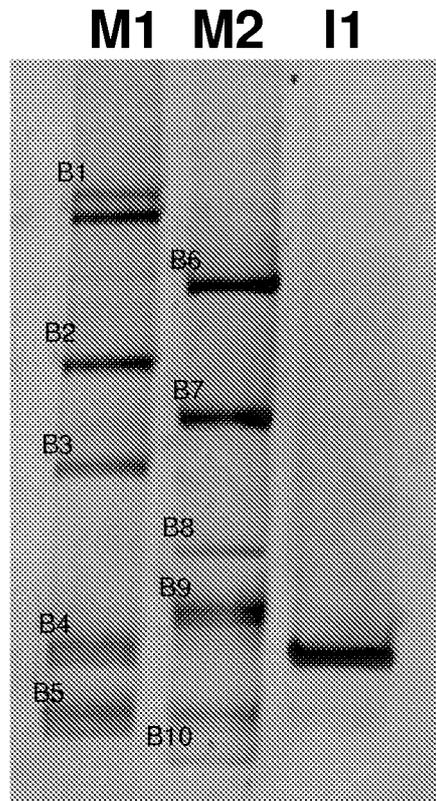
**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG 8**



**FIG 9**

# ES 2 389 547 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
- <120> Bifidobacterium CECT 7765 y su uso en la prevención y/o tratamiento del sobrepeso, la obesidad y patologías asociadas
- <130> ES1641.814
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1280
- <212> DNA
- <213> Bifidobacterium pseudocatenuatum
- <400> 1
- |   |      |
|---|------|
| gcttggtggt gagagtggcg aacgggtgag taatgcgtga cgcacctgcc ccatacaccg   | 60   |
| gaatagctcc tggaaacggg tggtaatgcc ggatgctccg actcctcgca tgggggtgctg  | 120  |
| ggaaagattt catcggtatg ggatggggtc gcgtcctatc aggtagtcgg cggggtaacg   | 180  |
| gccaccgag cctacgacgg gtagccggcc tgagagggcg accggccaca ttgggactga    | 240  |
| gatacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attgcacaat gggcgcaagc   | 300  |
| ctgatgcagc gacgccgctg gcgggatgac ggccttcggg ttgtaaaccg cttttgatcg   | 360  |
| ggagcaagcc ttcgggtgag tgtacctttc gaataagcac cggctaacta cgtgccagca   | 420  |
| gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgtaa tccggaatta ttgggcgtaa agggctcgtg   | 480  |
| ggcggttcgt cgcgtccggt gtgaaagtcc atcgcttaac ggtggatctg cgccgggtac   | 540  |
| gggcgggctg gagtgcggta ggggagactg gaattcccgg tgtaacgggtg gaatgtgtag  | 600  |
| atatcgggaa gaacaccaat ggcgaagtca ggtctctggg ccgttactga cgctgaggag   | 660  |
| cgaaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgccgt aaacgggtgga  | 720  |
| tgctggttgt ggggccggtt ccacgggttc cgtgtcggac ctaacgcggt aagcatcccg   | 780  |
| cctggggagt acggccgcaa ggctaaaact caaagaaatt gacggggggcc cgcacaagcg  | 840  |
| gcggagcatg cggattaatt cgatgcaacg cgaagaacct tacctgggct tgacatgttc   | 900  |
| ccgacagccg tagagatatg gcctcccttc ggggcgggtt cacaggtggt gcatggctcg   | 960  |
| cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac cctcgccctg   | 1020 |
| tgttgccagc acgtcatggt gggaaactcac gggggaccgc cgggggtcaac tcggaggaag | 1080 |
| gtggggatga cgtcagatca tcatgccctt tacgtccagg gcttcacgca tgctacaatg   | 1140 |
| gccggtacaa cgggatgcga cacggcgacg tggagcggat ccctgaaaac cgggtctcagt  | 1200 |
| tcggattgga gtctgcaacc cgactccatg aaggcggagt cgctagtaat cgcggatcag   | 1260 |
| caacgccgcg gtgaatgcgt   | 1280 |
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador 27f  
 <400> 2  
 agagtttgat cctggctcag 20

<210> 3  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador 1401r  
 <400> 3  
 cggtgtgtac aagaccc 17

<210> 4  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador 530f  
 <400> 4  
 gtgccagcag ccgcgg 16

<210> 5  
 <211> 17  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador U-968f  
 <400> 5  
 aacgcgaaga accttac 17

