

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 865**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/23 (2006.01)

C12R 1/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2006 E 06799717 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012 EP 1945235**

54 Título: **Probióticos para influenciar el metabolismo de las grasas y la obesidad**

30 Prioridad:

07.10.2005 SE 0502214

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

28.02.2013

73 Titular/es:

ARLA FOODS AMBA (100.0%)

Sonderhoj 14

8260 Viby J, DK

72 Inventor/es:

OHLSON, KAJSA;

MAHLAPUU, MARGIT y

SVENSSON, ULLA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 865 T3

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

DESCRIPCIÓN

Probióticos para influenciar el metabolismo de las grasas y la obesidad

5 Campo de la invención

La invención se refiere al uso de bacterias probióticas para la fabricación de un producto alimentario, producto para pienso, suplemento dietético, producto nutricional, remedio natural, formulación activa farmacéutica y medicamento para usar para el control de la ganancia de peso, prevención de la obesidad, incremento de la saciedad, prolongación de la sensación de saciedad, reducción de la ingesta de alimentos, reducción del depósito de grasas, mejora del metabolismo energético, potenciación de la sensibilidad a la insulina, tratamiento de la obesidad y tratamiento de la insensibilidad a la insulina.

15 Antecedentes de la invención

El interés en el uso de alimentos para influir sobre la salud está creciendo rápidamente entre investigadores, profesionales de la salud y en la industria alimentaria. El síndrome metabólico, incluidos la obesidad, el almacenamiento de grasa abdominal y la diabetes de tipo II son una de las principales amenazas para la salud y el bienestar humanos. Hoy en día mueren más personas por comer demasiado que el número de personas que muere por comer demasiado poco. Por tanto, la posibilidad de reducir el riesgo de obesidad y de almacenamiento de grasa corporal es de gran valor en una perspectiva de salud mundial y la posibilidad de desarrollar productos alimentarios en esta área es de gran interés para la industria alimentaria.

La industria alimentaria ya ha respondido a esta demanda desarrollando productos con una densidad energética baja, por ejemplo productos con niveles bajos de grasas y de carbohidratos. Las posibilidades de encontrar componentes bioactivos naturales en los alimentos, o la posibilidad de añadirlos, que influyan sobre el riesgo de obesidad, metabolismo de las grasas, metabolismo de la glucosa y la saciedad abre nuevas posibilidades para que la industria desarrolle alimentos funcionales con efectos documentados sobre la salud. Recientemente, se han publicado estudios que muestran una correlación entre el consumo de niveles elevados de calcio en leche y un índice de masa corporal (IMC) bajo. Hoy en día, en numerosos artículos de revisión se ha llegado a la conclusión de que el calcio de la leche y productos lácteos disminuye el riesgo de obesidad, almacenamiento de grasas corporales y resistencia a la insulina. El calcio por sí solo no parece tener esas propiedades y se ha especulado que además del calcio se necesitan componentes bioactivos presentes en la leche.

El ILSE (International life science institute) define los probióticos como "microorganismos añadidos con un efecto beneficioso sobre la salud". Los probióticos normalmente se usan en alimentos, productos alimentarios y suplementos dietéticos por su influencia en la salud intestinal, infecciones y el sistema inmunitario. También se ha mostrado que algunas cepas de probióticos, pero no todas las estudiadas, influyen sobre los niveles de colesterol y, recientemente se ha observado la posibilidad de disminuir la presión arterial mediante el uso de productos lácteos fermentados con bacterias de ácido láctico proteolíticas. Por tanto, el interés en los probióticos es amplio y el papel central de la flora intestinal para la salud y bienestar del intestino y el sistema inmunitario se ha establecido con fuerza.

Durante los últimos años se han desarrollado técnicas, a menudo denominadas genómicas y nutrogenómicas. Estas técnicas permiten nuevas posibilidades únicas para estudiar la influencia de los alimentos, componentes nutricionales y probióticos sobre la salud y el bienestar. Las técnicas permiten el estudio sobre la expresión génica de miles de genes al mismo tiempo. Por tanto, se pueden encontrar nuevas e inesperadas áreas para los efectos sobre la salud y se puede sugerir el mecanismo tras el efecto sobre la salud.

La base de esta aplicación la constituyen los estudios en hombres y ratones que, de forma interesante, muestran que un producto probiótico influye sobre la saciedad, disminuye el almacenamiento de grasas y el riesgo de obesidad. Los posibles mecanismos tras el efecto observado se explicaron en estudios de expresión génica tras el consumo de productos probióticos.

55 Descripción de la técnica anterior

Se han descrito las funciones metabólicas que contribuyen al sobrepeso, el síndrome metabólico y el riesgo de diabetes de tipo II y el vínculo entre la nutrición general y dichas enfermedades es bien conocido. No obstante, existe la necesidad de estudios de intervención basados en dietas para establecer el papel de alimentos individuales y del grupo de alimentos en la disminución del riesgo para desarrollar dichas enfermedades. En estudios en esta área se han centrado en la densidad energética, las grasas y los carbohidratos.

Un factor importante en el síndrome metabólico es el metabolismo de la glucosa, que incluye la sensibilidad a la insulina. Existe una relación entre el depósito de grasas corporales, la insensibilidad a la insulina y el sobrepeso. También existe una relación entre la saciedad y la satisfacción. Las interacciones entre todas estas funciones son complejas y es difícil identificar la secuencia exacta de acontecimientos que conducen a salud o a enfermedad.

