

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 081**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74	(2015.01)	C12N 11/02	(2006.01)
A61K 9/50	(2006.01)	C12N 11/04	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)	A23L 33/135	(2006.01)
A61P 1/16	(2006.01)	A61K 9/16	(2006.01)
A61P 3/04	(2006.01)		
A61P 3/06	(2006.01)		
A61P 9/10	(2006.01)		
C12N 1/04	(2006.01)		
C12N 1/20	(2006.01)		
C12N 9/78	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10769192 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2419114**

54 Título: **Composiciones bacterianas para profilaxis y tratamiento de enfermedades degenerativas**

30 Prioridad:

01.05.2009 US 174740 P

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

20.07.2016

73 Titular/es:

**UAS LABORATORIES LLC (100.0%)
555 N. 72nd Avenue
Wausau, WI 54401, US**

72 Inventor/es:

**PRAKASH, SATYA;
JONES, MITCHELL, LAWRENCE y
MARTONI, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 578 081 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

Composiciones bacterianas para profilaxis y tratamiento de enfermedades degenerativas

CAMPO

- 5 La presente descripción se refiere a una composición oral mejorada de una bacteria con alta actividad *bsh*, a un elemento aislado o sobrenadante de la misma y a los procesos para preparar la composición mejorada. La presente descripción también se refiere a los métodos y usos de la composición oral mejorada para reducir el colesterol en suero, los lípidos en suero, la grasa corporal o el índice aterogénico para la profilaxis y el tratamiento de la aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares.

ANTECEDENTES

- 10 *Hipercolesterolemia y Enfermedad Arterial Coronaria*

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es la principal causa de muerte, la forma más común de enfermedad cardíaca y la causa más común de muerte súbita en el mundo occidental. Las evidencias clínicas y epidemiológicas han establecido una conexión clara entre un nivel de colesterol en suero elevado y la EAC. En poblaciones aparentemente sanas, existe una relación exponencial entre el nivel de colesterol en suero y el riesgo coronario. En 15 edades medianas, el riesgo de EAC aumenta de 2 a 3% por cada 1% de incremento del nivel de colesterol.

Se estima que 107 millones de estadounidenses adultos tienen niveles de colesterol en suero total de 5,18 mmol/L (200 mg/dL) y superiores. De éstos, aproximadamente 37 millones presentan niveles de 6,22 mmol/L (240 mg/dL) o por encima. En adultos, niveles de colesterol total de 6,22 mmol/L o superiores se consideran un riesgo elevado de 20 eventos de tipo cardiovascular, mientras que niveles entre 5,18 y 6,22 mmol/L se consideran un riesgo alto en la frontera. Según las recomendaciones del “National Cholesterol Education Program” (NCEP) el principal objetivo de cualquier terapia es la reducción de los niveles de colesterol LDL (Third Report of the NCEP Expert Panel, 2002). En la actualidad nuevas guías consideran otros factores de riesgo tales como la edad, el historial familiar, el tabaquismo, la hipertensión, un HDL bajo y la diabetes mellitus, para estimar los niveles de colesterol umbral que 25 requieren intervención. Los objetivos de LDL en la prevención primaria dependen por tanto de un riesgo absoluto del paciente de padecer eventos relacionados con EAC a corto plazo o a largo plazo. Actualmente, según las recomendaciones recientemente actualizadas de NECP, otros 36 millones adicionales de ciudadanos estadounidenses deberían ser tratados por colesterol elevado. Actualmente, menos de la mitad de los pacientes que se clasifican para tratamiento de modificación de lípidos están recibéndolo, y solo un tercio de los pacientes tratados están alcanzando su objetivo de colesterol LDL.

