

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 602**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2006.01)
A61K 8/99 (2006.01)
A61Q 19/06 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10712041 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2411027**

54 Título: **Uso de un probiótico para la regulación del peso corporal**

30 Prioridad:

25.03.2009 EP 09156109

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

10.02.2015

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Alle 10-12
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**LESER, THOMAS DYRMANN;
GUNNARSSON, THOMAS;
KILDGAARD, JENS;
PEDERSEN, JANNI WANDAHL y
FLAMBARD, BÉNÉDICTE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 528 602 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 un probiótico para la regulación del peso corporal

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a la cepa *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544 que modula la expresión de marcadores de saciedad (por ejemplo factores codificados por el gen GCG) en el intestino mientras al mismo tiempo aumenta la oxidación de la grasa y la reducción de la deposición de la grasa en el tejido muscular. El consumo de la cepa probiótica puede así ayudar a promover un peso corporal óptimo en un mamífero. La invención se refiere además a una composición que comprende la cepa para su uso en la prevención y/o tratamiento de la obesidad, diabetes mellitus de tipo 2 y síndrome de ovario poliquístico (SOP) al igual que métodos cosméticos para la reducción de peso corporal.

15 Antecedentes de la invención

Tratamiento del peso corporal

[0002] El cuerpo saludable y de buen funcionamiento de un mamífero (incluyendo los seres humanos) se caracteriza por un peso óptimo. El peso óptimo específico varía mucho según especie, género, edad, tipo de estatura del cuerpo, nivel de actividad física etc. de cada individuo mamífero. Sin embargo está claro que se puede establecer un rango de peso corporal óptimo para cualquier individuo mamífero, y que un gran sobrepeso al igual que infrapeso tiene efectos negativos drásticos en la salud y bienestar del individuo.

[0003] En general, durante la evolución los mamíferos se han adaptado a una situación de recursos alimentarios escasos y hambrosa, y han desarrollado complejos mecanismos para hacer frente a esta situación, por una parte la señalización del hambre, que cambia completamente el patrón de comportamiento de la mayoría de mamíferos, y también la capacidad de los mamíferos para almacenar grandes reservas de energía en forma de grasa corporal.

[0004] El mantenimiento del peso corporal óptimo es complejo y multifactorial (NIH 1998). Éste implica numerosas vías de señalización y procesos metabólicos al igual que un espectro de factores genéticos y medioambientales. La presente prueba clínica indica que se requiere una intervención polifacética que implica diferentes vías de señalización y procesos metabólicos para obtener un tratamiento completo de la obesidad.

[0005] En la última década ha ido quedando claro que el cuerpo saludable del mamífero también ha desarrollado numerosos mecanismos complejos que regulan la ingestión de alimento durante periodos de exceso regulando nuestra saciedad. Muchos de estos mecanismos parecen implicar respuestas específicas a ciertos componentes en el alimento, y han sido revelados detalles moleculares de más vías de señalización de saciedad y se ha demostrado que implican moléculas/hormonas de señalización específicas. Dependiendo de sus niveles específicos (presencia o ausencia) tales moléculas/hormonas de señalización de regulación de saciedad específicas pueden señalar o bien saciedad o bien hambre. Colectivamente son referidas aquí como "marcadores de saciedad".

Marcadores de saciedad

45 Proglucagón y hormonas peptídicas derivadas.

[0006] La codificación genética para el precursor de glucagón, proglucagón, se expresa en el cerebro, páncreas, y en el intestino delgado y grueso. El gen es también referido como el "gen GCG" o simplemente "GCG" (Ensembl: [ENSG00000115263](#)).

[0007] En las células L, localizadas principalmente en el epitelio del intestino delgado distal y en el colon, el polipéptido proglucagón es dividido en GLP-1 (péptido similar al glucagón tipo 1), GLP-2 (péptido similar al glucagón tipo 2), oxintomodulina, glicentina e IP-2 (péptido interviniente 2) (ver Figura 1). Mientras GLP-1 y GLP-2 ejercen acciones bien definidas a través de receptores conocidos, la función biológica de la glicentina y del IP-2 permanece menos caracterizada y ninguno de los receptores han sido identificados. La función de oxintomodulina ha sido deducida a partir de experimentos en animales y de ensayos humanos, no obstante, no se ha identificado ningún receptor aún.

Fisiología del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)

[0008] En las células L del intestino, se produce GLP-1 (antiguamente llamada insulintropina) como un péptido con 39 aminoácidos que se almacena intracelularmente. GLP-1 se libera a la circulación en respuesta a la ingestión de

ES 2 528 602 T3

nutrientes y tiene numerosos efectos fisiológicos (1).

5 [0009] Diferentes estudios han demostrado que las mejoras observadas en el control glucémico siguiendo la administración periférica de GLP-1 o análogos farmacológicos de GLP-1 a largo plazo en modelos animales y en
10 pacientes con diabetes de tipo 2 (T2DM) están asociados con reducciones significativas en el peso corporal (2), indicando que el GLP-1 puede jugar un papel en la regulación del equilibrio de energía. En un metanálisis reciente se concluyó que el GLP-1 reduce el apetito y la ingestión calórica intensamente, esta última en un promedio de 11.7%. La reducción es similar en sujetos delgados y obesos y se consigue sin efectos adversos (3). Es bien conocido que el GLP-1 inhibe el vaciado gástrico. El vaciado gástrico reducido genera una extensión prolongada del estómago tras la
15 ingestión de alimentos. Los mecanorreceptores, localizados en el estómago, cuantifican la extensión del estómago y la señal de saciedad al cerebro. El efecto de saciedad del GLP-1 también se puede provocar con GLP-1 actuando directamente en el cerebro, ya que se encuentran neuronas inmunoreactivas GLP-1 en gran cantidad en las áreas del sistema nervioso central (SNC) implicadas en la regulación del apetito (4-6). Diferentes estudios han confirmado la presencia de receptores de GLP-1 en áreas del cerebro importantes en la regulación del apetito, apoyando la idea de que el GLP-1 está implicado en el control central del apetito (7, 8).

Fisiología del péptido similar al glucagón tipo 2 (GLP-2)

20 [0010] En cuanto al GLP-1, el GLP-2 se produce mediante procesamiento postranslacional del polipéptido proglucagón en las células L del intestino. El GLP-2 es un péptido de 33 aminoácidos que se cosecreta con GLP-1 en respuesta a la ingestión de nutrientes, especialmente lípidos y carbohidratos (9).

25 [0011] Se ha propuesto que el GLP-2 actúa como regulador de la ingestión de alimento. Cuando las ratas recibieron una administración intracerebroventricular de GLP-2, se inhibió la ingestión de alimento (10). A diferencia del GLP-1, la administración central de GLP-2 no inhibe la ingestión de agua y no causa aversión condicionada al sabor.

30 [0012] En ratones, las inyecciones subcutáneas de GLP-2 mejoran la función de la barrera epitelial intestinal afectando a las vías paracelulares y transcelulares (11). Se asocia una función de la barrera gastrointestinal mejorada con una reducción en el flujo de lipopolisacáridos (LPS) del lumen intestinal al sistema de circulación. Incluso se han mostrado recientemente niveles moderadamente aumentados de LPS para inducir un aumento de peso adiposo similar a la que se obtiene con una dieta con alto contenido en grasa en roedores (12).

Fisiología de la oxintomodulina

35 [0013] La oxintomodulina (también referida como glucagón-37, glicentina-(33-69), y en referencias más antiguas como enteroglucagón bioactivo) se produce mediante un procesamiento postranslacional del polipéptido proglucagón en las células L del intestino.

40 [0014] La oxintomodulina comparte muchas propiedades con el GLP-1. En consecuencia, la oxintomodulina administrada exógenamente puede mejorar intensamente la intolerancia a la glucosa en ratones con obesidad inducida por la dieta y esto es posible debido a la estimulación de la secreción de insulina inducida por glucosa (13). Además, la oxintomodulina puede retrasar el vaciado gástrico y reducir la secreción de ácidos gástricos (14). De manera importante, la administración de oxintomodulina exógena produce efectos tanto a corto plazo en la alimentación como efectos más a largo plazo en el aumento de peso corporal tanto en roedores como en sujetos humanos. Se ha demostrado que la
45 oxintomodulina reduce agudamente la sensación de hambre e inhibe la ingestión calórica en sujetos sanos normales. En el mismo estudio, la administración de oxintomodulina redujo los niveles de grelina circulante en aproximadamente un 44% (15). Es posible que el efecto supresor en la alimentación esté mediado a través de la reducción de grelina, una hormona del hambre producida por las células endocrinas que revisten el estómago. También se ha sugerido que la oxintomodulina puede aumentar el gasto de energía (16), que junto con la ingestión de energía reducida puede resultar
50 en un equilibrio negativo de energía que conduzca a una pérdida de peso. De hecho, una administración de siete días (i.p.) de oxintomodulina redujo el índice de aumento de peso corporal y de adiposidad en ratas (17). De forma similar, cuatro semanas de tratamiento de oxintomodulina (mediante inyección subcutánea) resultaron en una pérdida de peso de 2.3 kg (en comparación con 0.5 kg para el grupo de control) en sujetos humanos con sobrepeso y obesidad (18).
55 Estos estudios indican claramente que la oxintomodulina puede estar implicada en la regulación de la ingestión de alimento y el aumento de peso corporal.

Fisiología de la glicentina

60 [0015] La glicentina (también referida como enteroglucagón, glucagón-69, o glucagón tipo intestino) corresponde a los aminoácidos 1-69 del proglucagón. La secuencia también comprende la secuencia de la oxintomodulina (glicentina-(33-69)). La glicentina 1-30 corresponde a GRPP (péptido pancreático relacionado con la glicentina) (19).

[0016] La glicentina se produce en las células L intestinales y se secreta durante la digestión. La glicentina ralentiza el vaciado gástrico y puede interrumpir el patrón de motor alimentado duodenoyeyunal. Tomita *et al.* (2005) (20) han informado de que la glicentina juega un papel importante en la inhibición reguladora de la reacción de contracción en el yeyuno normal de un humano a través de nervios no-colinérgicos no adrenérgicos, y tiene una acción directa en el receptor muscular yeyunal. En cambio, Ayachi *et al.* (2005) (21) han mostrado que la glicentina contribuye en la contracción de las células de músculo liso aisladas del colon humano. La exendina-(3-39), descrita como un antagonista del receptor de GLP-1, inhibió la contracción debido a la glicentina, sugiriendo que la glicentina puede actuar a través del receptor de GLP-1 Ayachi *et al.* (2005) (21).