Se ha descrito una serie de genes y sus correspondientes proteínas que están implicadas en la homeostasis de la energía. El tejido adiposo sintetiza una serie de proteínas con semejanza estructural a las citoquinas y, por tanto, estas proteínas se denominan adipoquinas. Algunas de estas también se sintetizan en el intestino o la síntesis está regulada desde el intestino. El receptor nuclear PPAR-gamma está implicado en la síntesis de, por ejemplo, la adiponectina, y la síntesis está asociada con la ingesta de calorías y la señalización de la leptina. El incremento de la síntesis de adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina incrementando el transporte de los ácidos grasos, la oxidación y disipación en el músculo esquelético e incrementando la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina. Otro factor derivado de adipositos regulado nutricionalmente que influye sobre la sensibilidad a la insulina es la resistina. Los niveles circulantes de resistina aumentan en la obesidad, mientras que el tratamiento de ratones con resistina tuvo como resultado un incremento de la producción de glucosa y alteración de la acción de la insulina. Por tanto, la resistina tiene una función en la homeostasis de la glucosa y actúa como antagonista de la acción de la insulina, dando lugar a resistencia a la insulina. Las proteínas de tipo resistina también se expresan en el tracto gastrointestinal (14). La proteína apolipoproteína A-IV se secreta en el intestino delgado en seres humanos y en roedores. La síntesis se estimula por la ingesta de grasas y la proteína probablemente esté implicada en la inhibición de la ingesta de alimentos tras la ingestión de grasas. Los estudios han mostrado que la apolipoproteína A-IV esté probablemente implicada en la regulación a corto y a largo plazo de la ingesta de alimentos.

Hooper y col. (11) estudiaron la expresión génica en el intestino de ratones expuestos a *Bacteroides thetaiotaomicron*. Concluyeron que los experimentos mostraban el papel esencial para la interacción entre la microflora intestinal y el huésped. No se comunicaron efectos sobre el metabolismo energético ni la obesidad. La influencia de los probióticos sobre la expresión génica en la mucosa del intestino delgado se ha estudiado para *Lactobacillus rhamnosus* GG (8). Su conclusión es que la administración de *Lactobacillus* GG está asociada con una respuesta genética compleja. Las principales respuestas observadas son efectos sobre el sistema inmunitario, inflamación, apoptosis, crecimiento y diferenciación celular, adhesión celular y transcripción y transducción de la señal. No se comunicaron efectos sobre el metabolismo energético, de las grasas de la glucosa o de la insulina. En una presentación oral de W. de Vos, en la 4ª Conferencia NIZO Dairy en 2005, se presentó la influencia de los lactobacilos, por ejemplo, *L. plantarum* 299v, sobre la expresión génica en el intestino y la conclusión fue que el efecto sobre la expresión génica de diferentes cepas varía considerablemente. No se comunicaron efectos sobre el metabolismo energético ni de las grasas.

Se han publicado algunos artículos relacionando la flora intestinal con la ganancia de peso y el almacenamiento de grasas. Bäckhed y col. (7) estudiaron la importancia de la flora intestinal normal para la ganancia de peso y el almacenamiento de grasa corporal. Se demostró que en ratones gnotobióticos convencionalizados con una microbiota normal aumentó su grasa corporal en un 60 % y aumentó la resistencia a la insulina durante un periodo de alimentación de 14 días a pesar de una menor ingesta de alimentos. Se presenta una sugerencia de cómo la microbiota puede influir sobre el almacenamiento de los triglicéridos. Por tanto, se sabe que la microbiota intestinal normal influye sobre el metabolismo de las grasas, no obstante, antes de esta investigación no se sabía si la flora normal podía modificarse en relación con el metabolismo de las grasas.

Tabuchi y col. (17) describen que las células de *Lactobacillus* GG mejoran la tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos. Este efecto antidiabético de las células GG podría deberse a la prevención de una disminución de la secreción de insulina.

Kalavathy y col. (18) demuestran que el suplemento de una mezcla de 12 cepas de *Lactobacillus* a la dieta de pollos de engorde mejoró la ganancia de peso corporal y la tasa de conversión del alimento y era eficaz en la reducción de los depósitos de grasa abdominal, los niveles de colesterol total en suero, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los triglicéridos.

Matsuzaki y col. (19) describen que la alimentación oral de *Lactobacillus casei* en un modelo de diabetes mellitus dependiente de insulina, ratones NOD inhibió la aparición de diabetes y reguló la respuesta inmunitaria del huésped.

Ohlson y col. (20) revisa estudios de la cepa *Lactobacillus* F 19 y debate la idoneidad para los productos para el consumidor.

Sullivan y col. (21) estudiaron el efecto de la clindamicina sobre la microflora intestinal en sujetos que ingieren yogur con microorganismos probióticos añadidos. Encontraron que *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus* F19 previenen las alteraciones ecológicas asociadas con los antibióticos de *Bacteroides fragilis* en el intestino.

Ali y col. (2, 3) han estudiado la influencia de las isoflavonas de soja con o sin probióticos sobre el metabolismo del colesterol y el depósito de grasas y encontraron que los probióticos usados no tenían ninguna influencia sobre el colesterol y ni el depósito de grasas. Otras investigaciones han mostrado que algunas cepas probióticas pueden influir sobre el nivel de colesterol en sangre (1, 13). Estos y otros estudios en los que las cepas probióticas se comparan muestran que diferentes cepas probióticas tienen diferentes características y es importante escoger las cepas correctas para efectos de salud específicos.

En la solicitud de patente PCT WO 04/014403 (15), se describe el uso de probióticos para reducir la cantidad de monosacáridos y disacáridos en alimentos y, de este modo, tratar o prevenir el riesgo de obesidad. En la patente de EE.UU. nº 6 696 057, Bojrab (4) ha patentado una composición de bacterias de yogur, por ejemplo *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, hiperlipidemias y enfermedades autoinmunitarias, y en la patente de EE.UU. 6 641 808 Bojrab (5) describe el uso de la misma composición también para el tratamiento de la obesidad. Esta invención también se describe en la solicitud de patente europea 1.177.794/6. Estas patentes/solicitudes tienen una larga descripción sobre la influencia de los probióticos sobre la salud intestinal, infección e inmunidad, pero el único experimento presentado que confirma la influencia sobre la obesidad es un único ensayo de alimentación en una persona. El uso de té verde o de extractos de té verde en combinación con una serie de componentes bioactivos o probióticos para la pérdida de peso ha sido patentado por Gorsek en las patentes de EE.UU. 6 383 482 (9) y 6 565 847 (10). En ambas patentes, los principales componentes activos son el té verde y los componentes bioactivos, mientras que los probióticos se añaden como parte de la composición básica. En la patente de EE.UU. 6 808 703 y la solicitud de patente japonesa 2001-292728 (16), se describe un modo de preparar un alimento para el tratamiento de la obesidad que contiene levaduras, enterobacterias, ácido láctico, bacterias, oligosacáridos y fibra vegetal. No se presentan ejemplos ni reivindicaciones sobre el tratamiento de la obesidad.