- 30 *Patogénesis de la Aterosclerosis*

La participación de nivel elevado de colesterol LDL en aterosclerosis y EAC está bien documentada. La aterosclerosis se inicia por la retención de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (p.ej., el colesterol LDL) en la pared arterial. Con el tiempo, las lipoproteínas retenidas en la pared arterial se ven modificadas (es decir, 35 agregadas y oxidadas) y producen una cascada de respuestas biológicas que evolucionan en una respuesta inflamatoria maladaptativa (Tabas et al. 2007). En particular, los monocitos entran en el subendotelio, se diferencian en macrófagos e ingieren las lipoproteínas modificadas retenidas para convertirse en células espumosas cargadas de colesterol. Eventualmente, células inflamatorias entran en las lesiones y ayudan a contribuir a la mencionada respuesta inflamatoria maladaptativa, un proceso acelerado por la retención amplificada de lipoproteínas en lesiones establecidas. Un proceso mediado por citocinas y factores de crecimiento hace que las células de músculo liso 40 migren y formen un tapón fibroso colagenoso (placa aterosclerótica madura), lo más probablemente en la forma de una respuesta de tipo cicatriz para expulsar la lesión de la pared (Tabas et al. 2007). Sin embargo, según progresa la lesión, los macrófagos mueren, dando como resultado áreas de necrosis que contienen residuos extracelulares, cristales de colesterol, proteasas y material trombótico. En ese momento, se puede producir un adelgazamiento del tapón fibroso, una erupción o erosión de placa, produciendo potencialmente eventos vasculares trombóticos agudos 45 tales como el infarto de miocardio y la apoplejía.

Las lipoproteínas de alta densidad desempeñan una función clave en el “transporte de colesterol inverso”, una ruta mediante la cual se elimina el exceso de colesterol de las células extrahepáticas y vuelve al hígado para su excreción del cuerpo. En los tejidos periféricos, se cree que el HDL elimina el colesterol celular a través de una variedad de mecanismos que incluyen la interacción de apolipoproteínas de HDL con sitios de unión de superficie 50 celular o receptores (Tall, 1998). La acción de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) convierte el colesterol absorbido en ésteres de colesterol y a su vez puede incrementar la capacidad de absorción de HDL. Tras retornar al hígado, el colesterol puede ser metabolizado en sales biliares y ser excretado del cuerpo. El colesterol LDL y HDL son los principales factores para mantener el equilibrio de colesterol en el cuerpo, y una relación elevada de HDL a LDL se correlaciona bien con una baja incidencia de AEC en humanos.

- 55 De forma similar, niveles elevados de triglicéridos en suero constituyen un factor de riesgo para aterosclerosis y AEC. Las razones específicas para esto incluyen el aumento de la producción de quilomicrón aterogénico y

remanentes de VLDL, la relación inversa presente entre los niveles en suero de triglicéridos y HDL, el posible incremento resultante en el nivel de LDL atribuible a receptores de LDL hepáticos reducidos remanentes, así como a la formación de LDL más denso y, por tanto, más aterogénico, y a la interacción entre los triglicéridos en suero y el sistema fibrinolítico/coagulación. Debido a las múltiples conexiones entre los niveles elevados de triglicéridos y el riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, es importante el escrutinio para hipertrigliceridemia cuando se determina el riesgo de un paciente para enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

Respuestas Inmunes en Aterosclerosis

Se cree que la patogénesis de la aterosclerosis incluye dislipidemia, disfunción de endotelio vascular y un proceso inflamatorio crónico. Se ha demostrado que en la señalización intercelular de la aterosclerosis hay implicados varios mediadores, que incluyen moléculas pequeñas tales como óxido nítrico, mediadores de lípidos tales como eicosanoides y esteroides y citocinas. La inflamación está mediada por citocinas, glico-proteínas implicadas en la señalización célula a célula, que son producidas por macrófagos y células dendríticas en el epitelio en respuesta a un estímulo corporal antigénico o externo. La respuesta inmune está implicada en la formación de rasgos grasos, cuando el endotelio es activado y expresa quimiocinas y moléculas de adhesión que conducen al reclutamiento de monocitos/linfocitos y la infiltración en el subendotelio. También actúa como el punto de inicio de eventos vasculares clínicos adversos, cuando las células activadas dentro de la placa secretan proteasas de matriz que degradan proteínas de matriz extracelular y debilitan el tapón fibroso, conduciendo a la ruptura y la formación de trombos. Recientemente, se han relacionado los receptores de tipo-peaje (TLR, del inglés "toll-like receptors") de la superficie del epitelio gastrointestinal con la inducción de una respuesta inflamatoria, ayudando a iniciar la señal de inicio para la producción de citocinas pro-inflamatorias (Tobias y Curtiss, 2007).

