

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 404**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/23** (2006.01)

**C12R 1/245** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2006 E 11191774 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2431044**

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

30 Prioridad:

**07.10.2005 SE 0502214**

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

**22.04.2016**

73 Titular/es:

**ARLA FOODS AMBA (100.0%)**

**Sønderhøj 14**

**8260 Viby J, DK**

72 Inventor/es:

**OHLSON, KAJSA;**

**MAHLAPUU, MARGIT y**

**SVENSSON, ULLA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 567 404 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Probióticos para influir en el metabolismo de las grasas y la obesidad

**Campo de la invención**

5 La invención se refiere al uso de bacterias probióticas para la fabricación de un producto alimentario, producto para pienso, complemento dietético, producto nutricional y remedio natural para usar en la reducción de la ganancia de peso, prevención de la obesidad, incremento de la saciedad, prolongación de la sensación de saciedad, reducción de la ingesta de alimentos, reducción del depósito de grasas, o reducción del almacenamiento de grasa abdominal con la condición de que el uso de dichas bacterias no sea para tratamiento terapéutico.

**Antecedentes de la invención**

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

La industria alimentaria ya ha respondido a esta demanda desarrollando productos con una densidad energética baja, por ejemplo productos con bajos en grasas y carbohidratos. Las posibilidades de encontrar componentes bioactivos presentes de forma natural o que puedan añadirse a los alimentos, que influyan sobre el riesgo de  
20 obesidad, metabolismo de las grasas, metabolismo de la glucosa y la saciedad, abre nuevas posibilidades para que la industria desarrolle alimentos funcionales con efectos documentados sobre la salud. Recientemente, se han publicado estudios que muestran una correlación entre el consumo de niveles elevados de calcio en leche y un índice de masa corporal (IMC) bajo. Hoy en día, en una serie de artículos de revisión se ha llegado a la conclusión de que el calcio de la leche y los productos lácteos disminuye el riesgo de obesidad, el almacenamiento de grasas corporales y la resistencia a la insulina. El calcio por sí solo no parece tener esas propiedades y se ha especulado que además del calcio se necesiten componentes bioactivos presentes en la leche.  
25

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

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

40 La base para esta solicitud la constituyen los estudios en seres humanos y ratones que, de forma interesante, muestran que un producto probiótico influye sobre la saciedad, disminuye el almacenamiento de grasas y el riesgo de obesidad. Los posibles mecanismos detrás del efecto observado se explicaron a partir de estudios de expresión génica tras el consumo de productos probióticos.

**Descripción de la técnica anterior**

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

50 Un factor importante en el síndrome metabólico es el metabolismo de la glucosa, que incluye la sensibilidad a la insulina. Existe una relación entre el depósito de grasas corporales, la insensibilidad a la insulina y el sobrepeso. También existe una relación entre la saciedad y la sensación de satisfacción. Las interacciones y relaciones entre todas estas funciones son complejas y es difícil identificar la secuencia exacta de acontecimientos que conducen a salud o a enfermedad.  
55