Descripción de la invención

Un objeto de la Invención es el uso de bacterias probióticas para la fabricación de un producto alimentario, producto para pienso, suplemento dietético, productos nutricionales, remedio natural, formulación activa farmacéutica y medicamento para usar para el control de la ganancia de peso, prevención de la obesidad, incremento de la saciedad, prolongación de la sensación de saciedad, reducción de la ingesta de alimentos, reducción del depósito de grasas, mejora del metabolismo energético, potenciación de la sensibilidad a la insulina, tratamiento de la obesidad y tratamiento de la insensibilidad a la insulina.

Este objeto se consigue en cuanto a que las bacterias probióticas seleccionadas del grupo consisten en bacterias de ácido láctico, especialmente *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Bifidobacterium lactis*, y más preferentemente *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) (las bacterias se han depositado en la colección de cultivos LMG en Gent, disponible en la colección de cultivos NCFB y en Chr. Hansen Company DK, respectivamente). Las cepas se denominarán LMG P-17806, NCFB 1748 y Bb12 (DSM 15954) más adelante.

Lactobacillus casei F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748, y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) están bien caracterizados y la cepa LMG P-17806 y su uso se han patentado anteriormente (documento WO 99/29833). Las tres cepas sobreviven bien en productos alimentarios y durante el paso a través del intestino.

El impacto de la invención es de considerable importancia, ya que el estilo de vida habitual de hoy en día a menudo implica exceso de ingesta de alimentos que conduce a un incremento del riesgo de síndrome metabólico, incluyendo obesidad, depósito de grasa abdominal y diabetes de tipo II. La diabetes de tipo II se debe a una sensibilidad baja a la insulina o a resistencia a la insulina. Esta amenaza para la salud aumenta continuamente en todos los grupos de edad por todo el mundo. Los lactobacilos como probióticos están bien aceptados como productos alimentarios y productos para piensos, productos naturales, suplementos dietéticos y en remedios naturales, formulaciones activas farmacéuticas y medicamentos. Son fáciles de usar en dichos sistemas de liberación y se pueden consumir fácilmente a diario. El consumo regular de dichas bacterias ayudará a controlar la ganancia de peso, prevenir la obesidad, incrementar la saciedad, prolongar la satisfacción, reducir la ingesta de alimentos, reducir el depósito de grasas, mejorar el metabolismo energético, potenciar la sensibilidad a la insulina, tratar la obesidad y tratar la insensibilidad a la insulina y, de este modo, el riesgo de enfermedades incluidas en el síndrome metabólico.

En la invención se incluyen los estudios siguientes:

Un estudio ha mostrado de un modo prometedor que un producto probiótico puede disminuir la ganancia de peso en seres humanos. Otros estudios han mostrado que un ser humano que ha tomado probióticos notificó mayor saciedad y tenía una sensación de estar saciado durante más tiempo que individuos que tomaron la misma leche acidificada sin probióticos o placebo. Los ratones a los que se administró probióticos tenían una ingesta de energía total menor, menos depósito de grasas en el tejido adiposo y menor ganancia de peso total que los individuos que no recibieron probióticos. Los estudios de expresión génica confirman que el probable mecanismo que reside tras los efectos observados es una influencia en un grupo de genes implicados en el metabolismo energético, de las grasas, del azúcar y de la insulina sobre la sensación de saciado.

Ejemplos

1) Regulación del peso en seres humanos

En un estudio doble ciego y controlado con placebo se administró a seres humanos una leche acidificada que contenía probióticos (LMG P-17806 y NCFB 1748) o la misma leche acidificada sin probióticos o un comprimido de

calcio. Los grupos consistían en 15, 14 y 10 personas, respectivamente. Las bacterias probióticas se añadieron al producto en una concentración final de 5×10^7 UFC/ml y el número de bacterias era estable en el producto durante el tiempo que duró el experimento. Los participantes comían 2 x 2,5 dl del producto todos los días. Las personas incluidas tenían un ligero sobrepeso (IMC 25-30). El objetivo del ensayo era estudiar los efectos de los probióticos sobre el metabolismo del colesterol y la ganancia de peso se midió como medida de control. No se realizó ninguna recomendación sobre el control de peso, pero a todos los participantes se les ofreció un tratamiento de disminución de peso tras el ensayo. Las bacterias sobrevivieron al paso por el intestino e incrementaron el número de lactobacilos encontrados en las heces de los participantes en un factor de 5. Tras 4 semanas se observó una sorprendente aunque significativa diferencia en la ganancia de peso entre los tres grupos. La principal cifra para la ganancia de peso fue 0,25 kg en el grupo que recibía el producto probiótico, 0,75 kg en el grupo que recibía la leche acidificada sin probióticos y 1,4 kg en el grupo que recibía el comprimido. Véase la figura 1.