Biología y fisiología del péptido YY

[0017] El Péptido YY (también conocido como PYY, Péptido Tirosina Tirosina, o Péptido Pancreático YY₃₋₃₆), Ensembl: [ENSG00000131096](#), se codifica por la banda de cromosoma humano 17 q21.1. Hay dos formas principales del Péptido YY: PYY₁₋₃₆ y PYY₃₋₃₆. El Péptido YY₃₋₃₆ (PYY) es un polipéptido lineal consistente en 34 aminoácidos con homología estructural para NPY y el polipéptido pancreático Péptido YY se refiere a la familia de los péptidos pancreáticos teniendo 18 de sus 34 aminoácidos localizados en las mismas posiciones que el péptido pancreático (22). La forma más común de PYY circulante es PYY₃₋₃₆ que se enlaza al receptor Y2 (Y2R) (23).

[0018] El PYY se encuentra en las células L en la mucosa del tracto gastrointestinal, especialmente en el íleon y colon. Una pequeña cantidad de PYY, aproximadamente el 1-10 por ciento, se produce en el esófago, estómago, duodeno y yeyuno (24). La concentración plasmática de PYY aumenta posprandialmente (después de la ingestión de alimento) y disminuye con el ayuno (23).

[0019] El PYY ejerce su acción a través de receptores de NPY, inhibe la motilidad gástrica y aumenta la absorción de agua y electrolitos en el colon (25). El PYY también puede suprimir la secreción pancreática. Es secretado por las células enteroendocrinas en el íleon y colon en respuesta a una comida, y ha sido demostrado que reduce el apetito. El PYY funciona mediante ralentización del vaciado gástrico; por lo tanto, aumenta la eficiencia de la digestión y la absorción de nutrientes después de una comida.

[0020] Diferentes estudios han mostrado que la administración periférica aguda de PYY₃₋₃₆ inhibe la alimentación en roedores y primates. Los estudios en ratones knockout-Y2R no han indicado ningún efecto anorexígeno (pérdida de apetito) en ratones knockout-Y2R. Estos descubrimientos sugieren que el PYY₃₋₃₆ tiene un efecto anorexígeno mediado por Y2R. Los ratones hembra PYY-deficientes han aumentado su peso corporal y masa grasa. Los ratones PYY-deficientes, por otro lado, son resistentes a obesidad pero tienen una masa grasa mayor y una tolerancia a la glucosa inferior cuando se les alimenta con una dieta con alto contenido en grasa, comparado con ratones de control. Así el PYY también juega un papel muy importante en la homeostasis de la energía equilibrando la ingestión de alimento (23).

[0021] En voluntarios humanos que recibieron infusiones artificiales de PYY a concentraciones poscomida normales, la ingesta de alimento se redujo en un tercio durante un día. Los investigadores de este estudio también investigaron los niveles de hambre del grupo de prueba tanto durante como después de las transfusiones de la hormona. El grupo que recibía PYY presentó una reducción de hasta un 40% en niveles percibidos de hambre durante un periodo de 12 horas posteriores a la infusión (26).

[0022] Estos datos sugieren que el PYY puede ser útil como terapia potencial para la obesidad o al menos para reducir el apetito en individuos que siguen una dieta de reducción de peso.

Biología y fisiología de la apolipoproteína A-IV

[0023] La apolipoproteína A-IV es codificada por APOA4 (alias ApoA-IV o ApoA-IV) con ID genética:, Ensembl: [ENSG00000110244](#), se codifica por la banda de cromosoma humano 11 q23. APOA4 contiene 3 exones separados por dos intrones. El principal producto de movimiento es una preproteína de 396 residuos que después del tratamiento proteolítico se secreta junto con partículas de quilomicrón.

[0024] La apolipoproteína A-IV (apoA-IV) actúa como factor de saciedad. La apoA-IV es una glicoproteína de 46.000 Da sintetizada por el intestino humano. En roedores, tanto el intestino delgado como el hígado secretan apoA-IV, pero el intestino delgado es el principal órgano responsable de la apoA-IV circulante (27). Ahora hay una prueba sólida de que el hipotálamo, especialmente el núcleo arcuato, es otro sitio activo de la expresión de apoA-IV (28). La síntesis de apoA-IV intestinal está marcadamente estimulada por la absorción de grasa y no parece estar mediada por la absorción o reesterificación de ácidos grasos para formar triglicéridos. Más bien, la formación local de quilomicrones actúa como señal para la inducción de la síntesis de apoA-IV intestinal. La síntesis de apoA-IV intestinal también se ve mejorada por

un factor del íleon, probablemente el péptido tirosina tirosina (PYY) (29). La inhibición de ingestión de alimento por apoA-IV está mediada centralmente (30). La estimulación de la síntesis intestinal y la secreción de apoA-IV mediante absorción lipídica es rápida; así la apoA-IV posiblemente juega un papel en la regulación a corto plazo de la ingestión de alimento. Otra prueba sugiere que la apoA-IV puede estar también implicada en la regulación a largo plazo de la ingestión de alimento y del peso corporal, ya que es regulada tanto por la leptina como por la insulina (28). La ingestión crónica de una dieta con alto contenido en grasa interfiere en la respuesta de apoA-IV a la alimentación lipídica tanto intestinal como hipotalámica (29).

[0025] Así, las moléculas de señalización peptídica (hormonas) tales como GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, glicentina y PYY así como proteínas tales como la apolipoproteína A-IV, están implicadas en la señalización de y la respuesta frente a bien la saciedad o bien el hambre y pueden por consiguiente denominarse "marcadores de saciedad".

Metabolismo del ácido graso

Biología y fisiología de la esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1)

[0026] La esteroil-CoA desaturasa (SCD; EC 1.14.99.5) es una enzima que contiene hierro que cataliza un paso limitante en la síntesis de ácidos grasos insaturados. La SCD-1 es codificada por un gen en el cromosoma humano 10q24.31 con ID genética Entrez: 6319.

[0027] La esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1) determina la subdivisión de ácido graso en la lipogénesis o la β -oxidación de ácidos grasos en el tejido muscular. La regulación de SCD1 se ve en individuos obesos y produce una acumulación de triacilglicerol intramiocelular (IMTG). La obesidad humana está asociada con la acumulación anormal de lípidos neutrales dentro de las miofibras esqueléticas. Este fenómeno ocurre en sintonía con el transporte reducido de glucosa estimulada por insulina y la transducción perjudicada de la señal de insulina. Las manipulaciones farmacológicas y genéticas que depletan IMTG restablecen la sensibilidad a la insulina. Hulver *et al.* (2005) (31) han identificado además una relación lineal, "que la diana farmacológica de la SCD1 muscular y/o sus reguladores podrían aportar nuevas oportunidades en la prevención y/o tratamiento de la obesidad y sus comorbideces relacionadas" (31).

Probióticos

[0028] Los microorganismos probióticos han sido definidos como "microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo hospedador" (FAO/OMS 2001).

[0029] Se ha descrito que ciertas cepas bacterianas probióticas pueden tener la capacidad de modular el nivel de marcadores de saciedad específicos.

[0030] WO 2007/085970 A2 (DANISCO A/S) describe cepas específicas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus salivarius* y *Bifidobacterium lactis* que son capaces de modular la señalización de saciedad, mencionando específicamente el grupo de marcadores de saciedad consistente en PYY, CCK, grelina, leptina, GLP-1, orexinas, neuropéptido hipotalámico orexigénico Y, ácido acético, amilina y oxintomodulina.

[0031] *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* se describen solamente en términos muy generales en la página 21, líneas 1-2 y 9. La cepa específica CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544 no es mencionada. Los ejemplos se basan en estudios de células Caco-2 tratadas con *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, *B. lactis* 420, *B. lactis* HN019, *L. salivarius* Ls-33, *L. acidophilus* NCFM y *L. curvatus* 853. Además se propone un modelo de rata y ensayos clínicos con humanos, pero no se proporciona ninguno de los resultados.

[0032] WO 2007/085970 falla a la hora de revelar o apuntar a *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544 para su uso en la prevención y/o tratamiento de la obesidad, la diabetes mellitus de tipo 2 y el síndrome de ovario poliquístico (SOP) o en métodos cosméticos para la reducción de peso corporal.

[0033] WO 00238165A1 (PROBI) describe cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* que modulan los niveles de insulina y leptina.

[0034] US 2004/0048356 A1 (Johansson) describe dos cepas específicas de *Lactobacillus plantarum* que están dando lugar a cantidades aumentadas de ácido propiónico o ácido acético en el colon, que finalmente modifican el nivel de leptina y la expresión génica PPAR.

[0035] Tennyson CA *et al.*, 2008 es un artículo de análisis. Bajo el título "Probióticos y tratamiento de la obesidad" se sostiene (página 6, columna izquierda, 2º párrafo) que la bibliografía que demuestra los efectos de probióticos en la

obesidad o en el metabolismo es limitada. No hay indicio o sugerencia del uso de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431.

[0036] Tanida *et al.*, 2008 concluye que los resultados sugieren que *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) tiene una acción anti-obesidad, y en este mecanismo, los nervios autónomos pueden funcionar para facilitar las respuestas lipolíticas y termogénicas a través de la excitación simpática y para suprimir la actividad nerviosa parasimpática en ratas.

[0037] Un análisis profundo de Tennyson CA *et al.*, 2008 y Tanida *et al.*, 2008 no proporciona ninguna sugerencia o indicio de que la cepa específica CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544 pueda ser útil en la prevención y/o tratamiento de la obesidad, la diabetes mellitus de tipo 2 y el síndrome de ovario poliquístico (SOP) o en métodos cosméticos para la reducción de peso corporal.

[0038] WO2007/043933 divulga el uso de al menos una de *Lactobacillus casei* F19 (LMG P- 17806), *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 o *Bifidobacterium lactis* Bb12 para el control del aumento de peso, etc.

[0039] No obstante, WO2007/043933 tampoco proporciona ninguna sugerencia o indicio de que la cepa específica CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544 podría ser útil en la prevención y/o tratamiento de la obesidad, la diabetes mellitus de tipo 2 y el síndrome de ovario poliquístico (SOP) o en métodos cosméticos para la reducción de peso corporal.

