

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 942**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)

A23L 1/29 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2008 E 08741827 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2136825**

54 Título: **Uso de *Lactobacillus plantarum* para aumentar la diversidad bacteriana**

30 Prioridad:

01.03.2007 SE 0700551

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

10.03.2014

73 Titular/es:

**PROBI AB (100.0%)
SÖLVEGATAN 41
223 70 LÜND, SE**

72 Inventor/es:

**MOLIN, GÖRAN;
AHRNE, SIV;
KARLSSON, CAROLINE y
JEPSSON, BENGT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 446 942 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

Uso de *Lactobacillus plantarum* para aumentar la diversidad bacteriana

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de una cepa de *Lactobacillus plantarum* para la fabricación de una composición para aumentar la diversidad del tubo digestivo y al uso de una cepa de *Lactobacillus plantarum* para la fabricación de una composición para tratamiento profiláctico.

Técnica anterior

10 Hay un consenso general en biología de que es beneficiosa una alta diversidad (variación de diferentes tipos de organismos) para el ecosistema global así como para los locales más limitados y también para el ser humano individual. Una alta diversidad indica que el ecosistema está en un equilibrio saludable. Por el contrario, un ecosistema desequilibrado o alterado o enfermo permite que se produzca "sobrecrecimiento" de unos pocos organismos, invadiendo el sistema y causando más alteraciones y nuevas afecciones. Esto también se aplica al ecosistema del intestino humano.

15 La flora bacteriana del tubo digestivo (GI, por sus siglas en inglés) humano es un ecosistema complejo. La composición y la actividad de la flora bacteriana desempeñan funciones importantes en la salud humana debido a su contribución a la nutrición, al desarrollo y constante ajuste del sistema inmunitario y resistencia a la colonización. El tubo GI se puede considerar como un tubo especializado que se extiende de la boca al ano. Se divide en varias regiones anatómicas definidas, incluyendo boca, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) e intestino grueso (ciego, colon y recto). Las concentraciones bacterianas en el estómago y los dos tercios superiores del intestino delgado (duodeno y yeyuno) son relativamente bajas debido a la acidez en el estómago, la corta duración del tránsito de contenido, secreción de bilis y jugo pancreático. La concentración está normalmente en el intervalo de 10^2 a 10^4 unidades formadoras de colonias de bacterias (cfu) por ml de contenido gástrico o intestinal y ejemplos de bacterias residentes típicas en estas regiones son *Streptococcus* y *Lactobacillus*. La parte distal del intestino delgado (íleon) tiene normalmente una concentración de 10^7 - 10^8 cfu por ml y está dominada normalmente por los mismos tipos de bacterias que se encuentran en el colon, es decir, diferentes clases de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria* y *Bifidobacterium* (WANG, M., AHRNÉ, S., JEPSSON, B. y MOLIN, G. (2.005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbial Ecology* 54: 219-231). La concentración más alta de bacterias se encuentra en el intestino grueso debido a la duración más prolongada del tránsito (hasta 60 h). Se ha estimado que la biomasa bacteriana constituye el 40-55% de los sólidos fecales y la concentración de bacterias vivas está normalmente alrededor de 10^{10} - 10^{11} cfu por g de contenido intestinal. En un colon no alterado, equilibrado y sano también está en su máximo la diversidad bacteriana. Sin embargo, debido a la extremadamente alta concentración bacteriana, el colon es también la parte del tubo GI que es la más vulnerable para traslocación donde viven bacterias o las partes tóxicas de las bacterias pasan por la barrera mucosal y a los nódulos linfáticos mesentéricos y otros sitios extra-intestinales, tales como el bazo, hígado, riñón, cavidad peritoneal y torrente circulatorio. La baja diversidad bacteriana (LBD, por sus siglas en inglés) aumenta el riesgo de sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO, por sus siglas en inglés) y sobrecrecimiento en el intestino delgado (SIBO, por sus siglas en inglés), que puede conducir a traslocación.

40 Se ha demostrado en el campo técnico que la diversidad del tubo digestivo en pacientes con enfermedad de Crohn es baja, [Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnand E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., Nalin R., Jarrin C., Chardon P., Marteau P., Roca J., y Doré J. (2.006). Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut* 55: 205-211] [Ott S. J. Musfeldt M., Wenderoth D. F., Hampe J., Brant O., Fölsch U. R., Timmis K. N., y Schreiber S. (2.004) Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory disease. *Gut* 53: 685-693].