2) Saciedad y satisfacción en seres humanos

En un estudio doble ciego y controlado con placebo se administró a seres humanos una leche acidificada que contenía probióticos en dos dosis diferentes o un placebo nº 1 consistente en la misma leche acidificada sin probióticos o un placebo nº 2 consistente en leche acidificada sin ninguna bacteria de ácido láctico. Los microorganismos probióticos LMG P 17806, NCFB 1748, y Bb12 (DSM15954), se añadieron al producto en una concentración final de 1×10^6 UFC/ml y 5×10^7 UFC/ml de cada cepa. Tras un desayuno estándar controlado, incluidos 3 dl de cualquiera de los cuatro productos, se pidió a los participantes que indicaran saciedad y hambre en una escala VAS (Escala Visual Analógica) directamente tras la comida y de forma continua cada media hora durante 4 horas. En el estudio se incluyó a un total de 10 personas y cada participante recibió los cuatro productos pero en diferentes ocasiones y se calcularon las diferencias relativas. Directamente después de la comida se produjo una ligera diferencia en las puntuaciones de saciedad entre los productos. La leche acidificada con probióticos a una concentración de 5×10^7 UFC/ml y 1×10^6 que da las puntuaciones más altas (puntuación VAS relativa 6,6 y 6,4 respectivamente) y el placebo nº 1 tenían una puntuación intermedia (puntuación VAS relativa 6,2) y el placebo nº 2 la más baja (puntuación VAS relativa 5,9). Las puntuaciones de saciedad disminuyeron tras las 3,5 horas a 3,1, 3,0, 2,5 y 2,2, respectivamente. La diferencia fue pequeña pero la diferencia entre los productos persistió y se observó una diferencia sobre la satisfacción para el producto probiótico con dos concentraciones diferentes de las bacterias. Concerniente al hambre se pudo ver la situación opuesta, es decir los productos probióticos dan una puntuación de hambre menor que los dos productos placebo. Directamente después de la comida, los dos productos probióticos dieron como resultado puntuaciones de hambre de 0,4 para ambos productos sobre la escala VAS, el placebo nº 1 una intermedia (puntuación VAS 0,9) y el placebo nº 2 dio una puntuación VAS sobre el hambre de 1,1. Tras 4 horas, las cifras fueron de 6,0, 6,2, 7,0 y 6,9 respectivamente.

Tras un desayuno estándar y las cuatro horas en las que se observaron los datos sobre saciedad y hambre se ofreció a los participantes comer una comida estándar. Se pidió a los participantes que comieran hasta que estuvieran agradablemente satisfechos y que intentaran conseguir el mismo nivel de plenitud tras cada desayuno diferente. Después de comer los productos probióticos, la ingesta de energía en la comida fue de 3690 kJ para el producto con un nivel alto de probióticos, de 3810 para el nivel bajo de probióticos. Para el placebo nº 1 fue 3850 y para el placebo nº 2 fue 3995. Esto muestra que los productos probióticos pueden reducir la ingesta de energía en una comida posprandial tras comer los productos probióticos como parte del desayuno.

3) Ingesta de alimentos de ratones

Ratones con flora normal de la cepa Swiss Webster recibieron leche acidificada que contenía LMG P-17806 o NCFB 1748 o un producto con la misma composición pero sin probióticos durante 10 días. Los ratones tenían entre 6 y 8 semanas de edad cuando se comenzó la administración. Los grupos a los que se administró probióticos contenían 7 ratones en cada grupo y el grupo de placebo consistía en 5 animales. Los microorganismos probióticos se añadieron a los productos en una concentración final de 1×10^8 UFC/ml y el número de bacterias era estable en el producto durante el periodo de alimentación. Los ratones recibieron dos dosis diarias estándar de los productos, una por sonda oral de 1 ml y una mediante inyección sublingual. Ambas bacterias probióticas sobrevivieron al paso por el intestino y estaban presentes en una cifra significativa en el intestino delgado y grueso de los ratones. Aparte de los productos probióticos y el producto placebo, los ratones tenían acceso *ad libitum* a la dieta de ingrediente purificado (D12450B de Research Diets Inc., New Jersey, EE.UU.). La ingesta diaria de alimentos se comparó entre los dos grupos de ratones que recibían cepas de *Lactobacillus* frente al grupo placebo de ratones. Los productos eran bien tolerados por los ratones.

Durante la segunda parte del periodo de alimentación, la ingesta de alimentos se redujo significativamente en los grupos de animales a los que se administró probióticos en comparación con el grupo que recibió el producto placebo. Véase la figura 2.

4) Depósito de grasa abdominal en ratones

Ratones con flora normal recibieron leche acidificada con producto probiótico que contenía LMG P-17806 o un producto placebo con la misma composición pero sin probióticos o se mantuvieron como grupo control al que se

administró el mismo pienso que a los otros dos grupos pero sin la leche acidificada. La cepa de ratones escogida fue C57B16 (Charles River) que es sensible a la obesidad inducida por la dieta. El número de animales incluidos en los diferentes grupos fue de 15 en cada uno de los grupos a los que se administró leche acidificada y 3 en el grupo control. Los ratones se introdujeron en el estudio cuando tenían 9 semanas de edad. El número de bacterias probióticas en el producto fue 1×10^8 UFC/ml y los ratones tuvieron acceso a al producto *ad libitum*, 5 días a la semana durante un número total de 12 semanas. Para una rápida ganancia de peso, se alimentó a los ratones con una dieta rica en grasas (D 12309 from Research Diets Inc. New Jersey, USA que contiene 36 % de grasas durante las primeras 5 semanas y, después, D 12492 (35% de grasas) de la misma empresa durante las semanas restantes del ensayo). Tras 12 semanas se sacrificó a los ratones y se analizaron los datos sobre ganancia de peso, consumo de alimentos y cantidad de grasa abdominal. Los ratones a los que se administró leche acidificada ganaron menos peso que los ratones control que no recibieron ninguna leche acidificada. Los ratones a los que se administró leche acidificada con probióticos también tenían un almacenamiento menor de grasa abdominal en comparación con el grupo que recibió leche acidificada sin probióticos y el grupo control que no recibía ninguna leche acidificada.