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

Hooper y col. (11) estudiaron la expresión génica en el intestino de ratones expuestos a *Bacteroides thetaiotaomicron*. Concluyeron que los experimentos muestran el papel esencial para la interacción entre la microflora intestinal y el huésped. No se comunicaron efectos sobre el metabolismo energético ni la obesidad. La influencia de los probióticos sobre la expresión génica en la mucosa del intestino delgado se ha estudiado para *Lactobacillus rhamnosus* GG (8). Su conclusión es que la administración de *Lactobacillus* GG está asociada con una respuesta genética compleja. Las principales respuestas observadas son efectos sobre el sistema inmunitario, la inflamación, la apoptosis, el crecimiento y diferenciación celular, la adhesión celular y la transcripción y transducción de señales. No se comunicaron efectos sobre el metabolismo energético, de las grasas de la glucosa o de la insulina. En una presentación oral de W. de Vos, en la 4ª Conferencia NIZO Dairy en 2005, se presentó la influencia de los lactobacilos, por ejemplo, *L. plantarum* 299v, sobre la expresión génica en el intestino y la conclusión fue que el efecto sobre la expresión génica de diferentes cepas varía considerablemente. No se comunicaron efectos sobre el metabolismo energético ni de las grasas. Se han publicado algunos artículos que relacionan la flora intestinal con la ganancia de peso y el almacenamiento de grasas. Bäckhed y col. (7) estudiaron la importancia de la flora intestinal normal para la ganancia de peso y el almacenamiento de grasa corporal. Se demostró que en ratones gnotobióticos transformados en convencionales con una microbiota normal aumentó su grasa corporal en un 60 % y aumentó la resistencia a la insulina durante un periodo de alimentación de 14 días a pesar de una menor ingesta de alimentos. Se presenta una sugerencia de cómo la microbiota puede influir sobre el almacenamiento de los triglicéridos. Por tanto, se sabe que la microbiota intestinal normal influye sobre el metabolismo de las grasas; no obstante, antes de esta investigación no se sabía si la flora normal podía modificarse en relación con el metabolismo de las grasas. Ali y col. (2, 3) han estudiado la influencia de las isoflavonas de soja con o sin probióticos sobre el metabolismo del colesterol y el depósito de grasas y encontraron que los probióticos usados no tenían ninguna influencia sobre el colesterol y ni el depósito de grasas. Otras investigaciones han demostrado que algunas cepas de probióticos pueden influir sobre el nivel de colesterol en sangre (1, 13). Estos y otros estudios en los que se comparan cepas de probióticos demuestran que cepas de probióticos diferentes tienen características diferentes y es importante escoger las cepas correctas para efectos de salud específicos.

En la solicitud de patente PCT WO 04/014403 (15), se describe el uso de probióticos para reducir la cantidad de monosacáridos y disacáridos en los alimentos y, de este modo, tratar o prevenir el riesgo de obesidad. En la patente de EE.UU. nº 6 696 057, Bojrab (4) ha patentado una composición de bacterias de yogur, por ejemplo *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, hiperlipidemias y enfermedades autoinmunitarias, y en la patente de EE.UU. 6 641 808 Bojrab (5) describe el uso de la misma composición también para el tratamiento de la obesidad. Esta invención también se describe en la solicitud de patente europea 1 177 794/6. Las patentes/solicitudes tienen una larga descripción sobre la influencia de los probióticos sobre la salud intestinal, la infección, y la inmunidad, pero el único experimento presentado que confirma la influencia sobre la obesidad es un único ensayo de alimentación en una persona. El uso de té verde o de extractos de té verde en combinación con una serie de componentes bioactivos y probióticos para la pérdida de peso ha sido patentado por Gorsek en las patentes de EE.UU. 6 383 482 (9) y 6 565 847 (10). En ambas patentes, los principales componentes activos son el té verde y los componentes bioactivos, mientras que los probióticos se añaden como parte de la composición básica. En la patente de EE.UU. 6 808 703 y la solicitud de patente japonesa 2001-292728 (16), se describe un modo de preparar un alimento para el tratamiento de la obesidad que contiene levaduras, enterobacterias, bacterias acidolácticas, oligosacáridos y fibra vegetal. No se presentan ejemplos ni reivindicaciones sobre el tratamiento de la obesidad.

### **Descripción de la invención**

Un objeto de la Invención es el uso de bacterias probióticas para la fabricación de un producto alimentario, producto para pienso, complemento dietético, producto nutricional y remedio natural para usar en la reducción de la ganancia de peso, incremento de la saciedad, prolongación de la sensación de saciedad, reducción de la ingesta de alimentos, reducción del depósito de grasas, o reducción del almacenamiento de grasa abdominal con la condición de que el uso de dichas bacterias no sea para tratamiento terapéutico.