Se pone especial énfasis en la contribución de citocinas pro- y anti-inflamatorias para la inmunidad patogénica (innata y adaptativa) y reguladora en el contexto de la aterosclerosis. Las citocinas pueden diferenciarse entre las que tienen un modo de acción esencialmente pro-inflamatorio, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), la interleucina-12, la IL-18 y el interferón gamma, y las que tienen un modo de acción anti-inflamatorio, que incluyen IL-4, IL-10, IL-13 y el antagonista de receptor de IL-1 endógeno IL-1ra. En respuesta al entorno local de las citocinas, las células CD4+ se diferencian en el linaje Th1 (pro-inflamatorio) o Th2 (anti-inflamatorio). Entre los principales inductores de las células Th1 y Th2 están la IL-12 y la IL-10, respectivamente. Las citocinas implicadas en el proceso Th1 incluyen la IL-2, el IFN-gamma y el TNF, mientras que las implicadas en el proceso Th2 incluyen IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Se han identificado más de 30 miembros principales de la familia de las interleucinas, la mayoría de los cuales desempeñan una función en la aterogénesis. Específicamente, han sido atribuidas a propiedades principalmente anti-aterogénicas (IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11) y pro-aterogénicas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-18). La modulación de estas interleucinas representa la estrategia más fácilmente aplicable a la inmunoterapia en la aterosclerosis. Se cree que las bacterias del intestino inician una respuesta inflamatoria cuando los TLRs del epitelio reconocen estructuras microbianas no comensales y dicha señal de citocina puede traducirse en un incremento del riesgo de aterosclerosis. El corolario para esta respuesta es que la microflora comensal es requerida para mantener la homeostasis intestinal a través del reconocimiento de sus estructuras no inflamatorias por TLRs. Una investigación reciente ha demostrado que las citocinas pro-inflamatorias producidas en el intestino pueden reducirse enormemente mediante la administración de bacterias comensales (*Lactobacillus acidophilus*) administradas libres en salino o en leche fermentada (Urbanska et al. 2009). Esta investigación demostró que el *L. acidophilus* disminuyó los niveles de IL-6, IL-12, TNF-alfa e IFN-gamma cuando se administra oralmente en salino y en leche fermentada (solo se publicaron los datos de IL-6) (Prakash y Urbanska, 2007).

Además de las citocinas pro- y anti-inflamatorias, se puede decir que la proteína C-reactiva de alta sensibilidad es el marcador inflamatorio en suero más importante para el riesgo coronario. Investigaciones recientes sugieren que los pacientes con niveles basales elevados de CRP tienen un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular, así como de diabetes e hipertensión. Un estudio clínico de 700 enfermeras demostró que aquellas en el cuartil más alto de consumo de grasas trans presentaban niveles en sangre de proteína C-reactiva que eran un 73% más elevados que los del cuartil más bajo (Lopez-Garcia, 2005). Otros han demostrado que la CRP (del inglés "C-reactive protein") puede exacerbar la necrosis isquémica de un modo dependiente de complemento y que la inhibición de CRP puede ser una terapia segura y efectiva para los infartos de miocardio y cerebro (Pepys et al. 2006).

Síndrome metabólico

La dislipidemia, la aterosclerosis y la inflamación crónica están conectadas a otras enfermedades degenerativas a través del síndrome metabólico. El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólico en un individuo e incrementa el riesgo del individuo de desarrollar aterosclerosis. Esta agrupación de signos y síntomas afecta a una de cada cinco personas, y la prevalencia aumenta con la edad. Algunos estudios estiman que la prevalencia en los EE.UU. es de hasta el 25% de la población (Ford et al., 2002). Los síntomas y características incluyen: hiperglucemia en ayunas – diabetes mellitus de tipo 2 o glucosa en ayunas alterada, tolerancia a la glucosa alterada, o resistencia a la insulina; tensión sanguínea elevada; obesidad central (también conocida como adiposidad visceral, de patrón masculino o en forma de manzana), sobrepeso con depósitos grasos principalmente alrededor de la cintura.

Enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD)

La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD, del inglés “non-alcoholic fatty liver disease”) es considerada una manifestación hepática del síndrome metabólico. La NAFLD se define como una inflamación grasa del hígado cuando ésta no es debida a un consumo excesivo de alcohol. La NAFLD está fuertemente relacionada con la obesidad, la dislipidemia, la resistencia a insulina (IR) y la diabetes mellitus de tipo II (no dependiente de insulina).