5) Expresión génica en ratones

Ratones con flora normal y sin gérmenes de la cepa Swiss Webster recibieron leche acidificada que contenía LMG P-17806 o NCFB 1748 o un producto con la misma composición pero sin probióticos durante 10 días. Los ratones tenían entre 6 y 8 semanas de edad cuando se comenzó la administración. Los grupos a los que se administró probióticos contenían 6 ratones en cada grupo y el grupo de placebo consistía en 4 animales. Los microorganismos probióticos se añadieron a los productos en una concentración final de 1×10^8 UFC/ml y el número de bacterias era estable en el producto durante el periodo de alimentación. Los ratones recibieron el producto a diario mediante alimentación por sonda oral. Durante el estudio, los ratones tenían acceso *ad libitum* a la dieta de ingrediente purificado (D12450B from Research Diets Inc., New Jersey, EE.UU.). Ambas bacterias probióticas sobrevivieron al paso por el intestino y estaban presentes en una cifra significativa en el intestino delgado y grueso de los ratones. Se sacrificó a los ratones y se analizó la expresión génica en el intestino delgado mediante tecnología de micromatriz con oligonucleótidos. Aparte de los efectos esperados sobre el sistema inmunitario, los efectos imprevistos sobre la expresión de una serie de genes implicados en el metabolismo energético y la homeostasis se encontró que eran diferentes en el grupo de placebo comparado con los dos grupos con probióticos. Entre os genes que mostraban un cambio significativo en la expresión fueron Scd1, Acp30, Adn, Thrsp, Car3, y Apo4, todos los cuales estaban regulados por aumento en los grupos que recibieron probióticos, y Retnlb que estaba regulado por disminución en los grupos que recibieron probióticos, en comparación con el grupo de placebo. El patrón de expresión génica diferencia fue muy similar para las cepas prebióticas usadas. La expresión diferencial de los genes de adiposina (Adn), adiponectina (Acp 30), anhidrasa carbónica 3 (Car3) y de tipo resistina (Retnlb) en ratones sin gérmenes se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real, véase la Figura 3. La Figura 4 muestra los niveles de expresión de la apolipoproteína A-IV (Apo4) en flora normal colonizada como se verifica mediante un abordaje de PCR cuantitativa en tiempo real.

6) Dosificación

La dosis total de las cepas individuales de las bacterias probióticas en los diferentes experimentos descritos anteriormente fue de 1×10^8 - 1×10^9 UFC (experimentos con ratones) y $2,5 \times 10^8$ - $2,5 \times 10^{10}$ (experimentos con seres humanos). Esta dosis tiene que administrarse en una porción o como una dosis diaria, es decir, una bebida para uso humano que se consuma en cantidades de 200-500 ml tiene que contener $0,5 \times 10^6$ - $1,25 \times 10^8$ UFC/ml de la cepa individual para que sea eficaz y una cápsula tiene que contener $0,5 \times 10^6$ - $1,25 \times 10^8$ UFC/ml de la bacteria en aproximadamente 1 g del contenido en la cápsula, es decir 1×10^8 - $2,5 \times 10^{10}$. Para las concentraciones más altas de la bacteria, la bacteria tiene que concentrarse mediante liofilización o desecación por rociado.

7) Preparación del producto

Las bacterias probióticas tienen que añadirse a productos basados en leche, cereales o frutas. Las bacterias reañadieron como un concentrado, por ejemplo liofilizado, y la supervivencia se ha analizado en las tres matrices. La supervivencia fue muy buena en los productos a base de leche y a base de cereales. En los productos a base de frutas, la supervivencia se ve afectada por el tipo de fruta. Como polvo liofilizado se tienen que tomar precauciones sobre la actividad del agua y la exposición al oxígeno. Los resultados de la producción del producto se pueden ver en la Tabla 1.

Las bacterias probióticas también se pueden añadir a los productos a base de leche junto con otras bacterias de ácido láctico para la producción de diferentes tipos de productos cultivados. En este ambiente, las bacterias probióticas se pueden multiplicar y se ajustarán bienal ambiente ácido, dando una buena supervivencia también al pH bajo final en dichos productos. Los resultados de la producción del producto se pueden ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Supervivencia de las bacterias probióticas en diferentes matrices de productos medida como millones de UFC/g. Los productos se almacenaron a 8 °C.

Bacteria	Leche	Granizado de leche/fruta	Bebida de cereales	Polvo liofilizado en mezcla de cereales	Zumo de frutas de grosella	Zumo de frutas de manzana	Bebida de yogur	Yogur	Leche agria
LMG P-17806, día 1	53	56	50	45	46	53	67	70	74
LMG P-17806, día 21	55	51	52	39	13	35	55	75	63
NCFB 1748, día 1	50	53	56	43	50	55	57	56	60
NCFB 1748, día 21	42	43	43	37	3	30	32	42	44
Bb12, día 1	59	60	65	65	62	67	62	73	68
Bb 12, día 21	49	47	60	31	14	49	51	68	60

5 **Referencias:**

1) Agerholm, I., M.I. Bell, G.k. Grunwald y A. Astrup. 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur. J. clin. Nutr.* 54:856-860.

2) Ali A. A., I. A. Mohamed, C. T. Hansen, T. Wang, M. T. Velasquez and S. J. Bhathena. 2002. Effect of probiotics and isoflavones on metabolic parameters in a genetic model of obesity and diabetes. *FASEB J.* 16:p A1014.

3) Ali. A. A., M. T. Velasquez, C. T. Hansen, A. I. Mohamed, y S. J. Bhathena. 2004. Effect of soybean isoflavones, probiotics and their interactions on the metabolism and endocrine system in an animal model of obesity and diabetes. *J. Nutritional Bioch.* 15:583-590.

4) Bojrab G.. 2000. Composition and method for treatment of gastrointestinal disorders and hyperlipidemia. patente de los EE. UU. 6 696 057

5) Bojrab G.. 2000. Composition for treatment of obesity. patente de los EE. UU. 6 641 808.