Este objeto se consigue en cuanto a que las bacterias probióticas se seleccionan del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) (las bacterias están depositadas en la colección de cultivos LMG en Gent, disponible en la colección de cultivos NCFB y en Chr. Hansen Company DK, respectivamente). Las cepas se denominarán como LMG P-17806, NCFB 1748 y Bb12 (DSM 15954) más adelante.

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

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

En la invención se incluyen los estudios siguientes:

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

## Ejemplos

### 1) Regulación del peso en seres humanos

En un estudio con ocultación doble y controlado con placebo se administró a seres humanos una leche acidificada que contenía probióticos (LMG P-17806 y NCFB 1748) o la misma leche acidificada sin probióticos o un comprimido de calcio. Los grupos consistían en 15, 14 y 10 personas, respectivamente. Las bacterias probióticas se añadieron al producto en una concentración final de  $5 \times 10^7$  UFC/ml y el número de bacterias fue estable en el producto durante el tiempo que duró el experimento. Los participantes estuvieron comiendo 2 x 2,5 dl del producto todos los días. Las personas incluidas tenían un ligero sobrepeso (IMC 25-30). El objetivo del ensayo era estudiar los efectos de los probióticos sobre el metabolismo del colesterol y la ganancia de peso se midió como medida de control. No se realizó ninguna recomendación sobre el control de peso, pero a todos los participantes se les ofreció un tratamiento de reducción de peso tras el ensayo. Las bacterias sobrevivieron al paso por el intestino e incrementaron el número de lactobacilos encontrados en las heces de los participantes en un factor de 5. Tras 4 semanas se observó una sorprendente aunque significativa diferencia en la ganancia de peso entre los tres grupos. La cifra media de ganancia de peso fue 0,25 kg en el grupo que recibió el producto probiótico, 0,75 kg en el grupo que recibió la leche acidificada sin probióticos y 1,4 kg en el grupo que recibió el comprimido.

Véase la figura 1.

### 2) Saciedad y sensación de satisfacción en seres humanos

En un estudio con ocultación doble y controlado con placebo se administró a seres humanos bien una leche acidificada que contenía probióticos en dos dosificaciones diferentes o bien un placebo nº 1 consistente en la misma leche acidificada sin probióticos o bien un placebo nº 2 consistente en leche acidificada sin ninguna bacteria acidoláctica en absoluto. Los microorganismos probióticos LMG P 17806, NCFB 1748, y Bb12 se añadieron al producto en una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC/ml y  $5 \times 10^7$  UFC/ml de cada cepa. Tras un desayuno convencional controlado, que incluía 3 dl de cualquiera de los cuatro productos, se pidió a los participantes que indicaran saciedad y hambre en una escala EVA (Escala Visual Analógica) directamente tras la comida y de forma continua cada media hora durante 4 horas. En el estudio se incluyó a un total de 10 personas y cada participante recibió los cuatro productos pero en diferentes ocasiones y se calcularon las diferencias relativas. Directamente después de la comida se produjo una ligera diferencia en las puntuaciones de saciedad entre los productos. La leche acidificada con probióticos a una concentración de  $5 \times 10^7$  UFC/ml y  $1 \times 10^6$  dio las puntuaciones más altas (puntuación EVA relativa 6,6 y 6,4 respectivamente) y el placebo nº 1 tuvo una puntuación intermedia (puntuación

EVA relativa 6,2) y el placebo nº 2 la más baja (puntuación EVA relativa 5,9). Las puntuaciones de saciedad disminuyeron tras las 3,5 horas a 3,1, 3,0, 2,5 y 2,2, respectivamente. La diferencia fue pequeña pero la diferencia entre los productos persistió y se observó una influencia sobre la sensación de satisfacción para el producto probiótico con dos concentraciones diferentes de las bacterias. Con respecto al hambre, se pudo ver la situación opuesta, es decir los productos probióticos dieron una puntuación de hambre menor que los dos productos placebo. Directamente después de la comida, los dos productos probióticos dieron como resultado puntuaciones de hambre de 0,4 para ambos productos en la escala EVA, el placebo nº 1 una intermedia (puntuación EVA 0,9) y el placebo nº 2 dio una puntuación EVA de hambre de 1,1. Tras 4 horas, las cifras fueron de 6,0, 6,2, 7,0 y 6,9 respectivamente.