5 La NAFLD cubre el espectro completo de los trastornos de hígado graso metabólicos, particularmente cuando la histología no está definida. La NAFLD puede manifestarse como esteatosis simple (hígado graso), en el extremo clínicamente más indolente, o puede progresar a una esteatosis con inflamación o fibrosis, en cuyo caso se denomina NASH. Sin embargo, incluso las formas estables de la NAFLD puede suponer una morbilidad aún no identificada, ya que el hígado graso típicamente funciona de forma menos eficiente que el hígado no graso.

10 NASH probablemente representa un estadio intermedio que se caracteriza por esteatosis con inflamación lobular. Se sabe que la NAFLD afecta al 10-39% de la población global general con una incidencia media del 20% (Angulo 2002).

Existen varios factores de riesgo asociados a la NAFLD. Estos factores incluyen afecciones y enfermedades de la vida común tales como la obesidad, la hiperglucemia, la diabetes mellitus de tipo 2 y la hipertrigliceridemia.

15 Adicionalmente, la NAFLD está fuertemente asociada a la obesidad central y a la adiposidad visceral. También se asocian factores genéticos y raciales a NAFLD/NASH. Este trastorno contribuirá de forma sustancial, por tanto, a la carga de enfermedades hepáticas crónicas en las próximas décadas.

Tratamiento y prevención de hipercolesterolemia y dislipidemia

Los métodos para reducir los niveles de colesterol en humanos implican el control de la dieta, la modificación de hábitos, y terapia de ejercicio y fármacos. El control de la dieta por sí solo es insuficiente para la mayoría de los individuos. Los estudios demuestran que una eliminación completa del colesterol en la dieta y una limitación del contenido en grasas hasta menos del diez por ciento de la ingesta calórica diaria da como resultado tan solo un cuatro por ciento de regresión de las placas ateroscleróticas tras cinco años cuando se combina con un control del estrés y ejercicio aeróbico (Ornish et al. 1990).

20

Se han propuesto otras opciones dietarias para reducir el nivel de colesterol LDL, que incluyen fibras solubles, esteroides y estanoles vegetales y proteína de soja. Informes recientes indican que las formas solubles de la fibra dietaria con una ingesta de 5-10 g al día pueden reducir el nivel de colesterol LDL en aproximadamente un 5% (Third Report of the NCEP Expert Panel 2002). Se han publicado pocos, o ninguno, efectos inconsistentes en relación al nivel de colesterol HDL; sin embargo, parece ser que la modulación de las rutas metabólicas del colesterol y biliar puede ser un requisito, ya que existe muchas evidencias en estudios que intentan reducir la ingesta dietaria o incrementar el catabolismo de colesterol, que dan como resultado una reducción del nivel de HDL, a menos que se usen en combinación con una medicación de reducción del nivel de colesterol que afecte a enzimas hepáticas. Además, no se ha demostrado que la fibra insoluble afecte significativamente a los niveles de colesterol en circulación. Los estudios en animales y humanos demuestran que los estanoles y esteroides vegetales reducen el nivel de colesterol total en plasma y bajan los niveles de colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL). Los datos han demostrado que los ésteres de esteroles y estanol derivados de plantas en dosis de 2-3 g/día reducen los niveles de colesterol LDL en un 6-15% sin ningún cambio significativo en los niveles de triglicéridos o de colesterol HDL (Hallikainen y Uusitupa, 1999). Nuevamente, a menudo estudios que no muestran un descenso en el nivel de HDL o un descenso no estadísticamente significativo en el nivel de HDL han incluido pacientes con medicación de reducción del nivel de colesterol que alteran las rutas enzimáticas hepáticas, tales como las estatinas. Se ha demostrado que la proteína de soja incluida en una dieta baja en ácidos grasos saturados y colesterol reduce el nivel de colesterol LDL en aproximadamente un 5%, sin embargo, los requerimientos de dosis no son bien conocidos (Jenkins et al. 2000).

25

30

35

40

Las estatinas pueden reducir significativamente la síntesis de colesterol endógeno, a través de la inhibición de la HMG-CoA reductasa, y regular al alza los receptores de lipoproteína de baja densidad en el hígado, conduciendo a reducciones del nivel de colesterol LDL del 20-30%. La eficacia de las estatinas ha sido evaluada intensivamente en una multitud de ensayos clínicos (Pedersen et al. 1994). Sin embargo, se ha demostrado que las estatinas exhiben efectos secundarios poco habituales pero potencialmente graves. Los más predominantes entre ellos son la miopatía, que puede evolucionar en una rhabdomiólisis que amenace la vida, y la polineuropatía (Gaist et al. 2001; Gaist et al. 2002; Omar y Wilson 2002; Staffa et al. 2002).