[0040] En nuestro conocimiento no hay informe de una única clase de bacteria que sea capaz de: 1. Modular todos GLP-1, GLP-2, oxintomodulina y glicentina a través de la activación del gen GCG en el intestino de un animal, 2. Regular al alza la expresión de PYY en el intestino y en cultivos de células, 3. Regular al alza la expresión de APOA4 en el intestino y 4. Aumentar la oxidación de grasas en el tejido muscular a través de la regulación a la baja de SCD-1.

Resumen de la invención

[0041] La presente invención gira en torno a una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544 para su uso en la prevención y/o tratamiento de la obesidad, la diabetes mellitus de tipo 2 y el síndrome de ovario poliquístico (SOP). Dicha composición regula al alza la expresión de marcadores de saciedad codificados por el gen GCG en el intestino de dicho mamífero. La cepa también regula al alza la expresión de marcadores de saciedad codificados por el gen APOA4 y/o los marcadores de saciedad codificados por el Péptido YY en el intestino del mamífero. Además, dicha cepa reduce la expresión del gen SCD1 en los músculos esqueléticos del mamífero.

[0042] La molécula de proglucagón codificada por el gen GCG da lugar a numerosas moléculas de señalización de saciedad conocidas o putativas. Por consiguiente la cepa *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* además de la modulación del gen GCG en el nivel de ARNm además modula el nivel de una o varias moléculas de señalización seleccionadas del grupo consistente en: GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, IP-2, GRPP y glicentina en el nivel proteínico, a partir de los modulados del nivel de PYY y/o apolipoproteína A-IV y regular a la baja la expresión del gen SCD1 en los músculos esqueléticos del mamífero, lo que es importante ya que se prevé que la modulación a la baja de SCD1 aumente el metabolismo de la grasa y así aumente la eficacia de la cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* para reducir el sobrepeso y/o tratar la obesidad.

[0043] Una composición que comprende la cepa puede ser útil para la preparación de una composición para la gestión del peso corporal de un mamífero.

[0044] Un aspecto particularmente interesante es el uso de una composición que comprende la cepa para su uso en la prevención o tratamiento de la obesidad. Es bien conocido que la obesidad (IMC \geq 30) pero también el sobrepeso (es decir IMC 25-30) puede tener implicaciones médicas serias y que tanto los individuos obesos como con sobrepeso se pueden beneficiar de una reducción de peso. No obstante, incluso individuos de peso normal o casi normal (es decir IMC 18.5-24.9) que no sufren implicaciones médicas debido al sobrepeso pueden encontrarlo atractivo para mantener o intentar conseguir un peso corporal óptimo por cuestiones estéticas. Así, un aspecto adicional de la invención es un método cosmético para reducir el peso corporal en un sujeto sin obesidad, sin sobrepeso con un índice de masa corporal (IMC) menor que 25, dicho método comprende proporcionar una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544.

[0045] La composición que comprende la cepa para su uso según la invención se puede formular tanto en forma de dosificación líquida y sólida. En este último caso, el producto puede hacerse en polvo y formarse en comprimidos, gránulos o cápsulas o simplemente mezclarse con otros ingredientes alimenticios para formar un alimento funcional.

Definiciones

[0046] Antes de una discusión de las formas de realización detalladas de la invención se provee una definición de términos específicos relacionada con los aspectos principales de la invención.

5

[0047] Como se utiliza en este caso el término "IMC" designa índice de masa corporal. El IMC es una medida del peso de una persona a escala con la altura. Se define como el peso corporal del individuo dividido por el cuadrado de su altura (peso medido en kilogramos, altura en metros). La fórmula universalmente usada en medicina produce una unidad de medida de kg/m^2 . Según el US Department of Health & Human Services un IMC por debajo de 18.5 indica delgadez, 18.5-24.9 peso normal, 25- 29.9 sobrepeso y un IMC de 30 o superior indica obesidad. Debe observarse que no sólo la obesidad sino también el sobrepeso (IMC 25-29.9) aumenta el riesgo de mortalidad en adultos (Neovius *et al.* (2009) BMJ 338; b496). Por consiguiente el sobrepeso no es sólo de relevancia debido a indicaciones estéticas sino también por sus implicaciones médicas.

10

[0048] La expresión "factores de riesgo implicados en el sobrepeso y/o la obesidad" se refiere a uno o más de los muchos factores bioquímicos que están negativamente implicados en el desarrollo del sobrepeso y la obesidad. Un grupo interesante particular de tales factores de riesgo son los llamados "marcadores de saciedad". El término "marcadores de saciedad" se refiere a péptidos u hormonas (incluyendo los genes que codifican para dichos péptidos/hormonas) que están implicados en la señalización de y la respuesta frente a la saciedad, los cuales con niveles aumentados de los factores proporcionan a un animal la sensación de saciedad y así llevan a una ingestión de alimento reducida. GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, y glicentina, y PYY son ejemplos de tales moléculas de señalización peptídica.

15

[0049] El gen referido como "gen GCG" o simplemente "GCG" es el gen codificante para el precursor del glucagón, el proglucagón, el gen GCG es también referido como el "gen proglucagón".

25

[0050] La expresión "probióticos o alimentos probióticos" se refiere a una composición que comprende microorganismos probióticos. Las bacterias probióticas se definen como células microbianas que tienen un efecto beneficioso en la salud y bienestar del organismo hospedador. Los microorganismos probióticos han sido definidos como "microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo hospedador" (FAO/OMS 2001).

30

[0051] La expresión "prebiótico" se refiere a una composición o un componente de una composición que aumenta el número de bacterias probióticas en el intestino. Así, los prebióticos se refieren a cualquier componente alimentario no viable que está específicamente fermentado en el colon por bacterias autóctonas que se piensa que son de valor positivo, por ejemplo bifidobacterias, lactobacilos. La administración combinada de una cepa probiótica con uno o varios compuestos prebióticos puede mejorar el crecimiento del probiótico administrado *in vivo* dando como resultado un beneficio en la salud más pronunciada, y es denominado simbiótico.

35

[0052] Se describen posteriormente formas de realización de la presente invención, sólo por medio de ejemplos.

40

Divulgación detallada de la invención

[0053] La invención se refiere al uso de bacterias probióticas para promover el peso corporal óptimo de un mamífero. Para la sorpresa de los inventores, las composiciones que comprenden la cepa CRL431 de la bacteria *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* son capaces específicamente de inducir la expresión de: 1. El gen GCG en la parte distal del íleon del intestino de un mamífero (ejemplo 1), 2. El gen APOA4 (ejemplo 4), 3. La secreción de GLP1, GLP-2 y PYY en la parte distal del íleon del intestino de un mamífero (ejemplo 2), 4. La secreción de PYY de una línea celular enteroendocrina humana (ejemplo 3), y 5. La expresión disminuida de SCD-1 en el tejido de músculo esquelético (ejemplo 5). Sin pretender estar ligado a la teoría, se percibe que las células *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* pueden ser usadas para la preparación de una composición para la administración a un mamífero para modular la expresión de los genes GCG y APOA4 en el intestino, aumentando la secreción de PYY en el intestino, y aumentando la oxidación de las grasas en el tejido de músculo esquelético.

45

50

[0054] Aunque la invención no debe interpretarse de forma limitada por cualquier teoría particular, se piensa que debido al hecho de que el mantenimiento del peso corporal óptimo implica numerosas vías de señalización individuales y procesos metabólicos, se deduce de ello que una cepa de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* que regula al alza más factores de saciedad demostrará tener una eficacia mejorada.

55

[0055] Como se ilustra en ejemplo 1 la cepa probiótica CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (ATCC 55544) es particularmente eficaz en la activación de la expresión del gen GCG.