45 Se ha demostrado además que el recién nacido con una baja diversidad en el tubo digestivo corre un mayor riesgo de llegar a ser alérgico, [Wang, M., Karlsson, C., Olsson, C., Adlerberth, I., Wold, A., Strachan, D. P., Martriacardi, P. M., Åberg, N., Perkin, M. R., Tripodi, S., Hesselmar, B., Saalman, R., Molin, G. y Ahrné, S. (2.008). Reduced diversity in the early fecal microbiota of infants developing atopic eczema: Low diversity in early microbiota of infants developing atopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121: 129-134.

50 Se ha demostrado además que las ratas hembra que experimentan "sobrecrecimiento" (baja diversidad) en el tubo digestivo dieron a luz bebés con un nivel de haptoglobina aumentado e intestino inmaduro, [FAK, F., Ahrné, S., Molin, G., Jeppsson, B. y Weström, B. (2.008). Microbial manipulation of the rat dam changes bacterial colonization and alters properties of the gut in her offspring. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 294: 148-154.

55 Así, parece haber una conexión entre baja diversidad en el tubo digestivo y varios estados fisiológicamente alterados en seres humanos y otros mamíferos.

Se sabe que el uso de antibióticos disminuye la diversidad bacteriana en el tubo digestivo. Como el uso de

antibióticos es enorme en el mundo hay por supuesto una necesidad en el campo técnico de proporcionar nuevas formas de superar este problema de baja diversidad en el tubo digestivo, afectando dicha baja diversidad a la salud general de la especie humana.

5 Se sabe además en general que el estilo de vida de la especie humana en los países desarrollados ocasiona muchas alteraciones poco sanas y enfermedades tales como las enfermedades cardiovasculares a la vista por ej., del estrés y sobrepeso. Se sabe que las personas con estas alteraciones y afecciones tienen con frecuencia una baja diversidad bacteriana en el tubo digestivo.

Así, hay una necesidad en el campo técnico de superar el problema de los estados fisiológicamente alterados relacionados con o debidos a una baja diversidad en el tubo digestivo de los individuos.

10 La patente internacional WO 01/11077 A2 desvela métodos de diagnóstico o tratamiento de síndrome del intestino irritable y otros trastornos causados por sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SIBO) por administración de agentes antimicrobianos o probióticos, por ej., una especie de Bifidobacterium o Lactobacillus, o normalización de la motilidad intestinal por empleo de un agente procinético.

Sumario de la invención

15 Los problemas ya mencionados se resuelven mediante la presente invención.

La presente invención se define por las reivindicaciones.

20 La presente invención se refiere a una composición que comprende una cepa de Lactobacillus plantarum según la reivindicación 1, para uso en el tratamiento o la profilaxis de baja diversidad bacteriana (LBD); sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO) o sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) traslocación asociada a y de un LIBO o SIBO individual por aumento de la diferencia de índices de diversidad del tubo GI comparado con placebo.

25 La presente invención también se refiere al tratamiento de uno o una amplia serie de estados fisiológicamente alterados basados en una baja diversidad bacteriana (LBD) en el tubo digestivo (GI) de un individuo, opcionalmente inducidos por sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) y/o sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO), por mejora y/o aumento de la diversidad bacteriana y erradicación del sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) y sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO) en el intestino.

Además, la presente invención se refiere a una cepa de Lactobacillus plantarum para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

Breve descripción de los dibujos

30 La Fig. 1 representa el perfil T-RFLP de genes de ARNr 16S digeridos por HaeIII multiplicados a partir de mucosa humana.

Descripción detallada de la invención

35 Es totalmente inesperado según la presente invención que la administración de una sola cepa de Lactobacillus plantarum aumente la diversidad del tubo digestivo, es decir, que aumente el número total de diferentes tipos de bacterias en el tubo digestivo proporcionando sólo una sola cepa. Así, no es sólo una cantidad aumentada de la cepa administrada lo que se observa, sino también un aumento de otros tipos bacterianos. Además, la administración y colonización de dicha única cepa de Lactobacillus plantarum permite que se produzca el crecimiento de nuevos grupos bacterianos que no han podido crecer previamente en el tubo digestivo del individuo. Esto está en contraposición con lo que se ha sugerido en la técnica, donde se ha sugerido que sólo una mezcla de diferentes cepas bacterianas puede proporcionar una mezcla de cepas bacterianas en el tubo digestivo, es decir, una diversidad aumentada. Así, dentro del campo técnico con frecuencia se ponen objeciones a proporcionar sólo una sola cepa en vista de la presunción de que la diversidad biológica disminuye de ese modo. En otras palabras, el principal argumento para proporcionar mezclas de diferentes tipos de bacterias es que estas mezclas satisfagan el requerimiento de la diversidad.

45 Por lo tanto, es totalmente inesperado según la presente invención que la administración de sólo una sola cepa de Lactobacillus plantarum proporcione una diversidad aumentada.