45

50

También se ha demostrado que la terapia de fibratos ofrece beneficios a largo plazo en pacientes de alto riesgo con bajo nivel de colesterol HDL y alto nivel de dislipidemia de triglicéridos (Goldenberg et al. 2008). Sin embargo, los fibratos también se asocian a una variedad de efectos adversos que incluyen un aumento del riesgo de cálculos biliares, miopatía y malestar de estómago (Sgro y Escousse, 1991).

La niacina ha sido usada ya desde hace algún tiempo, en dosis de 1-2 gramos al día, para reducir los niveles de triglicéridos y colesterol LDL. Cabe destacar que se ha demostrado que la vitamina B3 aumenta el colesterol HDL a estos niveles y se ha prescrito a pacientes con un bajo nivel de colesterol HDL que están en riesgo de padecer un evento cardíaco. Desafortunadamente, con el uso regular aparecen efectos secundarios incómodos y graves que incluyen sofocos faciales y de cuerpo completo.

55

Los secuestrantes de ácido biliar (BAS) han sido usados clínicamente desde los años 1960 para reducir el nivel de colesterol LDL. Los secuestrantes de ácido biliar tienen una baja tasa de aceptación debido, en parte, a los efectos secundarios gastrointestinales (Probstfield y Rifkind, 1991).

Probióticos

- 5 Se ha publicado que los probióticos están asociados a una variedad de beneficios para la salud clínicamente relevantes. Se han estudiado particularmente bien varias cepas de bacterias de ácido láctico en humanos y animales. Ensayos clínicos controlados con placebo han demostrado que *L. reuteri*, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* y *S. boulardii* son eficaces para reducir la duración de la diarrea aguda (Huang et al. 2002). *L. rhamnosus* GG administrado a niños redujo el riesgo de diarrea nosocomial y de gastroenteritis de rotavirus (Szajewska et al. 2001).
- 10 Los estudios de Aso et al. revelaron que el *L. casei* Shirota aumenta el porcentaje de células T colaboradoras y de células NK en pacientes adultos de cáncer colorrectal, y que tiene un efecto protector sobre la recurrencia de cáncer de vejiga superficial (Aso et al., 1995). Adicionalmente, se ha demostrado que cepas seleccionadas de lactobacilos suprimen de forma significativa los tumores intestinales por mutágenos químicos (McIntosh et al. 1999). Las bacterias de ácido láctico han sido administradas para prevenir la sepsis en pacientes con pancreatitis aguda severa. Un estudio aleatorizado de Rayes et al. que implicaba pacientes de trasplante hepático reveló que las infecciones post-operatorias se veían reducidas significativamente cuando se administraban células de *L. plantarum* vivas en comparación con el tratamiento antibiótico estándar (Rayes et al. 2002). Como medio para prevenir la alergia, un estudio controlado aleatorizado realizado por Lodinova-Zadnikova et al. investigó el efecto de la colonización en el nacimiento con *Escherichia coli* no patógena Nissle 1917 (Lodinova-Zadnikova y Sonnenborn 1997). Los sujetos inoculados con la cepa de *E. coli* mostraron una colonización significativamente reducida de patógenos bacterianos, así como una incidencia significativamente menor de alergias después de 10 y 20 años, con respecto a los sujetos de control. También se han usado probióticos como opciones de tratamiento para el manejo de enfermedades inflamatorias del intestino (IBD, del inglés "Inflammatory Bowel Diseases") tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa y la pouchitis.
- 25 El *L. reuteri* está bien establecido como uno de los miembros más extendidos de las bacterias intestinales naturales. Se ha documentado que cepas de *L. reuteri* específicas de hospedante confieren protección de amplio espectro frente a una selección de enfermedades asociadas a microbios y productos químicos en humanos y animales (Dobrogosz, 2005). Sin embargo, la terapia tradicional con probióticos implica la administración de bacterias con la esperanza de que algunas bacterias sobrevivan a las severas condiciones gástricas y colonicen el colon, donde las bacterias se reproducirán y vivirán indefinidamente. Muchas menos bacterias sobreviven en el duodeno, el jejunio o el íleo debido a factores tales como la acidez, la respuesta inmune y la concentración de bilis. Las bacterias deben estar presentes en un duodeno o el jejunio del intestino delgado para reducir el nivel de colesterol y en particular el ácido biliar.