60

ES 2 528 602 T3

- 5 [0056] Como se ilustra además en el ejemplo 2 - 5 la cepa probiótica CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (ATCC 55544) también regula al alza la expresión del gen APOA4 y el gen PYY, en el intestino, y además reduce la expresión del gen SCD1 en músculos esqueléticos de dicho mamífero. Así esta cepa *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* parece ser única en que regula al alza numerosos factores de saciedad y además aumenta la oxidación de ácidos grasos en los músculos.
- 10 [0057] Se contempla que las cepas que derivan directamente de esta cepa probiótica posiblemente retienen sus características probióticas incluyendo la característica de aumentar la expresión de genes que codifican para diferentes factores de saciedad y/o metabolismo lipídico.
- 15 [0058] La cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* fue depositada según el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes con el American Tissue type Collection Center, 10801 University Blvd, Manassas, VA 20110, EEUU el 24 de enero de 1994 bajo el número de registro ATCC 55544. La cepa CRL431 está comercialmente disponible de Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca, bajo el nombre de producto Probio-Tec® F-DVS L.casei 431®; número de artículo 501749, y bajo el nombre de producto Probio-Tec® C-Powder 30, número de artículo 687018.
- 20 [0059] En el intestino el ARNm proglucagón también da lugar a la producción de numerosos péptidos [ej. 2, la expresión de proteína activa biológica GLP-1, GLP-2 y PYY aumentó], es decir GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, IP-2, GRPP y glicentina, la mayor parte de los cuales se conocen por ser o se sospecha que son moléculas de señalización implicadas en la señalización de y la respuesta frente a bien la saciedad o bien el hambre.
- 25 [0060] Para corroborar más el hallazgo de que CRL431 aumenta la expresión del gen GCG, los productos genéticos, es decir los GLP-1, GLP-2, oxintomodulina y GLP-1 total al igual que GLP-2 intactos, fueron medidos en el efluente venoso de un intestino de cerdo aislado perfundido con la cepa CRL431 (véase ejemplo 2). Como se muestra en la Figura 3, la concentración de GLP-1 intacto y biológicamente activo aumentó un 443% como consecuencia de la perfusión del intestino de cerdo aislado con CRL431. Los niveles de GLP-1 y GLP-2 totales aumentaron un 330% y 460%, respectivamente, indicando una secreción aumentada de hormonas de proglucagón derivado de GCG. Además, la secreción de la hormona inductora de saciedad PYY fue también inducida por perfusión con CRL431. Como se indica en la Figura 3, los niveles de PYY aumentaron un 228% tras la perfusión con CRL431. Por lo tanto una forma de realización preferida de la invención es una composición que comprende la cepa para la expresión de modulación de GLP-1.
- 30 [0061] Como se ilustra además en el ejemplo 3, CRL431 induce la secreción de PYY en cultivos celulares de una línea celular enteroendocrina humana (NCI-H716). En este ejemplo, CRL431 induce la secreción de PYY de manera dependiente de la dosis para alcanzar niveles 1131% por encima de los antecedentes.
- 35 [0062] La prueba indica claramente que GLP-1, GLP-2, oxintomodulina, glicentina y PYY son hormonas capaces bien directa o bien indirectamente (por ejemplo a través de la función de barrera epitelial intestinal aumentada) de promover un peso corporal óptimo en un mamífero. Particularmente la cepa para su uso en la prevención o tratamiento de la obesidad es una forma de realización preferida de la invención.
- 40 [0063] En el ejemplo 4, se muestra que la cepa probiótica CRL431 (ATCC 55544) de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* aumenta la expresión del gen APOA4 en el tejido intestinal. Se ha demostrado que el producto genético APOA4, la apolipoproteína A-IV es una proteína inductora de saciedad.
- 45 [0064] Además, como se ilustra en ejemplo 5 la cepa probiótica CRL431 (ATCC 55544) de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* reduce la expresión del gen SCD-1 en el tejido de músculo esquelético. Se contempla que las cepas que derivan directamente de esta cepa probiótica probablemente retengan sus características probióticas incluyendo la característica de disminuir la expresión del gen SCD-1 en el tejido de músculo esquelético.
- 50 [0065] La obesidad es un factor de riesgo principal para desarrollar varias enfermedades y síntomas. Según la Endocrine Society o la Hormone Foundation (<http://www.obesityinamerica.org>) la gente con sobrepeso y obesidad corre un riesgo mayor de desarrollar las condiciones afecciones: enfermedades cardiovasculares (por ejemplo aterosclerosis, hipertensión, derrame cerebral, insuficiencia cardíaca congestiva, angina de pecho), diabetes mellitus de tipo 2, hipoventilación relacionada con la obesidad, problemas de espalda y articulaciones, fallo hepático graso no alcohólico, enfermedad de reflujo gastroesofágico, fertilidad reducida, hipotiroidismo, dislipidemia, hiperinsulinemia, colecistitis, colelitiasis, osteoartritis, gota, apnea del sueño y otros problemas respiratorios, síndrome de ovario poliquístico (SOP), complicaciones en el embarazo, trastornos psicológicos, nefrolitiasis de ácido úrico (cálculos en el riñón), incontinencia urinaria por estrés e incidencia aumentada de ciertos cánceres (por ejemplo cáncer de riñón, endometrio, pecho, colon y
- 55
- 60

recto, esófago, próstata y vesícula biliar).

[0066] La diabetes de tipo 1 (T1DM) es el resultado de la destrucción autoinmune de las células β productoras de insulina en el páncreas. Estudios en animales indican que una terapia con GLP-1 puede retrasar el inicio de T1DM induciendo la aparición de neogénesis y proliferación de células β (32)22). Se ha sugerido que este efecto se refiere a propiedades anti-inflamatorias del GLP-1 (33, 23).

[0067] Por consiguiente, las formas de realización importantes de la invención son composiciones que comprenden la cepa CRL431 con número de registro ATCC 55544 para su uso en la prevención y/o tratamiento de diabetes mellitus de tipo 2 o de síndrome de ovario poliquístico (SOP).

[0068] Cuando se prepara tal alimento o productos alimenticios, los fabricantes normalmente aprovechan los así llamados cultivos iniciadores, que son cultivos usados para procesar alimentos y productos alimenticios. Los cultivos iniciadores son ampliamente usados en la industria diaria. Típicamente los cultivos iniciadores imparten características específicas para diferentes alimentos o productos alimenticios. Es un hecho bien establecido que la consistencia, textura, cuerpo y sensación bucal están fuertemente relacionados con la producción de EPS del cultivo iniciador usado para preparar el alimento o alimentación.

[0069] La expresión "prebiótico" se refiere a una composición o un componente de una composición que aumenta el número de bacterias probióticas en el intestino. Así, prebióticos se refiere a cualquier componente alimenticio no viable específicamente fermentado en el colon por bacterias autóctonas que se piensa que es de valor positivo, por ejemplo lactobacilos. La administración combinada de una cepa probiótica con uno o varios compuestos prebióticos puede mejorar el crecimiento del probiótico administrado *in vivo* dando como resultado un beneficio en la salud más pronunciado. Por lo tanto otra forma de realización de la invención es el uso de una composición que comprende bacterias probióticas vivas según la invención en combinación con al menos un prebiótico. Una forma de realización donde el prebiótico se selecciona del grupo: inulina, un transgalacto-oligosacárido, palatinosa-oligosacárido, oligosacárido de semilla de soja, gentiooligosacáridos, xilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa; lactulosa, lactitol, maltitol, FOS (fructo-oligosacáridos), GOS (galacto-oligosacáridos) y polidextrosa es especialmente preferido.

[0070] La composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544 para su uso en la prevención y/o tratamiento de diabetes mellitus de tipo 2 causado por obesidad, y de síndrome de ovario poliquístico (SOP).

[0071] Un método cosmético para reducir el peso corporal en un sujeto no obeso y sin sobrepeso con un índice de masa corporal (IMC) menor de 25, dicho método comprendiendo proporcionar una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544.

[0072] Un método cosmético para reducir el peso corporal en un sujeto no obeso, dicho método comprende proporcionar una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* con número de registro ATCC 55544.

[0073] La composición según la invención, donde la cepa se combina con al menos un prebiótico.

[0074] Una composición según lo anterior, donde al menos una cepa y/o una fracción y/o metabolito se combina con al menos un prebiótico, donde al menos un prebiótico se selecciona del grupo consistente en: inulina, un transgalacto-oligosacárido, palatinosa-oligosacárido, oligosacárido de semilla de soja, gentiooligosacáridos, oxilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa; lactulosa, lactitol, maltitol, FOS (fructo-oligosacáridos), GOS (galacto-oligosacáridos), y polidextrosa.

[0075] La invención está además posteriormente ilustrada en los siguientes ejemplos no limitativos y las figuras.

Breve descripción de los dibujos

[0076]

Figura 1: representación esquemática de la molécula de proglucagón humano y los péptidos derivados del proglucagón producidos en células L del intestino delgado y grueso. Los números se refieren a las posiciones relativas de los aminoácidos dentro del proglucagón. GRPP: polipéptido pancreático relacionado a la glicentina. Figura adaptada de Wallis *et al.* 2007 (19).

Figura 2: expresión del GCG en el íleon porcino. La expresión GCG fue cuantificada por Q-PCR en el ARN extraído de muestras de la mucosa. Cada punto representa un cerdo individual. La expresión media se presenta como una línea

ES 2 528 602 T3

posterior. La expresión media del grupo de control (ctrl) fue establecida a 1.0. Bb12: cepa BB-12® de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* (DSM15954); La5: cepa La5 de *Lactobacillus acidophilus* (DSM13241); CRL431: cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*, (ATCC 55544). *** $p < 0.001$ (prueba T).

5 Figura 3: el íleon central de un cerdo en ayunas durante toda la noche fue aislado. La arteria, vena, y lumen intestinal del íleon aislado fueron perfundidos con tampones como se describe. La perfusión se efectuó desde un punto de tiempo 0 a 220 minutos. El íleon aislado fue estimulado seis veces con bombesina arterial (indicado como líneas discontinuas verticales). El lumen intestinal fue perfundido con CRL431 desde los puntos de tiempo 39 hasta 146 minutos (indicado por la línea superior horizontal). El efluente venoso fue recogido en 1 periodos de minuto. Los GLP-1, GLP-2 y somatostatina intactos y totales, fueron analizados en el efluente venoso utilizando radioinmunoanálisis previamente descritos y PYY fue analizado en el efluente venoso usando equipos de ELISA de Linco (Millipore) (34).

10 Figura 4: liberación de PYY desde células enteroendocrinas NCI-H716 estimuladas con CRL431 durante dos horas. Las células enteroendocrinas NCI-H716 fueron cultivadas como se describe y CRL-431 fue co-incubada con el cultivo celular en las concentraciones indicadas.

15 Figura 5: expresión de APOA4 en el tejido intestinal. La expresión de SCD-1 fue cuantificada por Q-PCR en el ARN extraído de las muestras de mucosa. Cada columna representa valores de expresión media y la barra de error representa una desviación típica. El valor de expresión medio del grupo de control (ctrl) fue establecido a 1.0 (n=6 lechones). Bb12: cepa BB-12® de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* (DSM15954) (n=7 lechones); La5: cepa La5 de *Lactobacillus acidophilus* (DSM13241) (n=6 lechones); CRL431: cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*, (ATCC 55544) (n=5 lechones).

20 Figura 6: expresión de SCD-1 en el músculo esquelético. La expresión SCD-1 fue cuantificada por Q-PCR en el ARN extraído de las muestras de mucosa. Cada columna representa valores de expresión medios y la barra de error representa la desviación típica. El valor de expresión medio del grupo de control (ctrl) fue establecido a 1.0 (n=6 lechones). Bb12: cepa BB-12® de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* (DSM15954) (n=7 lechones); La5: cepa La5 de *Lactobacillus acidophilus* (DSM13241) (n=6 lechones); CRL431: cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*, (ATCC 55544) (n=5 lechones).

25 Figura 7: ingestión de energía *ad libitum* cuatro horas después de la ingestión de cápsula A (placebo), B (10^9 CFU), o C (10^{10} CFU). N=21, medio \pm SE.