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

#### Ingesta de alimentos en ratones

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

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

#### 3) Almacenamiento de grasa abdominal en ratones

Ratones con flora normal recibieron, bien un producto probiótico de leche acidificada que contenía LMG P-17806 o bien un producto de placebo con la misma composición pero sin probióticos, o se mantuvieron como un grupo control que recibió el mismo pienso que los otros dos grupos pero sin la leche acidificada. La cepa de ratones escogida fue C57B16 (Charles River) que es sensible a la obesidad inducida por la dieta. El número de animales incluidos en los diferentes grupos fue de 15 en cada uno de los grupos que recibieron leche acidificada y 3 en el grupo control. Los ratones se introdujeron en el estudio cuando tenían 9 semanas de edad. El número de bacterias probióticas en el producto fue  $1 \times 10^8$  UFC/ml y se permitió a los ratones ingerir el producto libremente, 5 días a la semana durante un número total de 12 semanas. Para una rápida ganancia de peso, se alimentó a los ratones con una dieta rica en grasas (D 12309 de Research Diets Inc. New Jersey, USA que contiene 36 % de grasas durante las primeras 5 semanas y, después, D 12492 (35% de grasas) de la misma empresa durante las semanas restantes del ensayo). Tras 12 semanas se sacrificó a los ratones y se analizaron los datos sobre ganancia de peso, consumo de alimentos y cantidad de grasa abdominal. Los ratones que recibieron leche acidificada ganaron menos peso que los ratones control que no recibieron ninguna leche acidificada. Los ratones que recibieron leche acidificada con probióticos también tuvieron un almacenamiento menor de grasa abdominal en comparación con el grupo que recibió leche acidificada sin probióticos y el grupo control que no recibió ninguna leche acidificada en absoluto.

#### 5) Expresión génica en ratones

Ratones con flora normal y sin gérmenes de la cepa Swiss Webster recibieron leche acidificada que contenía, bien LMG P-17806 o NCFB 1748, o bien un producto de placebo con la misma composición pero sin probióticos durante 10 días. Los ratones tenían entre 6 y 8 semanas de edad cuando se comenzó la administración. Los grupos que recibieron probióticos contenían 6 ratones en cada grupo y el grupo de placebo consistió en 4 animales. Los microorganismos probióticos se añadieron a los productos en una concentración final de  $1 \times 10^8$  UFC/ml y el número de bacterias fue estable en el producto durante el periodo de alimentación. Los ratones recibieron el producto a diario mediante alimentación por sonda oral. Durante el estudio, los ratones tuvieron acceso libre a la dieta de ingrediente purificado (D12450B de Research Diets Inc., New Jersey, EE.UU.). Ambas bacterias probióticas sobrevivieron al paso por el intestino y estuvieron presentes en una cifra significativa en el intestino delgado y grueso de los ratones. Se sacrificó a los ratones y se analizó la expresión génica en el intestino delgado mediante tecnología de micromatriz con oligonucleótidos. Además de los efectos esperados sobre el sistema inmunitario, se