SUMARIO

- 35 Los inventores de la presente han determinado que las bacterias altamente activas en hidrolasa de sal biliar (*bsh*) proporcionan un agente mejorado para reducir el nivel de colesterol en suero, el nivel de lípidos en suero, la grasa corporal y el índice aterogénico para profilaxis y tratamiento de aterosclerosis, y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

- 40 Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona una composición oral que comprende una bacteria con alta actividad *bsh*, un aislado o un sobrenadante de la misma; en donde la bacteria con alta actividad *bsh* degrada > 50 µmol de ácido glicodesoxicólico (GDCA)/gramo/hora y > 2 µmol de ácido taurodesoxicólico (TDCA)/gramo/hora cuando se mide a lo largo de 1 hora y 5 horas, respectivamente; o degrada >65 µmol GDCA/g/h y >7 µmol TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos. En una realización, las bacterias con alta actividad *bsh* degradan >300 µmol de GDCA/g/h y >40 µmol de TDCA/g/h cuando se miden a lo largo de 30 minutos. En otra realización, las bacterias con elevada actividad *bsh* degradan >2000 µmol de GDCA/g/h y >500 µmol de TDCA/g/h cuando se miden a lo largo de 30 minutos. En otra realización adicional, las bacterias con elevada actividad *bsh* degrada >15000 µmol de GDCA/g/h y >2000 µmol de TDCA/g/h cuando se miden a lo largo de 30 minutos.

- 50 En una realización, la bacteria es *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Leuconostoc*. En otra realización, la *Lactobacillus* es *Lactobacillus reuteri*, opcionalmente, *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55148), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 702655), *Lactobacillus reuteri* (LMG 18238), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32271), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32305), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 37470), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44001) o *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44144). En otra realización, la composición comprende además un vehículo.

- 55 En otra realización adicional, la concentración de bacterias es de 10^6 – 10^{12} unidades formadoras de colonia (CFU)/gramo.

Las bacterias de la presente descripción están contenidas opcionalmente en un polímero o en una microcápsula o nanocápsula.

5 En otra realización, la composición oral descrita en la presente memoria se cultiva en condiciones de fermentación que comprenden una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, un pH de 4-7, opcionalmente 5, y un tiempo de recolección de 12-24 horas, opcionalmente 12-16 horas. En una realización, la fuente de carbono comprende maltosa, sacarosa, dextrina, una combinación de sorbitol y glucosa o una combinación de inulina y glucosa. En otra realización adicional, la fuente de nitrógeno comprende (i) extracto de levadura y extracto de malta, extracto de levadura y extracto de vacuno, o hidrolisato de caseína y extracto de malta; y (ii) peptona o triptona.

10 En otra realización adicional, la composición oral descrita en la presente memoria está liofilizada con lioprotectores. En una realización, los lioprotectores comprenden una concentración final de 0,2% a 10% de maltodextrina y de 0,05% a 0,33% de extracto de levadura ó 0,05-2,5% de inulina y de 0,05 a 0,1% de extracto de levadura. En una realización, los lioprotectores comprenden una concentración final de 2-4% de maltodextrina y 0,1% de extracto de levadura, 0,3% de inulina y 0,1% de extracto de levadura, ó 0,3% de inulina.

15 En una realización adicional, la composición oral descrita en la presente memoria se almacena en líquido, en donde las condiciones de almacenamiento líquido comprenden una disolución conservante final que comprende 2,5-10% de medio de crecimiento, 50-99,99% de yogur u otro lácteo fermentado, 50-99,99% de sobrenadante de cultivo o 5% de MRS.

20 En otra realización adicional, la composición oral descrita en la presente memoria se congela súbitamente en una disolución crioprotectora final, tal como 0,2-10% de maltodextrina, opcionalmente 1-3% de maltodextrina y de 0,05 a 0,33% de extracto de levadura, opcionalmente 0,1-0,2% de extracto de levadura, de 0,05 a 2,5% de inulina, opcionalmente al menos 0,2% de inulina, trehalosa 0,5M, fructosa 0,5M, lactosa 0,5M, maltosa 0,5M ó 50-99,99%, opcionalmente 50%, de medio agotado.