50 Como se indicó anteriormente, los individuos que tienen uno o más estados fisiológicamente alterados diferentes, como se define a continuación, con frecuencia muestran simultáneamente LBD (Baja Diversidad Bacteriana), que o es una razón tras los estados alterados o está causada por los estados alterados. La LBD como tal no se tiene que considerar como una enfermedad ordinaria, sino que puede conducir a estados fisiológicamente alterados incluyendo diferentes enfermedades o a LIBO (Sobrecrecimiento Bacteriano en el Intestino Grueso) o SIBO (Sobrecrecimiento Bacteriano en el Intestino Delgado) durante el transcurso del tiempo. Aunque LIBO y SIBO no son necesariamente un resultado de LBD, este es el caso con frecuencia. Un individuo que tiene LIBO o SIBO también tiene automáticamente LBD en el tubo digestivo. LIBO y SIBO no se tienen que considerar como tales tampoco

como enfermedades ordinarias, sino que cada uno implica un riesgo considerable de desarrollo de varios estados fisiológicamente alterados incluyendo diferentes enfermedades, como se define a continuación, por ej., traslocación. LIBO y SIBO pueden ser alternativamente un resultado de diferentes estados fisiológicamente alterados. La composición según la presente invención se puede administrar a un individuo sano para tratamiento profiláctico contra el desarrollo de LBD. Además, dicha composición también se puede administrar a un individuo que tiene LBD, con independencia del origen de la LBD, para tratamiento profiláctico contra el desarrollo de uno o más estados fisiológicamente alterados, SIBO o LIBO. Por otra parte, dicha composición también se puede administrar a un individuo que tiene LIBO o SIBO, con independencia del origen del mismo, para tratamiento profiláctico contra el desarrollo de uno o más estados fisiológicamente alterados, por ej., traslocación. En una realización más, los individuos que tienen LBD y/o SIBO y/o LIBO y al mismo tiempo que también padecen uno o más de los estados fisiológicamente alterados ya mencionados se pueden someter a administración con dicha composición con vistas a aumentar la diversidad bacteriana en el tubo digestivo y de ese modo mejorar el estado de salud global del individuo, opcionalmente también aliviando los efectos de dicho o dichos estados más fisiológicamente alterados.

La diversidad aumentada observada en relación a la presente invención se puede medir en la forma de un índice de diversidad medido por el conocido método T-RFLP usando la enzima HaeIII para corte y cálculo de los índices de Shannon-Weaner y Simpson descritos a continuación. Dicha diferencia de índices de diversidad aumentada es al menos 0,15, preferiblemente 0,30, más preferiblemente 0,45 e incluso más preferiblemente 0,60 cuando se usa el índice de Shannon-Weaner.

Dicha diferencia de índices de diversidad aumentada es al menos 0,02, preferiblemente 0,04, más preferiblemente 0,06 e incluso más preferiblemente 0,08, cuando se usa el índice de diversidad de Simpson.

El cálculo de la diferencia de índices de diversidad ($D_{i\text{dif_total}}$) se realiza por, en una primera etapa, cálculo de la diferencia de diversidad ($D_{i\text{dif}}$) de los individuos que toman el producto que contiene una cepa de *Lactobacillus plantarum*, es decir, al valor del índice de diversidad después de ingesta ($D_{i\text{después_producto}}$) de cepa se sustrae el valor del índice de diversidad antes de la ingesta ($D_{i\text{antes_producto}}$), que se divide por (n_{producto}) que es el número de individuos que toman el producto. Después, al valor obtenido en la primera etapa anterior se sustrae la diferencia de diversidad obtenida para el placebo ($D_{i\text{placebo_total}} = D_{i\text{después_placebo}} - D_{i\text{antes_placebo}}$) dividido por n_{placebo} que es el número de individuos que toman el placebo. La ecuación para la diferencia de índices de diversidad es como sigue:

$$D_{i\text{dif_total}} = \frac{\sum(D_{i\text{después_prod}} - D_{i\text{antes_producto}}) / (n_{\text{producto}}) - \sum(D_{i\text{desp_placebo}} - D_{i\text{antes_placebo}}) / (n_{\text{placebo}})}{n_{\text{placebo}}}$$

El índice de diversidad se podía medir, por supuesto, por otros medios conocidos y un experto en la materia realiza lo que podían dichos otros medios conocidos. Además, la enzima usada para el corte, HaeIII, podía ser reemplazada por cualquier otra enzima conocida.