Ejemplos

35 Ejemplo 1: cepas probióticas regulan al alza la expresión GCG en el íleon de cerdos.

[0077] Para investigar si las cepas probióticas regulan la expresión de GCG ileal en animales o no, se alimentaron cerdos jóvenes con una dieta estándar incluyendo bacterias probióticas (es decir cepa BB-12® de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* (DSM15954), cepa La5 de *Lactobacillus acidophilus* (DSM13241), y cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*, (ATCC 55544). La cepa de BB-12® está comercialmente disponible de Chr. Hansen A/S, 10-12 Boege Alle, DK-2970 Hoersholm, Dinamarca. Los cerdos alimentados con la misma dieta estándar pero no suplementada con bacterias probióticas sirvieron como control. Cada grupo consistía en 8 lechones. En el momento del destete a las 4 semanas, los animales fueron trasladados a jaulas donde fueron alojados individualmente y asignados a los tratamientos correspondientes durante 14 días. A los compañeros de jaula se les asignó cada uno de los tratamientos. El número de cerdos jóvenes y cerdas jóvenes en cada tratamiento fue el mismo. Los cerdos fueron alimentados dos veces al día, recibiendo una cantidad de alimento correspondiente al 4% de su peso corporal. Los probióticos fueron administrados sobre la dieta cada mañana.

50 [0078] El permiso para llevar a cabo el experimento fue concedido por la Danish Plant Directorate y el Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

[0079] Después de 14 días de tratamiento, los cerdos fueron matados y los tejidos que comprenden el 75% de la longitud total del intestino delgado (es decir el íleon o parte distal del intestino delgado) fueron muestreados y congelados rápidamente en nitrógeno líquido. El análisis de la expresión génica en el íleon distal fue realizado por análisis de PCR cuantitativo usando cebadores específicos para GCG. El análisis de PCR cuantitativo fue realizado esencialmente como describe Kubista *et al.* (3524).

60 [0080] Las secuencias de cebador eran,
GCG-F: 5'-TTC AGA ATA CAG AGG AGA AAT CCA-3'

ES 2 528 602 T3

GCG-R: 5'-AGT CAT CTG ATC TGG ATC ATC G-3'

[0081] Como se indica en la Figura 2, CRL-431 regula al alza significativamente la expresión de GCG ileal mientras que las dos otras cepas no tenían ningún efecto significativo en la expresión de GCG.

5

Ejemplo 2: efecto de CRL431 en la liberación de la hormona intestinal en el intestino de cerdo aislado perfundido.

[0082] Un cerdo de cepa Danish LYY (XX kg) en ayunas durante la noche fue anestesiado y se aisló una sección de 80 cm del íleon central, incluyendo el suministro arterial y venoso. El segmento fue perfundido con tampón de perfusión de bicarbonato Krebs-Ringer (5% CO₂ en O₂) gasificado que contiene 0.1% albúmina de suero humano; 5% dextrano T-70; 7 mmol/L glucosa; una mezcla de aminoácidos (5 mmol/L); y 15-20% eritrocitos de bovino recién lavados. Se añadió un inhibidor de ciclooxigenasa para prevenir la generación de prostaglandinas en el sistema de perfusión. El tejido fue perfundido con el tampón a 24 mL/min. El lumen intestinal fue perfundido con tampón de perfusión sin eritrocitos a 3 mL/min. La presión de perfusión fue registrada continuamente y el estado de oxígeno y los niveles de glucosa fueron analizados aprox. cada 30 min en el efluente venoso. El efluente venoso fue recogido en periodos de 1 min. Después del centrifugado a 4 °C, los sobrenadantes fueron divididos en partes alícuotas apropiadas y almacenados en el congelador hasta el análisis.

10

15

[0083] El protocolo experimental consistía en la perfusión del lumen intestinal con CRL431 (10⁸ CFU/mL) solo o en combinación con unos estímulos de bombesina arterial (10⁻⁸ M).

20

[0084] Los GLP-1, GLP-2, oxintomodulina y somatostatina intactos y totales fueron medidos utilizando el radioinmunoanálisis previamente descrito (14;34)25). El PYY fue medido utilizando un equipo de ELISA de Linco (Millipore, MA, USA).

25

[0085] Como se indica en la Figura 3, los niveles de los antecedentes de la secreción total de GLP-1 son 75 ng/ml. Los niveles de los antecedentes de las hormonas liberadas se definen como el promedio de las mediciones después del primer estímulo de bombesina, es decir mediciones obtenidas en puntos temporales 19 - 33 minutos. La perfusión del lumen intestinal con CRL431 se efectuó desde el punto de tiempo de 34 a 141 minutos. La perfusión con CRL431 aumenta gradualmente los niveles de GLP-1 total a 215 ng/ml (definido como el promedio de las mediciones después del primer estímulo de bombesina después de la infusión bacteriana, es decir mediciones obtenidas en los puntos temporales 176 - 205 minutos). Las mediciones corresponden a un aumento del 287% en los niveles de GLP-1 total.

30

[0086] También se observó un aumento en los niveles de GLP-1 intacto y biológicamente activo. La perfusión del intestino de cerdo aislado aumentó los niveles de GLP-1 intacto de 54 a 182 ng/ml, lo que corresponde con un aumento del 339%. De forma similar, los niveles de GLP-2 aumentaron de 105 a 405 ng/ml, lo que corresponde con un aumento del 383%.

35

[0087] Es bien conocido que la somatostatina inhibe la secreción de GLP-1 (36). Para verificar que los niveles aumentados de GLP-1 y GLP-2 intactos y totales no son resultado de la expresión de somatostatina disminuida de células L intestinales, se midieron los niveles de esta hormona en el efluente venoso. Como se muestra en la Figura 3, la concentración de somatostatina aumenta durante la perfusión de CRL431 de 40 a 93 ng/ml, lo que corresponde con un aumento del 237%. Así, la expresión aumentada de las hormonas GLP-1 y GLP-2 derivadas del proglucagón no se debe a una reducción en la expresión de somatostatina.

40

45

[0088] Además, como se indica en la Figura 3, los niveles de los antecedentes de secreción de PYY están en 28 ng/ml. La perfusión con CRL431 aumenta gradualmente los niveles de PYY hasta 65 ng/ml. Las mediciones corresponden a un aumento del 228% en los niveles de PYY plasmático después de la perfusión de CRL431.

50

[0089] Una observación sorprendente y altamente interesante se ve tras la perfusión del intestino con la cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei*. Después de la perfusión bacteriana, la liberación inducida por bombesina de GLP-1, GLP-2 y PYY totales e intactos se intensifica con valores máximos de 624, 298, 639, y 148 ng/ml, respectivamente. Esto debería compararse con los valores máximos de GLP-1, GLP-2 y PYY totales e intactos de 281, 139, 316 y 79 ng/ml, respectivamente, durante la infusión bacteriana.

55

[0090] En resumen hemos demostrado que CRL431 aumenta los niveles de GLP-1, GLP-2 y PYY secretados, y que la liberación inducida por la bombesina de GLP-1, GLP-2 y PYY se intensifica (valores máximos).

60

Ejemplo 3: efecto de CRL431 en la liberación de PYY en células enteroendocrinas humanas cultivadas.

[0091] Las células enteroendocrinas humanas, NCI-H716, fueron cultivadas tal y como se describe anteriormente (37).

ES 2 528 602 T3

La CRL431 fue cultivada en MRS (deMan, Rogosa y Sharpe, Difco, BD Diagnostics) y se permitió que alcanzara la fase de crecimiento exponencial. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugado y resuspendidas después de un solo lavado en tampón Krebs-Ringer (Sigma, K4002) con 0.2% BSA (Sigma, A3294) para obtener las siguientes concentraciones: 1×10^7 , 5×10^7 , 7.5×10^7 y 1×10^8 cfu/mL.

[0092] Las bacterias fueron incubadas con el cultivo celular durante dos horas a 37°C. Tras la incubación, los sobrenadantes fueron recogidos en tubos de ensayo que contenían el inhibidor dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) (Millipore, MA, USA). La concentración de PYY de los sobrenadantes del cultivo celular fue determinada por ELISA (Linco, Millipore, MA, USA).

[0093] Como se indica en los niveles de los antecedentes de la Figura 4, los niveles de PYY eran 19 pg/ml. La incubación del cultivo celular NCI-H716 con una concentración en aumento de CRL431 desencadena una liberación de PYY dependiente de la dosis. A la máxima concentración de CRL431, la concentración de PYY alcanzó un máximo de 215 pg/ml que corresponde con un aumento del 1131%.

Ejemplo 4: cepa probiótica regula al alza la expresión de APOA4 en el intestino de cerdo.

[0094] Para indagar si las cepas probióticas seleccionadas regulan la expresión ileal de APOA4 en animales o no, se alimentaron cerdos jóvenes con una dieta estándar que incluía bacterias probióticas (es decir cepa BB-12® de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* (DSM15954), cepa La5 de *Lactobacillus acidophilus* (DSM13241), y cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (ATCC 55544). Los cerdos alimentados con la misma dieta estándar pero no suplementada con bacterias probióticas sirvieron como control. Cada grupo consistía en 8 lechones. En el momento del destete a las 4 semanas los animales fueron trasladados a jaulas donde fueron alojados individualmente y asignados a los tratamientos correspondientes durante 14 días. A los compañeros de jaula se les asignó cada uno de los tratamientos. El número de cerdos jóvenes y cerdas jóvenes en cada tratamiento fue el mismo. Los cerdos fueron alimentados dos veces al día, recibiendo una cantidad de alimento correspondiente al 4% de su peso corporal. Los probióticos fueron administrados sobre la dieta cada mañana.

[0095] El permiso para llevar a cabo el experimento fue concedido por la Danish Plant Directorate y el Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

[0096] Tras 14 días de tratamiento, los cerdos fueron matados y los tejidos que comprenden el 75% de la longitud total del intestino delgado (es decir el íleon o parte distal del intestino delgado) fueron muestreados y congelados rápidamente en nitrógeno líquido. El análisis de expresión génica en el íleon distal fue realizado mediante análisis del PCR cuantitativo usando cebadores específicos para APOA4. El análisis del PCR cuantitativo fue realizado esencialmente como describe Kubista *et al.* (35).

[0097] Las secuencias de cebador eran,

APOA4-F: 5'- AAGCCAAGATCGATCAGAA -3'
APOA4-R: 5'- GAGCTCCTCCGCATAGGG -3'

[0098] Como se indica en la Figura 5, CRL-431 regula al alza la expresión de APOA4 ileal mientras que las otras tres cepas no tuvieron ningún efecto significativo en la expresión de APOA4.

Ejemplo 5: cepa probiótica regula a la baja la expresión de SCD-1 en el músculo esquelético de cerdos.