6) Bojrab G.. 2001. Composition, of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*, for the treatment of gastrointestinal disorders, hyperlipidemia, autoimmune diseases, and obesity. *Solicitud de patente europea* 1 177 794.

7) Bäckhed F., H Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich yd J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS* 101:15718-15723.

8) Di Caro S., H. Tao, A. Grillo, C. Elia, G. Gasbarrini, A. R. Sepulveda, y A. Gasbarrini. 2005. Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Digestive and Liver Disease* 37:320-329.

9) Gorsek W. F. 2000. Weight loss composition containing green tea, hydroxycitric acid, 5-hydroxytryptophane, glucomannan, picolinate and *Lactobacillus*. patente de los EE. UU. 6 383 482.

10) Gorsek W. F.. 2002. Thermogenic weight management composition. patente de los EE. UU. 6 565 847.

11) Hooper L. V., M Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk y J.I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationship in the intestine. *Science* 291 (5505):881-884.

12) Park H. O., Y. B. Bang, H. J. Joung, B. C. Kim y H. R. Kim. 2004. *Lactobacillus* KTCK 0774BP and *acetobacter* KCTC 0773BP for treatment or prevention of obesity and diabetes mellitus. patente de los EE. UU. 6 808 703.

13) Pereira D. I. y G. R. Gibson. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem Mol Biol.* 37:259-281.

14) Stepan C. M., S. T. Balley, S. Bath, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahlma, y M. A. Lazar. 2001. The hormone resistine links obesity to diabetes. *Nature* 409:307.

15) Song S.H., S. K. Kang, j. H. Kim, y H. Park, y H. O. Park 2002. Microorganisms for inhibiting obesity and diabetes mellitus. *Solicitud de patente PCT* WO 04/014403.

16) Yanagida F., y K. Sano. 2000. Obesity preventative food. *Solicitud de patente japonesa* 2001-292728.

17) Tabuchi M., Ozaki M., Tamura A., Yamada N., Ishida T., Hosoda M., Hosono A. 2003. Antidiabetic effect of *Lactobacillus* GG in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* Jun;67(6):1421-4.

18) Kalavathy R., Abdullah N., Jalaludin S., Ho Y.W. 2003. Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *Br Poult Sci.* Mar;44(1):139-44.

19) Matsuzaki T., Nagata Y., Kado S., Uchida K., Kato I., Hashimoto S, Yokokura T. 1997. Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *APMIS.* Aug;105(8):643-920)

20) Ohlson K., Björneholm S., Fonden R., Svensson U., 2002. *Lactobacillus* F19: A probiotic strain suitable for consumer products. *Microbial ecology in health and disease.* Vol 14, suplemento 3:27-32.

21) Sullivan A., Barkholt L., Nord C.E. 2003. *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* F19 prevent antibiotic-associated ecological disturbances of *Bacteroides fragilis* in the intestine. *J Antimicrob Chemother* Aug;52(2):308-11.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para disminuir la ganancia de peso, en la que al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 10 2. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para incrementar la saciedad, en la que al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748), *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 15 3. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para prolongar la satisfacción, en la que al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748), *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 20 4. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para reducir la ingesta de alimentos, en la que al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748), *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 25 5. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para la regulación por incremento de la expresión de un gen seleccionado del grupo consistente en *Scd1*, adiponectina (*Acrp 30*), adiposina (*Adn*), *Thrsp*, anhidrasa carbónica 3 (*Car3*) y apolipoproteína A-IV (*Apoa4*), en el que al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748), *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 30 6. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para potenciar la sensibilidad a la insulina o tratar la insensibilidad a la insulina, en la que la sensibilidad potenciada a la insulina se debe a la regulación por disminución de la expresión de la beta de tipo resistina (*Retnlb*), EN LA QUE al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748), *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 35 7. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para disminuir el riesgo de desarrollar un síndrome metabólico, incluyendo obesidad, depósito de grasa abdominal y diabetes de tipo II, en el que al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748), *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 40 8. Uso de al menos una bacteria probiótica para la fabricación de un producto probiótico para disminuir el almacenamiento de grasa abdominal, en el que al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954).
- 45 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que se caracteriza porque la bacteria prebiótica se usa para fabricar un producto seleccionado del grupo que consiste en un producto basado en leche, un producto basado en cereal o un producto basado en frutas o composiciones derivadas de la misma.
- 50 10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, que se caracteriza porque la bacteria prebiótica se usa como concentrado, por ejemplo liofilizado.
- 55 11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, que se caracteriza porque la bacteria prebiótica está comprendida en una cápsula.
- 60 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11, que se caracteriza porque la cápsula contiene una dosis de la bacteria prebiótica entre 1×10^8 UFC y $2,5 \times 10^8$ UFC.
- 65 13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, en el que el producto probiótico se selecciona del grupo que consiste en un producto alimentario, un producto de pienso, un suplemento dietético, un remedio natural y una formulación activa farmacéutica.
14. Un producto probiótico que comprende al menos una bacteria prebiótica seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) para uso en la disminución de la ganancia de peso, incremento de la saciedad, prolongación de la satisfacción, reducción de la ingesta de alimentos o disminución del almacenamiento de la grasa abdominal.
15. Un producto probiótico que comprende al menos una bacteria probiótica seleccionada del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748), *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) para usar en la regulación por incremento de la expresión de un gen seleccionado del grupo que

consiste en Scd1, adiponectina (Acrp 30), adipsina (Adn), Thrsp, anhidrasa carbónica 3 (Car3) y apolipoproteína A-IV (Apoa4).