La salud general de la especie humana podía llegar a ser mejor en vista del índice de diversidad aumentado proporcionado en el tubo digestivo según la presente invención. Ya se ha discutido anteriormente que muchas alteraciones fisiológicas están relacionadas con un bajo índice de diversidad. Pudiendo tomar fácilmente una cepa de *Lactobacillus plantarum* en la forma de una formulación sólida o líquida, por ejemplo un producto alimenticio como se discute a continuación, facilita que los individuos se mantengan sanos.

Además, el índice de diversidad aumentado proporcionado en la presente memoria contrarresta los efectos negativos de la sociedad moderna y el estado de bienestar físico. Por ejemplo, como se discutió anteriormente la enorme cantidad de antibióticos tomada en el mundo elimina el equilibrio en el tubo GI. Este equilibrio eliminado podía llegar a ser normal y saludable de nuevo proporcionando una cepa de *Lactobacillus plantarum* según la invención.

Además, se cree que muchos estados fisiológicamente alterados de la sociedad moderna se podían prevenir por la continua ingesta de una cepa de *Lactobacillus plantarum* según la invención.

En una realización de la invención, dicha composición es una formulación líquida o una formulación sólida, en la que dicha formulación sólida se selecciona del grupo que consiste en: comprimidos, comprimidos para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobrecitos, polvos, gránulos, partículas recubiertas y comprimidos recubiertos, comprimidos enterorrecubiertos y cápsulas y tiras y películas de fusión y dicha formulación líquida se selecciona del grupo que consiste en: disoluciones orales, suspensiones, emulsiones y jarabes. La composición de la invención se puede administrar según cualquier medio convencional. Sin embargo, la cepa se administra preferiblemente por vía oral.

En una realización de la invención, dicha composición comprende un material portador, en la que dicho material portador se selecciona independientemente del grupo que consiste en: gachas de harina de avena, alimentos fermentados de ácido láctico, almidón resistente, fibras alimenticias, carbohidratos, proteínas y proteínas glicosiladas.

- En una realización de la invención dicha composición es un alimento médico, un alimento funcional, un suplemento dietético, un producto nutricional o una preparación alimenticia. Así, se puede proporcionar la cepa de *Lactobacillus plantarum* a los individuos de muchas formas diferentes. Dicha preparación alimenticia se puede seleccionar del grupo que consiste en: bebidas, yogures, zumos, helados, panes, galletas, cereales, barras energéticas y pastas para untar. Así, se observa que la composición se podía tomar fácilmente en la forma de un producto alimenticio sobre una base diaria. Así, la salud general de la especie humana podía llegar a ser mejor por el uso de la composición según la invención.
- La cepa de *Lactobacillus plantarum* está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{14} CFU (unidades formadoras de colonias), preferiblemente de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{12} y más preferiblemente de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 1×10^{11} .
- La expresión "diferencia de diversidad aumentada comparada con placebo" usada por todo el texto de la solicitud significa que el cambio de diversidad bacteriana de los individuos a los que se administraron las cepas de *Lactobacillus plantarum* se comparó con otros individuos a los que se administró durante el tiempo del estudio un producto similar pero sin la cepa de *Lactobacillus plantarum*. Estos tipos de estudios son ciegos, es decir, durante el estudio ni los voluntarios ni las personas que manipulan el estudio y analizan los resultados conocen qué individuo recibió placebo y cual recibió producto de tratamiento. Esto excluye muchas fuentes de error y resultados falsos.
- La expresión "sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO)" usada por todo el texto de la solicitud significa que uno o algunos tipos bacterianos en alto grado dominan la flora bacteriana del intestino grueso, es decir, están presentes en números considerablemente mayores que la mayoría de otros tipos de bacterias.
- La expresión "sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO)" usada por todo el texto de la solicitud significa que uno o algunos tipos bacterianos en alto grado dominan la flora bacteriana del intestino delgado, es decir están presentes en números considerablemente mayores que la mayoría de otros tipos de bacterias.
- La expresión "baja diversidad bacteriana (LDB)" usada por toda la solicitud significa una composición bacteriana desequilibrada en el tubo digestivo de un individuo que puede ser definida por una diferencia de índices de diversidad de al menos 0,15 según el índice de diversidad de Shannon-Weaner o una diferencia de índices de diversidad de al menos 0,02 según el índice de diversidad de Simpson. Se debería observar que el término "diversidad" usado a veces en el presente texto de la solicitud se desea que signifique "diversidad bacteriana".
- La expresión "estados fisiológicamente alterados" usada por todo el texto de la solicitud significa cualquier estado de salud o afecciones no deseadas en relación a o debido a la presencia de LDB y/o la presencia de LIBO o SIBO, tales como trastornos gastrointestinales, por ej., traslocación, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable y afecciones no deseadas debido a ingesta de antibióticos. Además LDB, SIBO y LIBO pueden ser factores negativos para el desarrollo de trastornos coronarios, enfermedad del hígado graso no alcohólico, diabetes tipo 2, alergias, eccema atópica y autoinmunidad.
- La expresión "para aumentar la diversidad del tubo digestivo" usada por todo el texto de la solicitud significa que se obtiene una flora aumentada de microorganismos en el tubo digestivo en la forma de presencia de diferentes tipos de bacterias. Esto significa que el riesgo de "sobrecrecimiento" de ciertas bacterias negativas disminuye, conduciendo a una salud general mejor de los individuos. Así, el sobrecrecimiento de ciertas bacterias en el tubo GI disminuye según la invención. De este modo, se proporciona un equilibrio deseable.
- Se mide el índice de diversidad por el método T-RFLP usando la enzima HaeIII para corte y cálculo del índice de Shannon-Weaner y el índice de diversidad de Simpson.
- Como se indicó anteriormente, la presente invención también se refiere al tratamiento de uno o una amplia serie de estados fisiológicamente alterados basados en una baja diversidad bacteriana (LDB) en el tubo digestivo (GI) de un individuo, opcionalmente inducidos vía sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) y/o sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO), por mejora y/o aumento de la diversidad bacteriana y erradicación del sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO) y sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO) en el intestino. La LDB se trata por ingestión de una cepa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL-9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL-19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL-99, DSM 15316.
- L. plantarum* es una especie bacteriana en el vasto y relativamente diverso género de *Lactobacillus*, que comprende aproximadamente 90 especies o subespecies denominadas de manera válida. Por tradición, el *Lactobacillus* spp., se ha dividido en tres grupos funcionales dependiendo de sus capacidades de fermentación; los obligadamente homofermentativos (Grupo I), los facultativamente heterofermentativos (Grupo II) y los obligadamente heterofermentativos (Grupo III). El Grupo I fermenta las hexosas exclusivamente a ácido láctico y no puede fermentar gluconato o pentosas, mientras el Grupo II también fermenta las hexosas a ácido láctico pero puede fermentar adicionalmente pentosas y/o gluconato. El Grupo III fermenta las hexosas a ácido láctico, ácido acético y/o etanol y dióxido de carbono. *L. plantarum* es facultativamente heterofermentativo. La cepa tipo de *L. plantarum* es ATCC 14917.