<210> 6  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador M13  
 <400> 6  
 gaggtggcg gttct 15

<210> 7  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador De1  
 <400> 7  
 ccgcagccaa 10



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031811

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.12.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2009153662 A1 (DANISCO A/S) 23.12.2009, todo el documento.	1-35
A	WO 2007043933 A1 (ARLA FOODS AMBA) 19.04.2007, todo el documento.	1-35
A	WO 03010297 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED) 06.02.2003, todo el documento.	1-35
A	WO 0188095 A1 (BIONEER CORPORATION) 22.11.2001, todo el documento.	1-35

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.10.2012

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K35/74** (2006.01)

**A61P3/04** (2006.01)

**A61P3/10** (2006.01)

**A61P37/02** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.10.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-35	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-35	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2009153662 A1 (DANISCO A/S)	23.12.2009
D02	WO 2007043933 A1 (ARLA FOODS AMBA)	19.04.2007
D03	WO 03010297 A1 (ALIMENTARY HEALTH LIMITED)	06.02.2003
D04	WO 0188095 A1 (BIONEER CORPORATION)	22.11.2001

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-35, es la cepa de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* con número de depósito CECT 7765 (reiv. 1-5) y sus componentes celulares, metabolitos y moléculas secretadas, obtenidos a partir de ella (reiv. 9) y la combinación de dicha cepa con distintos microorganismos (reiv. 6-8). Es también objeto de la invención, la composición que comprende la cepa o sus componentes celulares (reiv. 10-18) y los usos de la cepa en la prevención y/o tratamiento del sobrepeso, obesidad y patologías asociadas (reiv. 19-35 todas ellas parcialmente).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga el uso de bacterias del género *Bifidobacterium* (entre ellas *Bifidobacterium pseudocatenulatum*) para la elaboración de productos alimenticios, suplementos dietéticos o medicamentos, para tratar la obesidad, la diabetes y los estados metabólicos asociados a estas enfermedades, enfermedades cardiovasculares, los procesos inflamatorios en el tejido adiposo o el síndrome metabólico. En estas composiciones, la concentración de la cepa es de 106 a 1012 ufc por gramo de composición.

El documento D02 divulga el uso de bacterias probióticas, como las especies del género *Bifidobacterium* (en concreto *B. lactis*) para la elaboración de alimentos, suplementos dietéticos, productos nutritivos, composiciones farmacéuticas y medicamentos, para prevenir la obesidad, incrementar la saciedad, reducir la ingesta, reducir el acúmulo de grasas, mejorar el metabolismo e incrementar la sensibilidad a la insulina. Estas composiciones son utilizadas también, no solo para prevenir la obesidad, sino para tratarla y también para tratar la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico.

El documento D03 divulga cepas de *Bifidobacterium* para el tratamiento de distintas enfermedades inflamatorias, enfermedades causadas por infecciones bacterianas, la diabetes mellitus y enfermedades hepáticas entre otras enfermedades, debido a las propiedades de dichas cepas, como son que reducen los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, tienen un efecto inmunomodulador y antagonizan el crecimiento de otras especies patógenas. Las cepas divulgadas se usan para la preparación de composiciones, tanto farmacéuticas como nutritivas. En estas composiciones, la concentración de la cepa es de 106 ufc por gramo de composición. Dichas cepas crecen a pH ácido y en presencia de bilis, por lo que sobreviven al tránsito gastro-intestinal.

El documento D04 divulga microorganismos, entre ellos distintas especies de *Bifidobacterium*, para el tratamiento de la obesidad y la diabetes mellitus, mediante la reducción del contenido de monosacáridos o disacáridos, que pueden ser absorbidos por el cuerpo humano, transformándolos en materiales poliméricos que no puedan ser absorbidos por el intestino. Este documento también divulga composiciones que contienen dichos microorganismos.

A la vista de los documentos citados, ya se conoce en el estado de la técnica que las especies del género *Bifidobacterium* (y concretamente la especie *Bifidobacterium pseudocatenulatum*) son utilizadas para el tratamiento de la obesidad, la diabetes y los estados metabólicos asociados a estas enfermedades. Sin embargo, la cepa de la invención, o sus características, no han sido descritas en dichos documentos, por lo tanto, la cepa se considera que es nueva y que implica actividad inventiva, por lo que los usos de la misma, se consideran igualmente nuevos e inventivos. En consecuencia, la invención según se recoge en las reivindicaciones 1-35, es nueva e implica actividad inventiva en el sentido de los artículos art. 6.1 y art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.