25 En otro aspecto, la composición oral de la presente descripción comprende además un agente reductor del nivel de triglicéridos, un agente para aumentar el nivel de HDL o para limitar el descenso del nivel de HDL, un agente reductor del nivel de colesterol, un agente para preservar la actividad de *bsh*, un agente para modular adipocinas u hormonas de la obesidad, un agente hipoglucémico, o un agente terapéutico para reducir las citocinas pro-inflamatorias IL-1 α / β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN-gamma, TNF-alfa o para aumentar el nivel de las citocinas anti-inflamatorias IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11.

30 En otro aspecto de la presente descripción, los inventores de la presente proporcionan métodos y usos de las composiciones orales para reducir el nivel de colesterol en suero, el nivel de lípidos en suero, la grasa corporal o el índice aterogénico, y para profilaxis y tratamiento de la aterosclerosis, y enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares en un animal, opcionalmente un mamífero, tal como un humano.

También se proporcionan en la presente memoria procesos para producir bacterias con elevada actividad de *bsh* que comprenden el cultivo de las bacterias en condiciones de fermentación; la liofilización de las bacterias con lioprotectores, el almacenamiento de las bacterias en condiciones de almacenamiento líquidas y la congelación espontánea de las bacterias con crioprotectores.

35 Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Cabe destacar, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las realizaciones preferidas de la descripción, se proporcionan únicamente a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones que caen dentro del espíritu y el alcance de la descripción serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la descripción detallada.

40 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Las realizaciones de la descripción se describirán ahora en relación a las figuras, en las que:

Figura 1: muestra la desconjugación de TDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (ATCC 53608, ATCC 53609, ATCC 55148, ATCC 55739 y NCIMB 701359) con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

45 Figura 2: muestra la desconjugación de GDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (ATCC 53608, ATCC 53609, ATCC 55148, ATCC 55739 y NCIMB 701359) con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

Figura 3: muestra la desconjugación de TDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus fermentum* con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

50 Figura 4: muestra la desconjugación de GDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (LabMet, NCIMB 701359) y *Lactobacillus fermentum* (ATCC 11976) con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

Figura 5: muestra la desconjugación de TDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (LMG 9213, NCIMB 11951, ATCC 23272, NCIMB 702656, NCIMB 701359 y NCIMB 701089) con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

5 Figura 6: muestra la desconjugación de GDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (LMG 9213, NCIMB 11951, ATCC 23272, NCIMB 702656, NCIMB 701359 y NCIMB 701089) con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

Figura 7: muestra el tamaño de la zona de precipitación de 3 *Lactobacillus reuteri* con actividad *bsh*: Lr010: *Lactobacillus reuteri* (LabMet), Lr052: *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089) y Lr050: *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359).

10 Figura 8: muestra la desconjugación de TDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55148, ATCC 55739, NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, LMG 22877, LMG 22878, LMG 22879, CCUG 32305, CCUG 37470, CCUG 44001, CCUG 44144, CCUG 47824) con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

15 Figura 9: muestra la desconjugación de GDCA por acción de cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55148, ATCC 55739, NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, LMG 22877, LMG 22878, LMG 22879, CCUG 32305, CCUG 37470, CCUG 44001, CCUG 44144, CCUG 47824) con el tiempo. El experimento se llevó a cabo por triplicado y las barras de error representan una desviación estándar respecto a la media.

20 Figura 10: muestra un conjunto representativo de microfotografías de morfología de microcápsula con diferentes condiciones lioprotectoras a una relación 7:3 de microcápsula a lioprotector para salino, trehalosa 1M, y un 10% de leche desnatada usado para la liofilización y rehidratación de *Lactobacillus* microencapsulados.

DESCRIPCION DETALLADA

25 Los inventores de la presente han demostrado que las bacterias con elevada actividad de *bsh* proporcionan una composición oral mejorada para reducir el nivel de colesterol en suero, el nivel de lípidos en suero, la grasa corporal y el índice aterogénico, y para la profilaxis y el tratamiento de aterosclerosis, y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.