L. plantarum difiere de muchos otros *Lactobacillus* spp., en los siguientes puntos:

1) *L. plantarum* presenta un genoma relativamente grande, que indica la capacidad para adoptar muchos estados diferentes.

2) *L. plantarum* posee una acusada capacidad para fermentar muchos diferentes carbohidratos.

5 3) *L. plantarum* presenta un alto requerimiento de crecimiento para manganeso y puede acumular altos niveles intercelulares de manganeso. El manganeso proporciona una defensa para *L. plantarum* contra toxicidad por oxígeno por la reducción de radicales oxígeno a H₂O₂. El H₂O₂ producido se puede convertir después en O₂ y agua por pseudo-catalasa cointegrada de manganeso.

10 4) *L. plantarum* presenta una alta tolerancia a pH bajo. El hecho de que *L. plantarum* predomine frecuentemente en alimentos fermentados de ácido láctico espontáneamente en el caso de que el pH normalmente esté por debajo de 4,0 y también sobreviva al paso por los estados ácidos del estómago humano, señala su alta resistencia a las condiciones ácidas.

5) *L. plantarum* puede poseer actividad de la tanasa y también puede metabolizar ácidos fenólicos.

15 *L. plantarum* con frecuencia tiene lugar espontáneamente, en cifras altas, en la mayoría de los alimentos fermentados de ácido láctico, especialmente cuando el alimento se basa en material vegetal, por ejemplo, en aceitunas en salmuera, alcaparras (bayas de alcaparra), chucrut, pepinillos salados, masa fermentada, ogi de Nigeria (hecho de maíz o sorgo), kocho de Etiopía (hecho de almidón de *Ensete ventricosum*), masa fermentada de Etiopía hecha de tef (*Eragrostis tef*) y casava. Así, es obvio que los individuos que consumen productos fermentados de ácido láctico de origen vegetal también consumen grandes cantidades de *L. plantarum*. Además, *L. plantarum* se da en zumo de uva y vino. *L. plantarum* con frecuencia se da en la mucosa gastrointestinal humana, de la boca al recto [Molin, G., Jeppsson, B., Ahrné, S., Johansson, M.-L., Nobaek, S., Ståhl, M., y Bengmark, S. (1.993). Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines, *J. Appl. Bacteriol.* 74: 314-323; Ahrné, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A., y Molin, G. (1.998). La flora de *Lactobacillus* normal de mucosa rectal y oral humana sana, *J. Appl. Microbiol.* 85: 88-94]]. Por lo tanto, es obvio que la especie *L. plantarum* presenta una única posición con respecto a alimento humano y el intestino humano y en la perspectiva de que los seres humanos han ingerido alimentos fermentados de ácido láctico desde el comienzo ya que esto es un procedimiento espontáneo si se prensan materiales vegetales en un área cerrada, en un hoyo en el suelo, por ejemplo, se puede entender que un organismo que domine de manera natural en estos entornos tenga también un papel fundamental que desempeñar en el intestino humano.