encontró que los efectos imprevistos sobre la expresión de una serie de genes implicados en el metabolismo y la homeostasis energéticos fueron diferentes en el grupo de placebo comparado con los dos grupos con probióticos. Entre los genes que mostraron un cambio significativo en la expresión estuvieron *Scd1*, *Acrp30*, *Adn*, *Thrsp*, *Car3*, y *Apoa-4*, todos los cuales estuvieron regulados positivamente en los grupos que recibieron probióticos, y *Retnlb* que estuvo regulado negativamente en los grupos que recibieron probióticos, en comparación con el grupo con placebo. El patrón de expresión génica diferencial fue muy similar para las cepas de probióticos usadas. La expresión diferencial de los genes de adiposina (*Adn*), adiponectina (*Acrp 30*), anhidrasa carbónica 3 (*Car3*) y beta de tipo resistina (*Retnlb*) en ratones sin gérmenes se confirmó mediante PCR cuantitativa en tiempo real, véase la figura 3. La figura 4 muestra los niveles de expresión de apolipoproteína A-IV (*Apoa4*) en ratones colonizados por flora normal, verificada mediante un abordaje de PCR cuantitativa en tiempo real.

#### 6) Dosificación

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

#### 7) Preparación del producto

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

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

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

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

#### Referencias:

- 1) Agerholm, L., M.L. Bell, G.K. Grunwald y A. Astrup. 2000. The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54:856-860.
- 2) Ali A. A., I. A. Mohamed, C. T. Hansen, T. Wang, M. T. Velasquez and S. J. Bhatena. 2002. Effect of probiotics and isoflavones on metabolic parameters in a genetic model of obesity and diabetes. *FASEB J.* 16:p A1014.
- 3) Ali. A. A., M. T. Velasquez, C. T. Hansen, A. I. Mohamed, y S. J. Bhatena. 2004. Effect of soybean isoflavones, probiotics and their interactions on the metabolism and endocrine system in an animal model of

obesity and diabetes. *J. Nutritional Bioch.* 15:583-590.

- 4) Bojrab G. 2000. Composition and method for treatment of gastrointestinal disorders and hyperlipidemia. Patente de EE. UU. 6 696 057
- 5) Bojrab G. 2000. Composition for treatment of obesity. Patente de EE. UU. 6 641 808.
- 5 6) Bojrab G. 2001. Composition, of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*, for the treatment of gastrointestinal disorders, hyperlipidemia, autoimmune diseases, and obesity. Solicitud de patente European 1 177 794.
- 7) Bäckhed F., H Ding, T. Wang, L. V. Hooper, G. Y. Koh, A. Nagy, C. F. Semenkovich yd J. I. Gordon. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *PNAS* 101:15718-15723.
- 10 8) Di Caro S., H. Tao, A. Grillo, C. Elia, G. Gasbarrini, A. R. Sepulveda, y A. Gasbarrini. 2005. Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Digestive and Liver Disease* 37:320-329.
- 11) Gorsek W. F. 2000. Weight loss composition containing green tea, hydroxycitric acid, 5-hydroxytryptophane, glucomannan, picolinate and *Lactobacillus*. Patente de EE. UU. 6 383 482. Hooper L. V., M Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk y J.I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationship in the intestine. *Science* 291 (5505):881-884.
- 15 10) Gorsek W. F. 2002. Thermogenic weight management composition. Patente de EE. UU. 6 565 847.
- 12) Park H. O., Y. B. Bang, H. J. Joung, B. C. Kim y H. R. Kim. 2004. *Lactobacillus* KTCK 0774BP and *acetobacter* KCTC 0773BP for treatment or prevention of obesity and diabetes mellitus. Patente de EE. UU. 6 808 703.
- 20 13) Pereira D. I. y G. R. Gibson. 2002. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem Mol Biol.* 37:259-281.
- 14) Stepan C. M., S. T. Balley, S. Bath, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahlma, y M. A. Lazar. 2001. The hormone resistine links obesity to diabetes. *Nature* 409:307.
- 15) Song S.H., S. K. Kang, j. H. Kim, y. H. Park, y H. O. Park 2002. Microorganisms for ihibiting obesity and diabetes mellitus. Solicitud de patente PCT WO 04/014403.
- 25 16) Yanagida F., y K. Sano. 2000. Obesity preventative food. Solicitud de patente japonesa 2001-292728.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de al menos una bacteria probiótica para reducir la ganancia de peso, en el que la al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) con la condición de que el uso de dicha bacteria no sea para tratamiento terapéutico.
2. Uso de al menos una bacteria probiótica para incrementar la saciedad, en el que la al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) con la condición de que el uso de dicha bacteria no sea para tratamiento terapéutico.
- 10 3. Uso de al menos una bacteria probiótica para prolongar la saciedad, en el que la al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) con la condición de que el uso de dicha bacteria no sea para tratamiento terapéutico.
- 15 4. Uso de al menos una bacteria probiótica para reducir la ingesta de alimentos, en el que la al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) con la condición de que el uso de dicha bacteria no sea para tratamiento terapéutico.
- 20 5. Uso de al menos una bacteria probiótica para reducir la deposición de grasa, en el que la al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) con la condición de que el uso de dicha bacteria no sea para tratamiento terapéutico.
- 25 6. Uso de al menos una bacteria probiótica para reducir el almacenamiento de grasa abdominal, en el que la al menos una bacteria probiótica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806), *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1748) y *Bifidobacterium lactis* Bb12 (DSM 15954) con la condición de que el uso de dicha bacteria no sea para tratamiento terapéutico.
7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado porque** la bacteria probiótica se usa para fabricar un producto seleccionado del grupo que consiste en un producto a base de leche, un producto a base de cereal y un producto a base de fruta o composiciones derivados de los mismos.
- 30 8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, **caracterizado porque** la bacteria probiótica se usa como un concentrado, por ejemplo, liofilizado.
9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado porque** la bacteria probiótica está comprendida en una cápsula.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado porque** la cápsula contiene una dosificación de bacterias probióticas entre  $1 \times 10^8$  UFC y  $2,5 \times 10^8$  UFC.
- 35 11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el producto probiótico se selecciona del grupo que consiste en un producto alimentario, un producto para pienso, un suplmento dietético, un remedio natural y una formulación farmacéutica activa.