[0099] Para investigar si las cepas probióticas seleccionadas regulan la expresión de SCD-1 en el músculo esquelético en animales o no, se alimentaron cerdos jóvenes con una dieta estándar que incluía bacterias probióticas (i.e. cepa BB-12® de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* (DSM15954), cepa La5 de *Lactobacillus acidophilus* (DSM13241), y cepa CRL431 de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* (ATCC 55544). Los cerdos alimentados con la misma dieta estándar pero no suplementada con bacterias probióticas sirvieron como control. Cada grupo consistía en 8 lechones. En el momento del destete a las 4 semanas los animales fueron trasladados a jaulas donde fueron alojados individualmente y asignados a los tratamientos correspondientes durante 14 días. A los compañeros de jaula se les asignó cada uno de los tratamientos. El número de cerdos jóvenes y cerdas jóvenes en cada tratamiento fue el mismo. Los cerdos fueron alimentados dos veces al día, recibiendo una cantidad de alimento correspondiente al 4% de su peso corporal. Los probióticos fueron administrados sobre la dieta cada mañana.

[0100] El permiso para llevar a cabo el experimento fue concedido por la Danish Plant Directorate y el Danish Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

[0101] Después de 14 días de tratamiento, los cerdos fueron matados y los tejidos que comprenden músculo esquelético fueron muestreados y congelados rápidamente en nitrógeno líquido. El análisis de expresión génica en el íleon distal fue realizado mediante análisis del PCR cuantitativo usando cebadores específicos para SCD-1. El análisis del PCR cuantitativo fue realizado esencialmente como describe Kubista *et al.* (35).

[0102] Las secuencias de cebador eran,

SCD1-F: 5'- GGGATACAGCTCCCCTCATAG -3'
SCD1-R: 5'- AGTTCCGATGTCTCAAATGC -3'

[0103] Como se indica en la Figura 6, CRL-431 regula a la baja la expresión de SCD-1 en el músculo esquelético en aproximadamente la mitad del nivel de los cerdos no tratados. Esto es comparable a la regulación a la baja observada para La-5. En cambio, BB-12 y BbD, (BB-12 inactivada, muerta) parece regular al alza la SCD-1 muscular en un 100% (para BB-12) en comparación con cerdos no tratados.

Ejemplo 5: efecto de CRL431 en la ingestión de energía, y puntuaciones VAS.

[0104] El estudio fue un estudio de intervención con 22 hombres y mujeres saludables, de 20 a 45 años de edad, que desempeñaron tres pruebas de comida única de aproximadamente cinco horas de duración. El estudio tenía un diseño de cruce donde se evaluaron dos dosis diferentes de bacterias probióticas o placebo en el apetito, ingestión de energía *ad libitum*, y bienestar. Los participantes fueron aleatorizados al orden de las tres cápsula diferentes por ejemplo placebo o 10^9 CFU *L. casei* CRL431 o 10^{10} CFU *L. casei* CRL431. Los días de prueba los participantes tomarían o bien una cápsula probiótica de dosis alta, bien una cápsula probiótica de dosis baja o bien una cápsula de placebo. Se tragaron esta cápsula al principio de un desayuno estándar. De aquí en adelante se tomaron muestras de sangre y se registró el apetito hasta que se sirvió una comida *ad libitum*. Para eliminar el efecto de arrastre de la cápsula y para la seguridad de los participantes pasaban un mínimo de cuatro semanas entre los días de prueba. La noche antes de la prueba de la comida los participantes comieron una cena estándar (4.5 MJ) antes de las 8.00 p.m. y se les pidió que ayunaran a partir de ese momento excepto por un máximo de $\frac{1}{2}$ L de agua. El día de la prueba de la comida única, los participantes de estudio llegaron en ayunas al departamento a las 8.00 a.m. en bus, tren, metro o en bici con pedaleo ligero/lento. Se pesó a los participantes en ropa interior antes de descansar y medir su presión sanguínea. Se insertó un catéter venflon en la vena antecubital derecha y en el momento 0 minutos se extrajo una muestra sanguínea en ayunas, la concentración de hemoglobina se determinó (> 7.5 mmol/l), y se registró el apetito en cuestionarios la escala análoga visual (VAS) antes del desayuno (2.5 MJ) y se sirvió una de las tres cápsulas. Los participantes tuvieron un máximo de 14 minutos para comer el desayuno. Después del desayuno, se extrajeron muestras de sangre en los tiempos: 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 minutos después del principio del desayuno recogiendo hasta 11 muestras de sangre, 250 ml en total. Se registró el apetito cada media hora hasta que se sirvió la comida *ad libitum* cuatro horas después del desayuno. Tras la comida, se registró el apetito por última vez y se puntuó la calidad sensorial de la comida antes de que los participantes abandonaran el departamento.

[0105] Treinta y un sujetos fueron seleccionados y nueve fueron excluidos. Un total de 22 sujetos (once hombres y once mujeres) fueron aleatorizados y 21 completaron las tres visitas en el periodo de estudio. La edad media era de 27.2 años y el IMC medio era 23.6 kg/m^2 y no cambió significativamente durante el periodo de estudio ($p > 0.1$). Todos los participantes tenían la presión sanguínea dentro de un rango normal y tenían valores normales de hemoglobina, $7.5 - 10$ mmol para mujeres y $8 - 11$ mmol para hombres, en cada visita (Tabla 1).

Tabla 1. Características físicas de participantes en la línea base.

| | Todos (n = 21) | Hombres (n = 11) | Mujeres (n = 10) |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Edad (y) | 27.2 ± 7.1^1 | 28.0 ± 7.9 | 26.3 ± 6.3 |
| Peso de composición corporal (kg) | 74.5 ± 12.8 | 84.6 ± 8.1 | 63.3 ± 5.2 |
| IMC (kg/m^2) | 23.6 ± 1.4 | 24.2 ± 1.4 | 22.9 ± 1.1 |
| Presión sanguínea sistólica (mmHg) | 124.8 ± 10.8 | 132.4 ± 7.3 | 116.5 ± 7.4 |
| Diastólica (mmHg) | 78.6 ± 5.1 | 79.5 ± 6.3 | 77.6 ± 3.4 |
| Hemoglobina (mmol/L) | 8.8 ± 0.7 | 9.3 ± 0.4 | 8.3 ± 0.6 |
| Media \pm SD. | | | |

[0106] La sensación de apetito subjetiva fue expresada mientras que VAS medía en mm. No había ninguna diferencia en las puntuaciones de los participantes sobre la saciedad, lleno, hambre, y consumo de alimento esperado cuando se tomaban las diferentes cápsulas ajustadas al género, IMC, y periodo ($p > 0.1$). Además, el apetito compuesto, que es una suma de las puntuaciones de hambre, saciedad, lleno e ingestión esperada, no difirió entre los grupos ($p > 0.1$). No había ninguna diferencia entre el efecto de los tres tipos de tratamientos en "deseo de algo dulce, graso, salado y

sabroso" ($p > 0.1$). Además, se puntuó el bienestar de los participantes igual en los tres tratamientos ($p > 0.1$).

[0107] Las puntuaciones VAS fueron recalculadas para dar el área bajo la curva (AUC). Como con las puntuaciones VAS, no había ninguna diferencia en AUC para cualquiera de las preguntas VAS. No obstante, cuando se miran los resultados AUC numéricamente, los participantes estaban más llenos y satisfechos y se sentían menos hambrientos y pensaron que podrían comer menos potencialmente cuando tomaran la cápsula con dosis alta (HD) 10^{10} CFU *L. casei* CRL431 en comparación con la cápsula de placebo y de dosis baja (LD) 10^9 CFU *L. casei* CRL431 (Tabla 2).

Tabla 2. Área bajo la curva para los parámetros de apetito y bienestar. Todos los datos se presentan como media \pm SD (mm*min) (n=21).

| Tratamiento | Hambre | Lleno | Ingesta de alimento esperada | Saciedad | Bienestar | Compuesto de apetito |
|-------------|--------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Placebo | 12,794 \pm 3,928 | 8,899 \pm 4,095 | 13,381 \pm 3,935 | 10,646 \pm 3,159 | 16,884 \pm 4,007 | 10,342 \pm 3,644 |
| LD | 12,948 \pm 3,798 | 8,634 \pm 3,945 | 13,424 \pm 3,699 | 10,243 \pm 3,545 | 16,577 \pm 4,223 | 10,126 \pm 3,577 |
| HD | 12,271 \pm 3,953 | 9,591 \pm 4,036 | 13,231 \pm 3,790 | 10,906 \pm 3,669 | 16,588 \pm 3,974 | 10,749 \pm 3,705 |

[0108] Hubo un efecto total del tratamiento en la ingestión de energía *ad libitum* en la comida de mediodía consumida cuatro horas después de tomar las diferentes cápsulas ($p = 0.04$). La comparación acertada de pares post-hoc mostró que la ingestión de energía era 455 kJ o aproximadamente 15% más baja tras haber consumido la cápsula 10^{10} CFU *L. casei* CRL431 en comparación con la cápsula 10^9 CFU *L. casei* CRL431 ($p = 0.03$) (Figura 7). No hubo ninguna diferencia en las ingestiones de energía entre participantes que consumieron placebo en comparación con cápsulas con 10^{10} CFU *L. casei* CRL431. Estos cálculos fueron hechos tras el ajuste por género, IMC, y periodo. Los participantes comieron menos en la comida *ad libitum* cuando tomaron 10^{10} CFU *L. casei* CRL431.

Lista de referencia

[0109]

(1) Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007;87(4):1409-39 .

(2) Klonoff DC, Buse JB, Nielsen LL et al. Exenatide effects on diabetes, obesity, cardiovascular risk factors and hepatic biomarkers in patients with type 2 diabetes treated for at least 3 years. *Curr Med Res Opin* 2008;24(1):275-86 .

(3) Verdich C, Flint A, Gutzwiller JP et al. A meta-analysis of the effect of glucagon-like peptide- 1 (7-36) amide on ad libitum energy intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4382-9 .

(4) Tolessa T, Gutniak M, Holst JJ et al. Glucagon-like peptide-1 retards gastric emptying and small bowel transit in the rat: effect mediated through central or enteric nervous mechanisms. *Dig Dis Sci* 1998;43(10):2284-90 .

(5) Kreymann B, Ghatei MA, Burnet P et al. Characterization of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide in the hypothalamus. *Brain Res* 1989;502(2):325-31 .