30 Ejemplos

Medición de diversidad

El análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP) es un método de huellas dactilares comunitario basado en la digestión de endonucleasa de restricción de productos PCR marcados en el extremo de manera fluorescente y revela información para los dos grupos bacterianos, conocido y desconocido. Se generan patrones de T-RFLP en una serie de etapas: En pocas palabras, se extrae ADN comunitario directamente de la muestra. Los genes de interés se multiplican por PCR usando cebadores en que uno está marcado de manera fluorescente. Después de purificación, los productos de PCR se digieren con una endonucleasa de restricción, normalmente un cortador de 4 bases. El producto digerido se mezcla con un patrón de tamaño de ADN marcado de manera fluorescente y los fragmentos se separan después por electroforesis usando sistemas a base de gel o capilares, provistos de un detector láser a fin de que sólo se visualicen los fragmentos terminales marcados de manera fluorescente. La salida de dicho análisis es en dos formas: 1) un electroferograma que muestra el perfil de una comunidad bacteriana como una serie de picos de altura variable, 2) una tabla generada de un programa de análisis de fragmentos automatizado incluyendo lo más importante el tamaño, en pares de bases y la altura (o área) de cada pico. Los perfiles de T-RFLP entre muestras se pueden comparar de manera numérica usando métodos estadísticos. Se han aplicado varios métodos estadísticos para comparar comunidades microbianas.

El análisis de T-RFLP de comunidades microbianas en estudios ecológicos se ha llegado a usar cada vez más en estos últimos años. Es reproducible y proporciona alta resolución.

Resultados

Individuos y recogida de muestras

50 Los individuos fueron todos machos en buen estado físico pero con una enfermedad cardiovascular controlada definida. Experimentaron sigmoidoscopia flexible antes y después de ingestión de disoluciones de ensayo durante cuatro semanas. Se tomaron biopsias de un modo estandarizado de mucosa de colon sigmoide inferior para más análisis.

Se incluyeron 16 voluntarios en la evaluación de la diversidad, procedentes de una cohorte mayor de individuos

incluidos en un estudio controlado de placebo, de doble ciego, aleatorizado. Nueve individuos consumieron 100 ml de producto de tratamiento al día durante cuatro semanas, que corresponde a una ingesta diaria de 10^{11} unidades formadoras de colonias de *L. plantarum* al día. Siete individuos consumieron 100 ml al día de un producto similar pero sin bacterias durante cuatro semanas.

5 Extracción de ADN

Se trataron las biopsias de mucosa en baño de ultrasonidos durante 5 minutos y después se sometieron a agitación vorticial durante 2 minutos. Las muestras se transfirieron a tubos de 1,5 ml tratados con luz UV y se centrifugaron a 942 rad/s (9.000 rpm) durante 7 minutos. Se añadieron 380 μ l de tampón G2 y 30 μ l de Proteínas K (Qiagen, Hilden, Alemania) al botón. Se trataron las muestras en baño de agua a 56°C hasta que se disolvieron totalmente. Se disgregaron además las suspensiones mediante agitación junto con 12-15 perlas de vidrio (2 mm de diámetro) durante 45 minutos a 4°C en un Mezclador Eppendorf (modelo 5432, Eppendorf, Hamburg, Alemania). Después de centrifugación a 523 rad/s (5.000 rpm) durante un minuto, se transfirió el sobrenadante a dos tubos diferentes de muestra de 2 ml (200 μ l en cada tubo). Se hizo más purificación en EZ1 BioRobot® con Tarjeta de Tejido de ADN EZ1 y Estuche de Tejido de ADN EZ1 (Qiagen, Hilden, Alemania) según la instrucción del fabricante. Se eluyó el ADN en 200 μ l.

Multiplicación por PCR, purificación y medición de concentración.