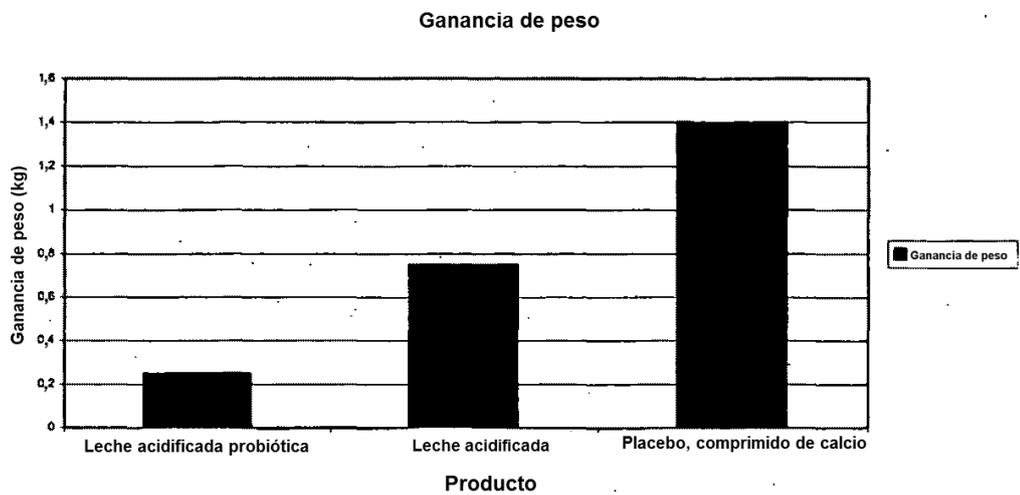


Figura 1. Efecto de los probióticos sobre la ganancia de peso en seres humanos tras 4 semanas de tratamiento.