(6) Larsen PJ, Tang-Christensen M, Holst JJ et al. Distribution of glucagon-like peptide-1 and other proglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience* 1997; 77(1):257-70 .

(7) Wei Y, Mojsov S. Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett* 1995; 358(3):219-24 .

(8) Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 1996;137(11):5159-62 .

(9) Burrin DG, Petersen Y, Stoll B et al. Glucagon-like peptide 2: a nutrient-responsive gut growth factor. *J Nutr* 2001;131(3):709-12 .

(10) Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J et al. The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med* 2000; 6(7):802-7 .

(11) Benjamin MA, McKay DM, Yang PC et al. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut* 2000; 47(1):112-9 .

ES 2 528 602 T3

- (12) Cani PD, Amar J, Iglesias MA et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761-72 .
- 5 (13) Parlevliet ET, Heijboer AC, Schroder-van der Elst JP et al. Oxyntomodulin ameliorates glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294(1): E142- E147 .
- (14) Schjoldager BT, Baldissera FG, Mortensen PE et al. Oxyntomodulin: a potential hormone from the distal gut. Pharmacokinetics and effects on gastric acid and insulin secretion in man. *Eur J Clin Invest* 1988;18(5):499-503 .
- 10 (15) Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW et al. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(10):4696-701 .
- (16) Wynne K, Park AJ, Small CJ et al. Oxyntomodulin increases energy expenditure in addition to decreasing energy intake in overweight and obese humans: a randomised controlled trial. *Int J Obes (Lond)* 2006;30(12):1729-36 .
- 15 (17) Dakin CL, Small CJ, Batterham RL et al. Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* 2004;145(6):2687-95 .
- (18) Wynne K, Park AJ, Small CJ et al. Subcutaneous oxyntomodulin reduces body weight in overweight and obese subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes* 2005;54(8): 2390-5 .
- 20 (19) Wallis K, Walters JR, Forbes A. Review article: glucagon-like peptide 2--current applications and future directions. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25(4):365-72 .
- 25 (20) Tomita R, Igarashi S, Tanjoh K et al. Role of recombinant human glicentin in the normal human jejunum: an in vitro study. *Hepatogastroenterology* 2005;52(65):1459-62 .
- (21) Ayachi SE, Borie F, Magous R et al. Contraction induced by glicentin on smooth muscle cells from the human colon is abolished by exendin (9-39). *Neurogastroenterol Motil* 2005;17(2):302-9 .
- 30 (22) Nygaard R, Nielbo S, Schwartz TW et al. The PP-Fold Solution Structure of Human Polypeptide YY and Human PYY3-36 As Determined by NMR. *Biochemistry* 2006;45(27): 8350-7 .
- (23) Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 2006;444(7121):854-9 .
- 35 (24) Taylor IL. Distribution and release of peptide YY in dog measured by specific radioimmunoassay. *Gastroenterology* 1985;88(3):731-7 .
- (22) Zhang J, Tokui Y, Yamagata K et al. Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia* 2007;50(9):1900-9 .
- 40 (23) Blandino-Rosano M, Perez-Arana G, Mellado-Gil J et al. Anti-proliferative Effect of Pro- inflammatory Cytokines in Cultured Beta Cells is Associated with Erk1/2 Pathway Inhibition: Protective Role of GLP-1. *J Mol Endocrinol* 2008 .
- 45 (24) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95-125 .
- (25) Liu CD, Aloia T, Adrian TE et al. Peptide YY: a potential proabsorptive hormone for the treatment of malabsorptive disorders. *Am Surg* 1996;62(3):232-6 .
- 50 (26) Batterham RL, Cowley MA, Small CJ et al. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 2002;418(6898):650-4 .
- (27) Kalogeris TJ, Rodriguez MD, Tso P. Control of Synthesis and Secretion of Intestinal Apolipoprotein A-IV by Lipid. *J Nutr* 1997;127(3):537S .
- 55 (28) Shen L, Tso P, Woods SC et al. Hypothalamic Apolipoprotein A-IV Is Regulated by Leptin. *Endocrinology* 2007;148(6):2681-9 .
- 60 (29) Tso P, Liu M. Apolipoprotein A-IV, food intake, and obesity. *Physiology & Behavior* 2004; 83(4):631-43 .

ES 2 528 602 T3

- (30) Woods SC. Dietary synergies in appetite control: distal gastrointestinal tract. *Obesity* (Silver Spring) 2006;14 Suppl 4:171S-8S .
- 5 (31) Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ et al. Elevated stearyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab* 2005;2(4): 251-61 .
- (32) Zhang J, Tokui Y, Yamagata K et al. Continuous stimulation of human glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in a mouse model (NOD) delays onset of autoimmune type 1 diabetes. *Diabetologia* 2007;50(9):1900-9 .
- 10 (33) Blandino-Rosano M, Perez-Arana G, Mellado-Gil J et al. Anti-proliferative Effect of Pro- inflammatory Cytokines in Cultured Beta Cells is Associated with Erk1/2 Pathway Inhibition: Protective Role of GLP-1. *J Mol Endocrinol* 2008 .
- (34) Orskov C, Holst JJ, Knuhtsen S et al. Glucagon-like peptides GLP-1 and GLP-2, predicted products of the glucagon gene, are secreted separately from pig small intestine but not pancreas. *Endocrinology* 1986;119(4):1467-75 .
- 15 (35) Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27(2-3):95-125 .
- (36) Hansen L, Hartmann B, Bisgaard T et al. Somatostatin restrains the secretion of glucagon-like peptide-1 and -2 from isolated perfused porcine ileum. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278(6): E1010-E1018 .
- 20 (37) Reimer RA, Darimont C, Gremlich S et al. A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* 2001;142(10):4522-8 .
- 25 NIH (1998): Blount, A. B. S. et al.: CLINICAL GUIDELINES ON THE IDENTIFICATION, EVALUATION, AND TREATMENT OF OVERWEIGHT AND OBESITY IN ADULTS The Evidence Report. NIH PUBLICATION NO. 98-4083. SEPTEMBER 1998. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH .
- 30 Neovius et al (2009) Combined effects of overweight and smoking in late adolescence on subsequent mortality: nationwide cohort study. *British Medical Journal* 338, b496 .
- 35 FAO/WHO (2001) Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October 2001 (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544 para su uso en la prevención y/o tratamiento de la obesidad.
2. Composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544 para su uso en la prevención y/o tratamiento de la diabetes mellitus de tipo 2 o del síndrome de ovario poliquístico (SOP).
- 10 3. Composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde el *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544 se combina con al menos un prebiótico.
- 15 4. Composición para su uso según la reivindicación 3, donde al menos un prebiótico se selecciona del grupo consistente en: inulina, un transgalacto-oligosacárido, palatinosaoligosacárido, oligosacárido de semilla de soja, gentiooligosacárido, xilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa; lactulosa, lactitol, maltitol, FOS (fructo-oligosacáridos), GOS (galacto-oligosacáridos), y polidextrosa.
- 20 5. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la cepa de *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544 aumenta el nivel de GLP-1.
6. Método cosmético para la reducción del peso corporal en un sujeto sin obesidad y sin sobrepeso con un índice de masa corporal (IMC) menor de 25, dicho método comprendiendo proporcionar una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544.
- 25 7. Método cosmético para la reducción del peso corporal en un sujeto no obeso, dicho método comprendiendo proporcionar una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* subesp. *paracasei* CRL431 con número de registro ATCC 55544.