Se multiplicó el gen de ARNr 16S con el cebador delantero universal Cy5-ENV1 (5'-AGA GTT TGA TII TGG CTC AG-3'), marcado de manera fluorescente con Cy5 en el extremo 5' y el cebador invertido ENV2 (5'-CGG ITA CCT TGT TAC GAC TT-3'), que se hibrida con 8-27 pb y 1.511-1.492 pb, respectivamente. La mezcla de reacción PCR contenía 0,2 μ M de cada cebador, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 5 μ l de tampón de reacción PCR x 10 (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8,3), 2,5 U/ μ l de polimerasa Taq (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y 0,2-10 μ l de molécula patrón, en un volumen final de 50 μ l. Se realizó multiplicación en un Mastercycler Eppendorf (Hamburg, Alemania) usando el siguiente programa: un ciclo a 94°C durante 3 minutos, seguido por 32 ciclos a 94°C durante 1 min, 50°C durante 45 s y 72°C durante 2 min, con una extensión adicional a 72°C durante 7 min.

Se verificaron los productos PCR (5 μ l) en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) en tampón TBE x 1 (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM, AEDT 2,5 mM) después de tinción con bromuro de etidio.

Los productos PCR de tres reacciones se mezclaron para reducir sesgo en PCR y para conseguir suficiente ADN para análisis T-RFLP. Se purificaron y se concentraron los amplicones mediante Estuche de Purificación por PCR MinElute (Qiagen, Hilden, Alemania) según el protocolo del fabricante. Se realizó elución con 30 μ l de agua destilada estéril.

La concentración del ADN purificado se midió espectrofluorométricamente por FlouoroMax-2 con DataMax para Windows™ (ISA Jobin Yvon-Spex Instruments S.A., Inc., Nueva Jersey), usando Quant-iT™PicoGreen® (Invitrogen, Eugen, Oregon, USA) que se intercala con ADN bicatenario. El Quant-iT™PicoGreen® se usó según la instrucción del fabricante. Se realizó excitación a 480 nm.

Análisis T-RFLP

Se digirieron alícuotas de 200 ng de productos PCR purificados durante 16 h a 37°C por separado con 15 U de endonucleasa de restricción *HaeIII* (Sigma-Aldrich, St Louis, USA), en un volumen total de 10 μ l. Después de digestión, se inactivaron las enzimas calentando a 65°C durante 15 min. Se mezclaron los digeridos con 1 μ l de patrón de tamaño interno y 4 μ l de colorante de carga de formamida (3,3 μ l de formamida desionizada, 0,7 μ l de AEDT 25 mM con Azul Dextrano al 5% p/v) y se desnaturalizó la mezcla a 94°C durante 3 min y después se puso inmediatamente sobre hielo, previa carga al gel de poliacrilamida.

Los patrones de tamaño interno contenían cebador Cy5-ENV1 (20 pb como se describió anteriormente) y 697 pb de producto PCR multiplicados de *E. coli* ATCC 11775 usando cebador 685r (5'-TCT ACG CAT TTC ACC GCT AC-3'; numeración *E. coli* 705-685) y Cy5-ENV1. Los patrones de tamaño externo, que consistían en Medidor de Tamaño 50-500 ALFexpress (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y producto PCR de 697 pb marcado con Cy5, se cargaron también en los geles de poliacrilamida que contenían la muestra para estimar las longitudes de los T-RF. Se separaron y se detectaron los fragmentos marcados de manera fluorescente con un secuenciador de ADN ALFexpres II con un gel ReproGel Long Read al 7% (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) durante 700 min en las siguientes condiciones: 1.500 V, 60 mA y 55°C.

Análisis estadístico

Las áreas de pico de los T-RF marcados de manera fluorescente se estimaron usando el programa Fragment Analyser 1.03 de ALFwin™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). La abundancia relativa de cada T-RF dentro de un patrón de T-RFLP proporcionado se calculó como el área de pico del respectivo T-RF dividido por el área de pico total de todos los T-RF detectados en una longitud de fragmento entre 20 y 697 pb. Se calcularon los índices de Simpson (D) y Shannon-Weaner (H') usando las ecuaciones: $D = \sum p_i^2$ y $H' = - \sum p_i \ln p_i$, donde p_i es la abundancia

5 relativa del H' pico en la comunidad (Magurran A, 1.996), Ecological diversity and its measurement, Chapman y Hall, Londres. El uso del índice de diversidad de Simpson (1-D) en vez de la formulación original del índice de Simpson asegura que el valor del índice aumenta con la diversidad aumentada. Para cada individuo, se calcularon los índices para las muestras antes y después de tratamiento. La diferencia en diversidad se obtuvo por sustracción del índice antes de tratamiento del índice después de tratamiento. Las diferencias en la diversidad bacteriana entre los individuos en los grupos probiótico y placebo se detectaron usando el Ensayo de la Suma de Rangos de Mann-Whitney (SigmaStat, Systat Software, Point Richmond, USA). Un valor p de <0,05 se consideró estadísticamente significativo.