- 5 16. Un producto probiótico que comprende al menos una bacteria probiótica seleccionada del grupo consistente en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) usar en potenciar la sensibilidad a la insulina o tratar la insensibilidad a la insulina, en la que la sensibilidad potenciada a la insulina se debe a la regulación por disminución de la expresión de la beta de tipo resistina (Retnlb).
- 10 17. Un producto probiótico que comprende al menos una bacteria prebiótica seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) para uso en la disminución del riesgo de desarrollo de un síndrome metabólico, incluyendo obesidad, depósito de grasa abdominal y diabetes de tipo II.

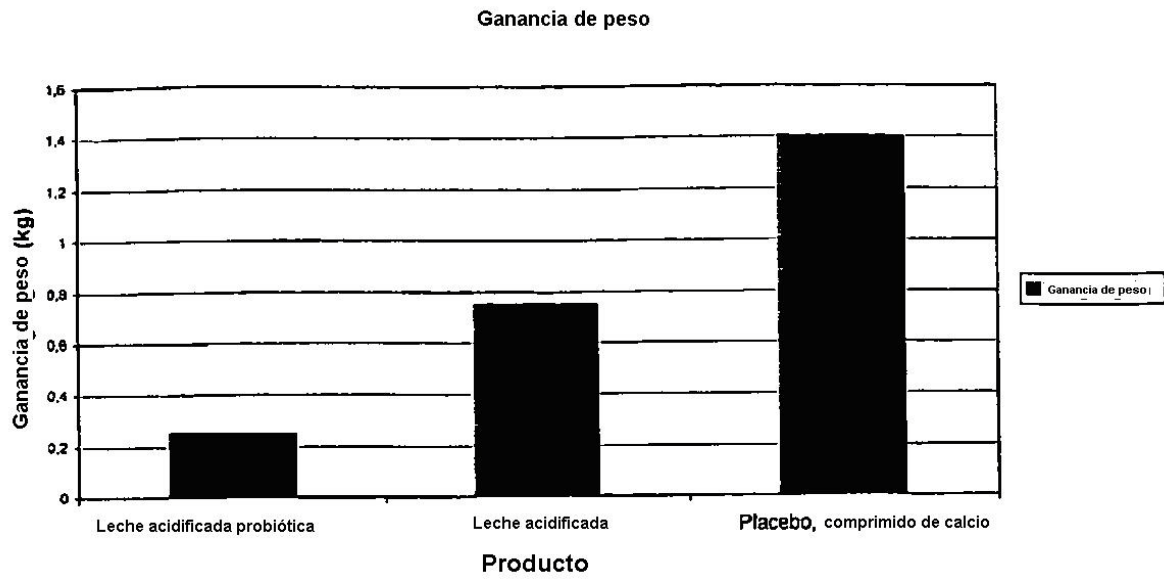


Figura 1. Efecto de los probióticos sobre la ganancia de peso en seres humanos tras 4 semanas de tratamiento.

Producto	Ganancia de peso (kg)	Sd	Significación*
Leche acidificada probiótica	0,25	0,25	a
Leche acidificada	0,75	0,3	A,b
Placebo, comprimido de calcio	1,4	0,35	B

*Letras diferentes= diferencia significativa $p < 0,05$

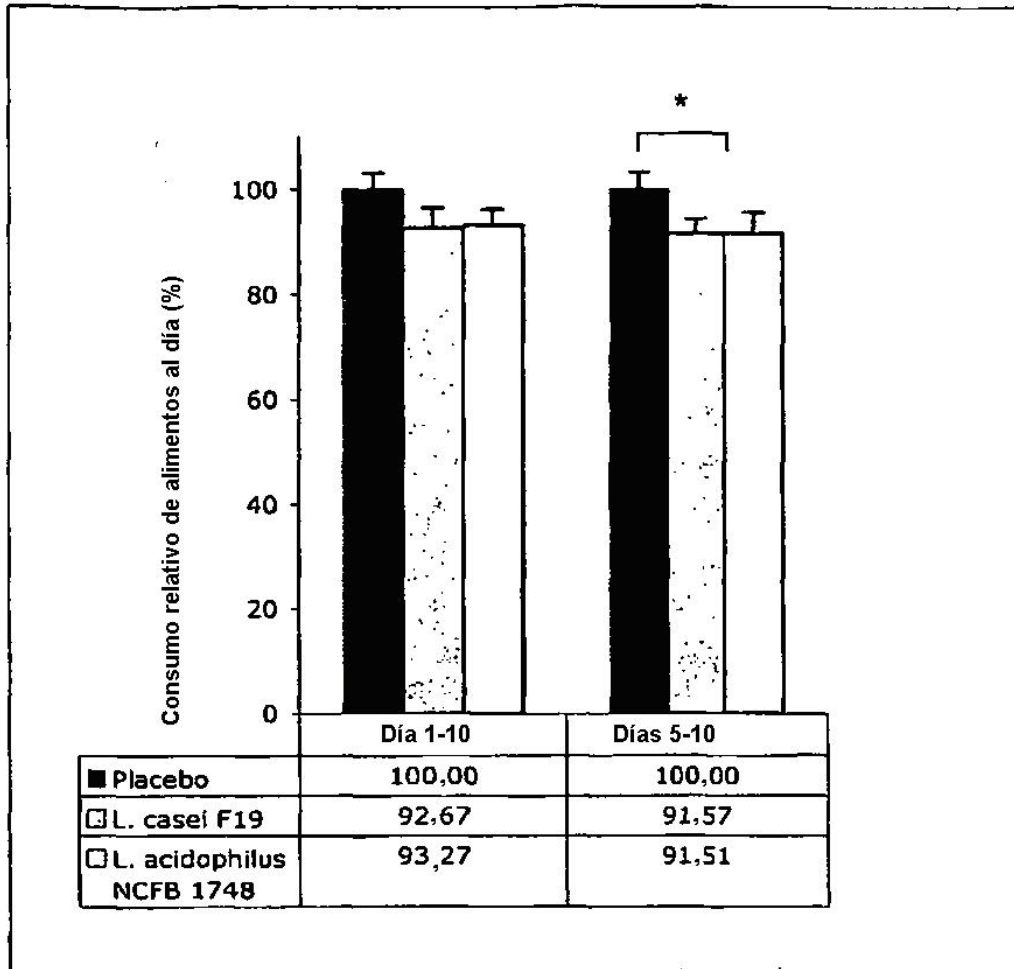


Figura 2. Ingesta diaria de alimentos en dos grupos de ratones que reciben bacterias probióticas *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806) o *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748, en leche acidificada frente al grupo de ratones con placebo que recibieron leche acidificada solo. El consumo de alimentos se estima para todo el periodo de administración del producto (día 1-10) y tras el periodo de ajuste (día 5-10). Los resultados se expresan como el porcentaje comparado con el grupo ratones con placebo. La significación estadística se determina mediante pruebas t de Student no pareadas y de dos colas.