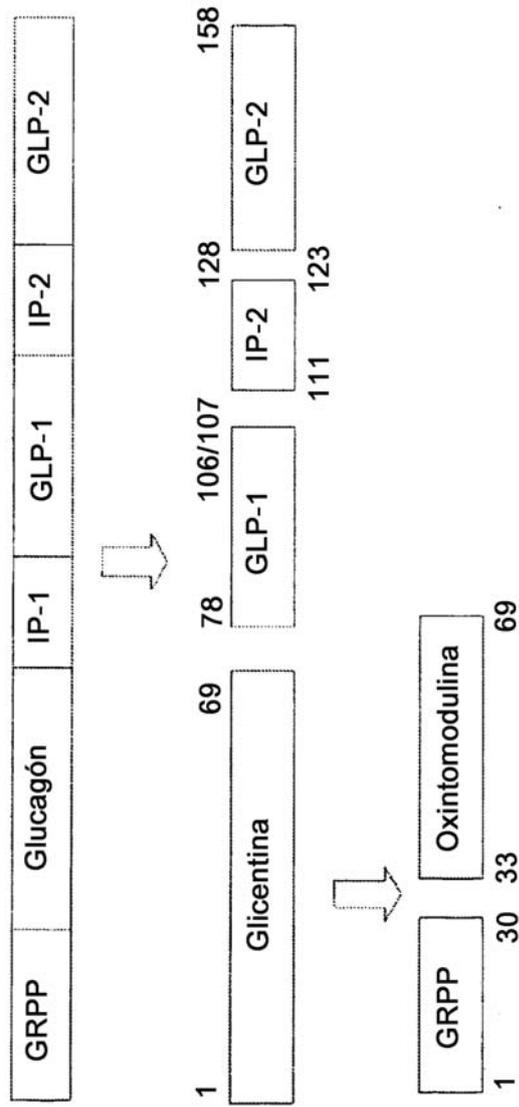


Fig.1

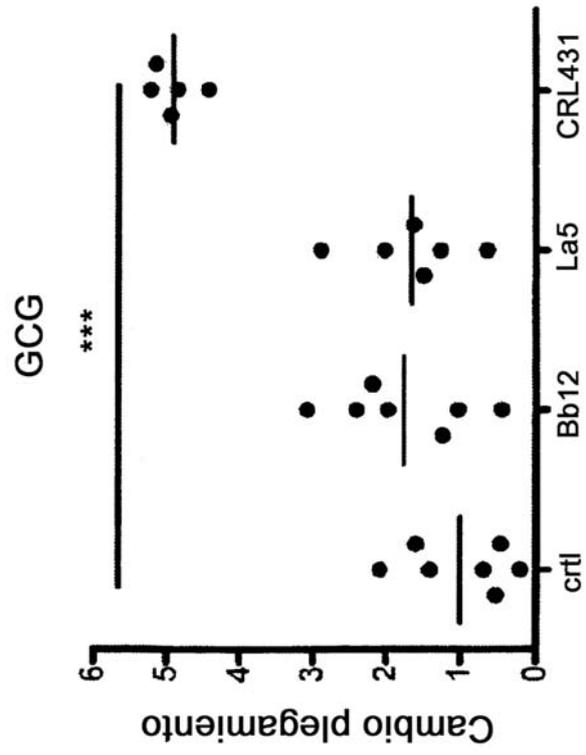


Fig. 2

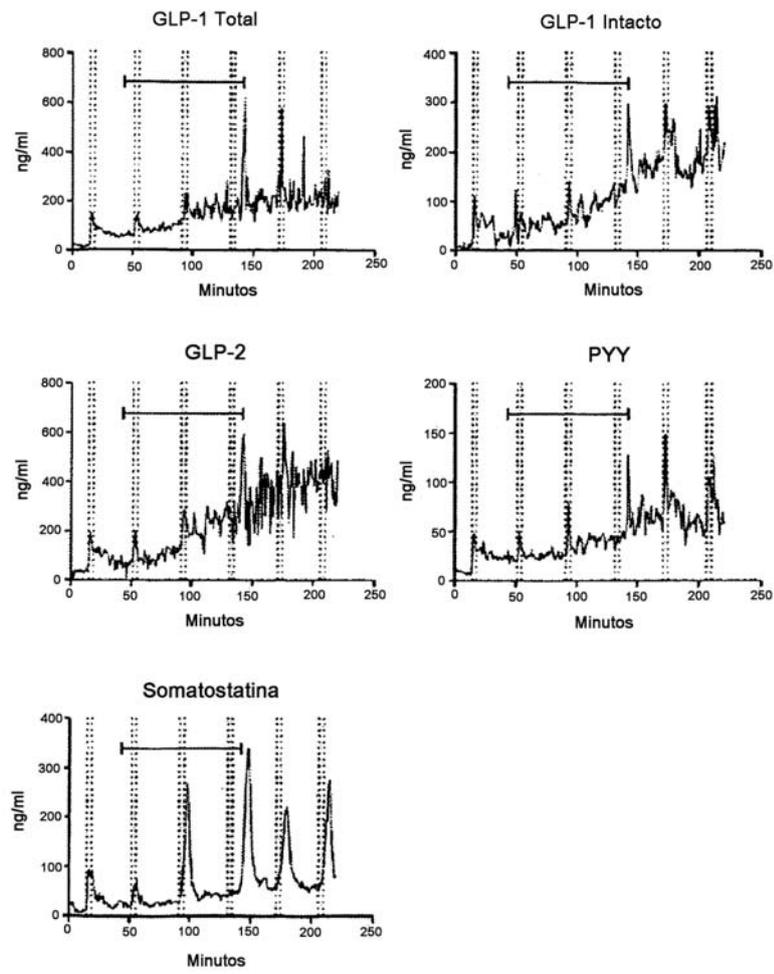


Fig. 3

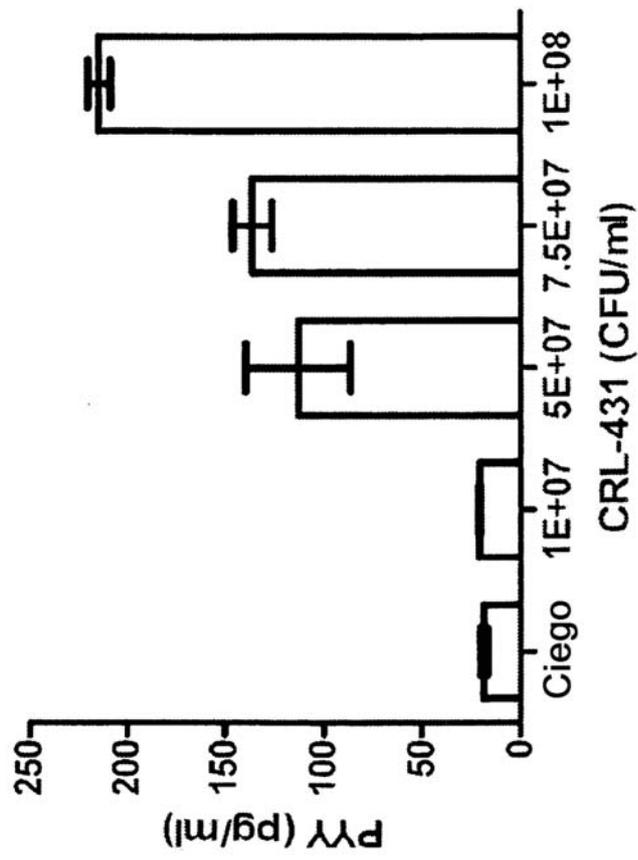


Fig. 4

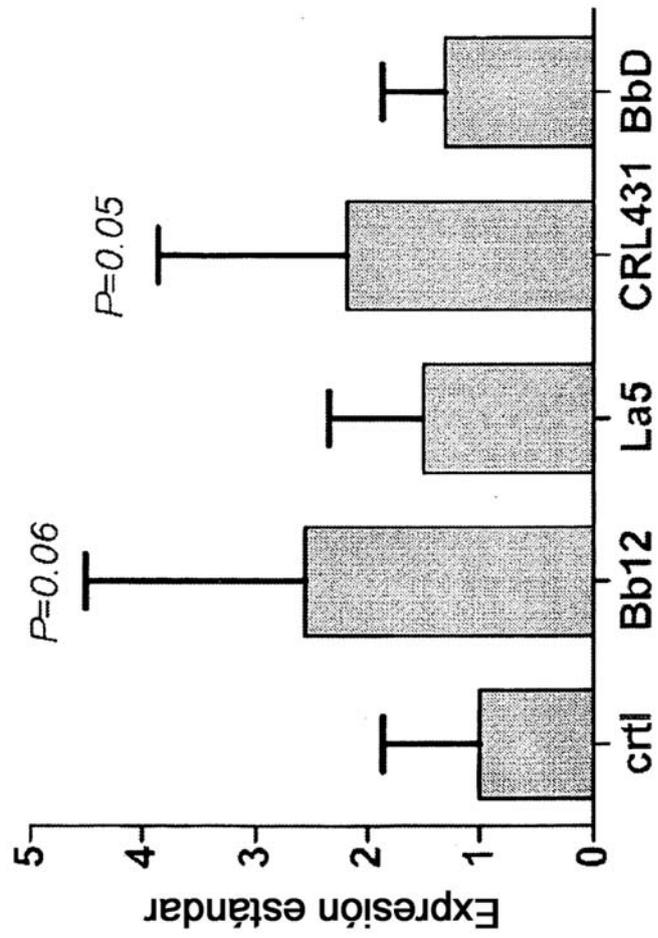


Fig. 5

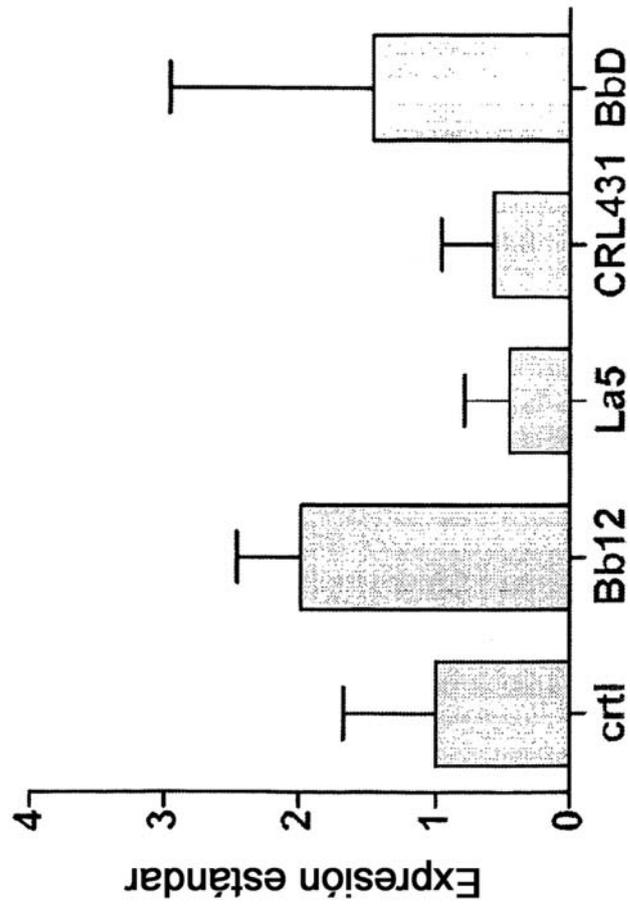


Fig. 6

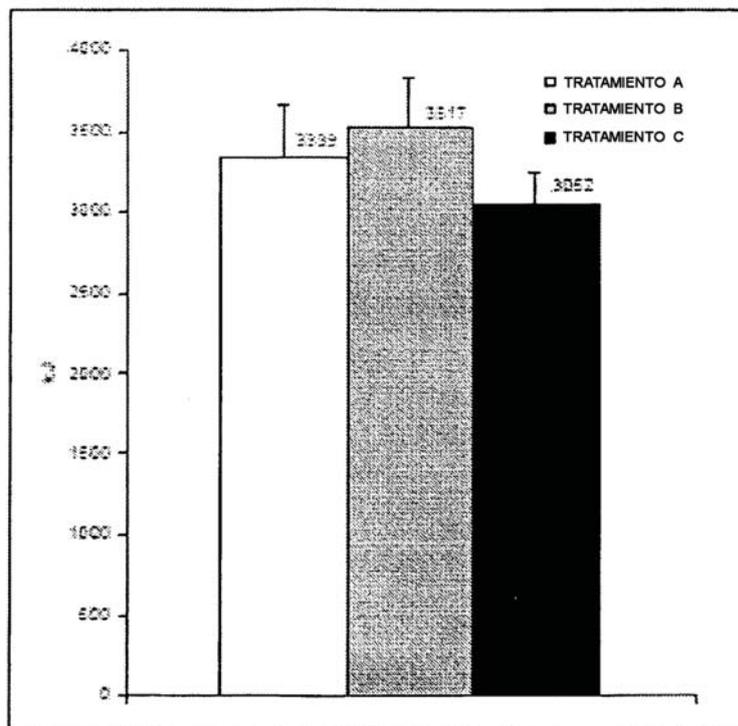


Fig. 7