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

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

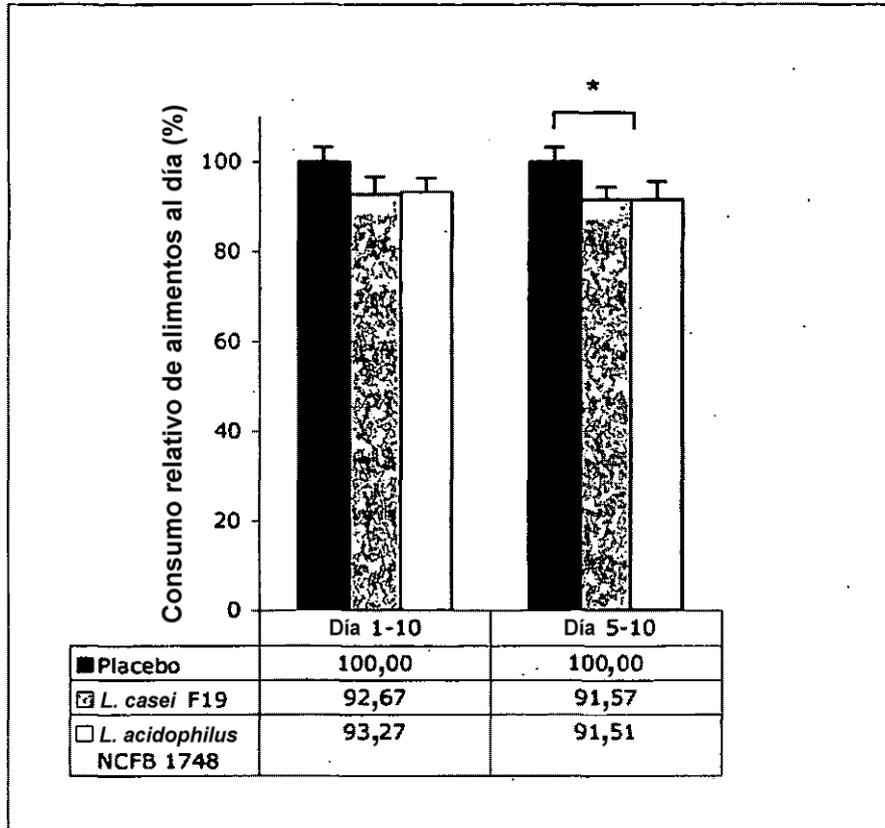


Figura 2. Ingesta diaria de alimentos en dos grupos de ratones receptores de las bacterias probióticas *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806) o *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748, en leche acidificada en comparación con el grupo de ratones con placebo receptores sólo de leche acidificada. El consumo de alimentos se ha estimado para todo el periodo de administración del producto (días 1-10) y tras el periodo de ajuste (días 5-10). Los resultados se expresan como el porcentaje comparado con el grupo de ratones con placebo. La significación estadística se ha determinado mediante pruebas t de Student no pareadas bilaterales.

\*representa  $p \leq 0,05$ .