*representa $p \leq 0,05$.

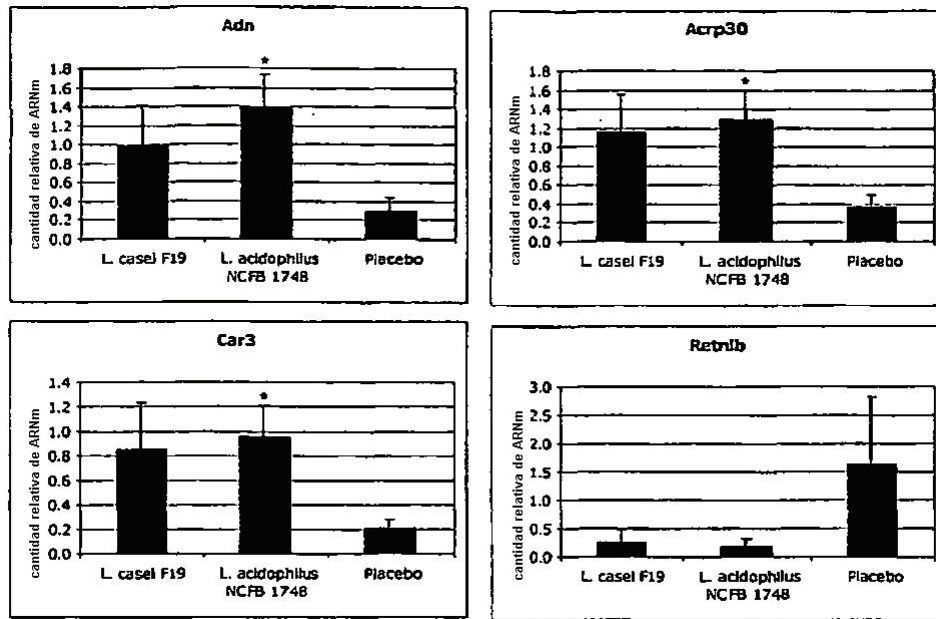


Figura 3. Expresión de los genes adipsina (Adn), (Adn), adiponectina (Acrp 30), anhidrasa carbónica 3 (Car3) y beta de tipo resistina (Retnlb) mediante PCR cuantitativa en tiempo real en ratones sin gérmenes. Los dos grupos de ensayo de ratones recibieron bacterias probióticas *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806) o *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 en leche acidificada mientras que el grupo de ratones solo recibió leche acidificada. Cada barra representa la media \pm SEM. La significación estadística se determina mediante pruebas t de Student no pareadas y de dos colas. * representa $p \leq 0,05$. $n = 6$ para los dos grupos probióticos y $n = 4$ para el grupo de placebo.

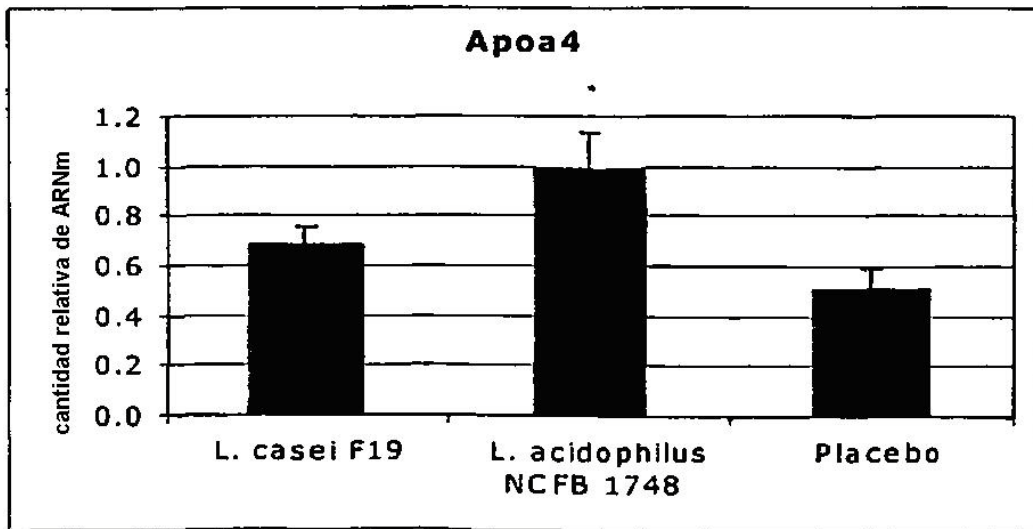


Figura 4. Expresión del gen de la apolipoproteína A-IV (Apo4) mediante PCR cuantitativa en tiempo real en ratones colonizados con microflora normal. Los dos grupos de ensayo de ratones recibieron bacterias probióticas *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806) o *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 en leche acidificada mientras que el grupo de placebo de ratones solo recibió leche acidificada. Cada barra representa la media \pm SEM. La significación estadística se determina mediante pruebas t de Student no pareadas y de dos colas. * representa $p \leq 0,05$. $n = 6$ para los dos grupos probióticos y $n = 4$ para el grupo de placebo.