10 Cuando se analizan los datos de los perfiles de T-RFLP se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la diversidad de la microbiota intestinal en los individuos tratados con *L. plantarum* 299v durante cuatro semanas comparado con individuos que recibieron placebo. La endonucleasa de restricción *HaeIII* se usó como la enzima de corte y la diferencia media en diversidad cuando se mide por el índice de Shannon fue 0,2305803 para el grupo probiótico y -0,3929243 para el grupo de placebo ($p=0,026$).

15 Calcular el Índice de Simpson de diversidad confirmó la mayor diversidad proporcionando *L. plantarum* 299v. Se usó *HaeIII* como la enzima de corte y el resultado fue estadísticamente significativo, la diferencia media por Índice de Diversidad de Simpson fue 0,0367907 para el grupo probiótico y -0,04792 para el grupo de placebo ($p=0,026$).

Diferencia media en índices de diversidad

	<i>Shannon</i>	<i>Simpson</i>
$D_{i\text{antes } 299v} - D_{i\text{después de } 299v}$	0,2305803	0,0367907
$D_{i\text{antes placebo}} - D_{i\text{después de placebo}}$	-0,3929243	-0,04792
$D_{i\text{total}}$	0,6235046	0,0847107
Significancia de $D_{i\text{total}}$	$P=0,026$	$P=0,026$

20 Los resultados anteriores muestran que la diversidad bacteriana del intestino humano aumenta cuando se administra una sola cepa de *Lactobacillus plantarum*, es decir, entre los individuos a los que se proporciona la cepa de *Lactobacillus plantarum* y los individuos a los que se proporciona placebo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus plantarum* seleccionada del grupo que consiste en: *Lactobacillus plantarum* 299, DSM 6595, *Lactobacillus plantarum* 299v, DSM 9843, *Lactobacillus plantarum* HEAL 9, DSM 15312, *Lactobacillus plantarum* HEAL 19, DSM 15313 y *Lactobacillus plantarum* HEAL 99, DSM 15316, para uso en el tratamiento o la profilaxis de:
- a) baja diversidad bacteriana (LBD) del tubo digestivo;
 - b) sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado (SIBO);
 - c) sobrecrecimiento bacteriano en el intestino grueso (LIBO) y/o
 - d) traslocación asociada a LIBO o SIBO;
- 10 aumentando la diferencia de índices de diversidad del tubo digestivo comparado con placebo,
- en la que se mide una diferencia de índices de diversidad aumentada por el método T-RFLP usando HaeIII como enzima y los índices de Shannon-Weaner y Simpson,
- 15 y en la que la baja diversidad bacteriana del tubo digestivo se puede definir por una diferencia de índices de diversidad de al menos 0,15 según el índice de diversidad de Shannon-Weaner o un índice de diversidad de al menos 0,02 según el índice de diversidad de Simpson.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que dicha diferencia de índices de diversidad aumentada es al menos 0,30, preferiblemente 0,45 y más preferiblemente 0,60 cuando se usa el índice de Shannon-Weaner.
3. La composición para uso según la reivindicación 1, en la que dicha diferencia de índices de diversidad aumentada es al menos 0,04, preferiblemente 0,06 y más preferiblemente 0,08, cuando se usa el índice de diversidad de Simpsons.
- 20 4. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición es una formulación líquida o una formulación sólida.
5. La composición para uso según la reivindicación 4, en la que dicha formulación sólida se selecciona del grupo que consiste en: comprimidos, comprimidos para chupar, caramelos, comprimidos masticables, chicles, cápsulas, sobrecitos, polvos, gránulos, partículas recubiertas y comprimidos recubiertos, comprimidos y cápsulas enterorrecubiertos y tiras y películas de fusión.
- 25 6. La composición para uso según la reivindicación 4, en la que dicha formulación líquida se selecciona del grupo que consiste en: disoluciones orales, suspensiones, emulsiones y jarabes.
7. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha composición es un alimento médico, un alimento funcional, un suplemento dietético, un producto nutricional o una preparación alimenticia.
- 30 8. La composición para uso según la reivindicación 7, en la que dicha preparación alimenticia se selecciona del grupo que consiste en: bebidas, yogures, zumos, helados, panes, galletas, cereales, barritas energéticas y pastas para untar.
- 35 9. La composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición es para uso en el tratamiento de los estados (a), (b), (c) y/o (d).