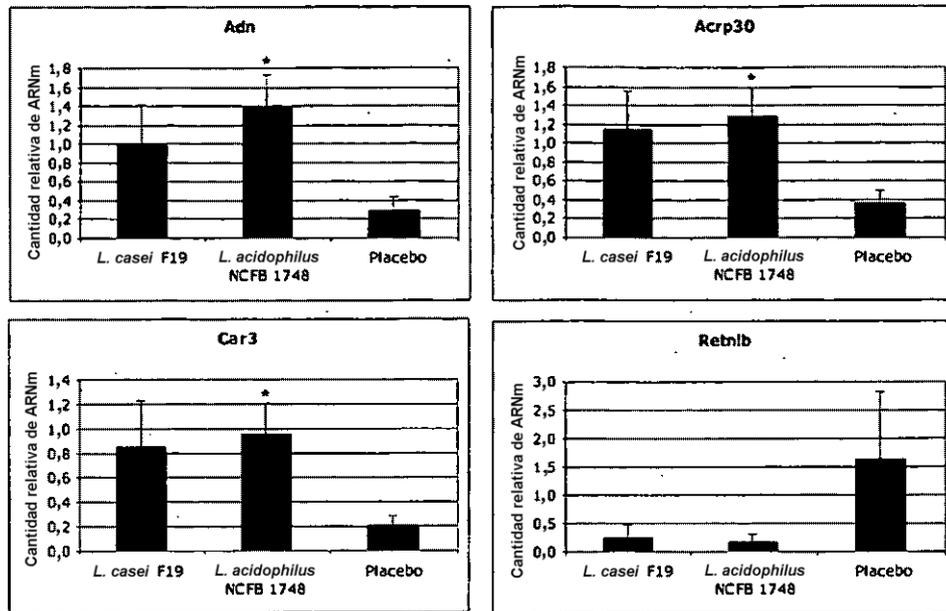


Figura 3. Expresión de los genes de adiposina (*Adn*), adiponectina (*Acrp30*), anhidrasa carbónica 3 (*Car3*) y beta de tipo resistina (*Retnlb*) cuantificada mediante RT-PCR en ratones sin gérmenes. Los dos grupos de ensayo de ratones recibieron las bacterias probióticas *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806) o *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 en leche acidificada mientras que el grupo de ratones con placebo recibió solo leche acidificada. Cada barra representa la media ± ETM. La significación estadística se ha determinado mediante pruebas t de Student no pareadas y bilaterales. \* representa  $p \leq 0,05$ .  $N = 6$  para los dos grupos con probióticos y  $n = 4$  para el grupo de placebo.

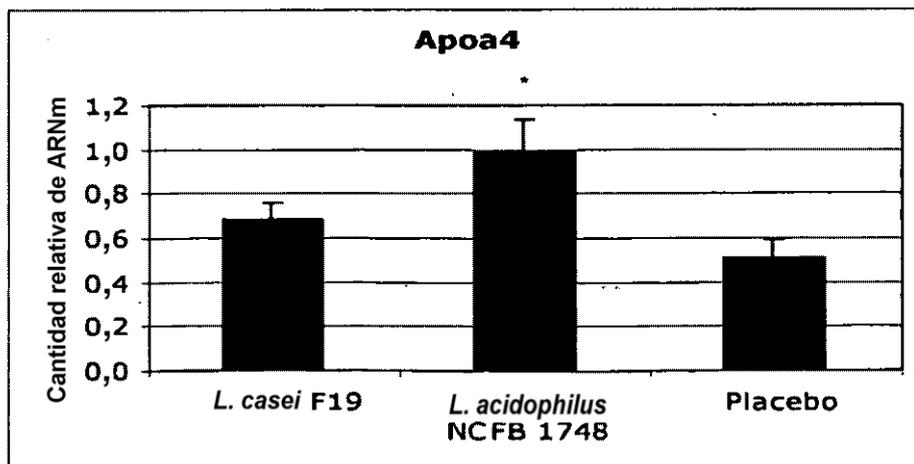


Figura 4. Expresión del gen de apolipoproteína A-IV (*Apoa4*) cuantificada mediante RT-PCR en ratones colonizados con microflora normal. Los dos grupos de ensayo de ratones recibieron las bacterias probióticas *Lactobacillus casei* F19 (LMG P-17806) o *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748 en leche acidificada mientras que el grupo de ratones con placebo recibió solo leche acidificada. Cada barra representa la media ± ETM. La significación estadística ha determinado mediante pruebas t de Student no pareadas y bilaterales. \* representa  $p \leq 0,05$ .  $N = 6$  para los dos grupos probióticos y  $n = 4$  para el grupo de placebo.