Composiciones

30 Por consiguiente, se proporciona una composición oral para reducir el nivel de colesterol en suero, el nivel de lípidos en suero, la grasa corporal o el índice aterogénico, o para la profilaxis o el tratamiento de aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares, comprendiendo la composición una bacteria con actividad elevada de *bsh*, un elemento aislado o sobrenadante de la misma; en donde la bacteria con elevada actividad de *bsh* degrada >50 µmol de ácido glicodesoxicólico (GDCA)/gramo/hora y >2 µmol de ácido taurodesoxicólico (TDCA)/gramo/hora cuando se mide a lo largo de 1 hora y 5 horas, respectivamente; o degrada >65 µmol de GDCA/g/h y >7 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos. En una realización, la bacteria con elevada actividad de *bsh* degrada >300 µmol de GDCA/g/h y >40 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos. En otra realización, la bacteria con elevada actividad de *bsh* degrada >2000 µmol de GDCA/g/h y >500 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos. En otra realización adicional, la bacteria de elevada actividad de *bsh* degrada >15000 µmol de GDCA/g/h y >2000 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos.

En una realización, la composición comprende además un vehículo.

40 Bacterias con elevada actividad de *bsh*, tal como se usa en la presente memoria se refiere a bacterias que degradan >50 µmol de GDCA/gramo/hora y >2 µmol de TDCA/gramo/hora cuando se mide a lo largo de 1 hora y 5 horas, respectivamente; o que degradan >65 µmol de GDCA/g/h y >7 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos, opcionalmente >300 µmol de GDCA/g/h y >40 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos, o >2000 µmol de GDCA/g/h y >500 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos, o >2000 µmol de GDCA/g/h y >500 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos o >15000 µmol de GDCA/g/h y >2000 µmol de TDCA/g/h cuando se mide a lo largo de 30 minutos y se identifican fácilmente por parte de un especialista en la técnica en base a los métodos descritos en los Ejemplos. En una realización, la degradación de GDCA y TDCA se mide con HPLC. La determinación de sales biliares mediante HPLC se describe en Scalia 1988 y Jones et al. 2003.

50 El término "elemento aislado" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una porción separada, aislada o fraccionada del cultivo celular o producto de fermentación que puede ser más puro o más activo que la muestra sin purificar. El término "sobrenadante", tal como se usa en la presente memoria, se refiere al líquido que queda por encima del material depositado por decantación, precipitación o centrifugación.

55 En una realización, las bacterias con elevada actividad de *bsh* son bacterias vivas. El término "bacterias vivas" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una biomasa de bacterias metabolizadoras de nutrientes y

excretoras de residuos. En una realización, las bacterias vivas son bacterias probióticas. El término “bacterias probióticas” tal como se usa en la presente memoria se refiere a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedante.

5 La bacteria con elevada actividad de *bsh* es opcionalmente *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Leuconostoc*. En una realización, la *Lactobacillus* es *Lactobacillus reuteri*, opcionalmente, *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55148), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 702655), *Lactobacillus reuteri* (LMG 18238), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32271), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32305), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 37470), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44001) o *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44144).

10 En otra realización, el *Lactobacillus reuteri* se adhiere a las células epiteliales gastrointestinales, compite por la adhesión, o inhibe la unión de otras bacterias debido a proteínas de superficie celular.

15 En una realización, la concentración de las bacterias en las composiciones orales descritas en la presente memoria es de $10^6 - 10^{12}$ unidades formadoras de colonia (CFU)/gramo, opcionalmente de $10^8 - 10^{12}$ CFU/gramo. En otra realización, la composición proporcionada en la presente memoria comprende $10^6 - 10^{14}$ CFU opcionalmente $10^8 - 10^{13}$ CFU.

El término “*bsh*” o “hidrolasa de sal biliar” tal como se usa en la presente memoria se refiere a una enzima capaz de hidrolizar sales biliares producidas por la bacteria.

20 Las bacterias con elevada actividad *bsh* pueden cultivarse en condiciones de fermentación que mejoren la producción de biomasa y la actividad de *bsh*. En una realización, las condiciones de fermentación comprenden la inoculación en un medio que comprenda fuentes de carbono y nitrógeno y que tenga un pH de 4 a 7 y un tiempo de recolección de 12 a 24 horas. En una realización particular, el pH de las condiciones de fermentación es 5. En otra realización adicional, el tiempo de recolección es de 12 a 16 horas.

25 En una realización, la fuente de carbono comprende maltosa, sacarosa, dextrina, una combinación de sorbitol y glucosa o una combinación de inulina y glucosa. En una realización particular, la fuente de carbono es maltosa. En una realización, las fuentes de carbono se añaden en una concentración final de 2%, por ejemplo, si se usan inulina y glucosa, de 1% de cada uno si se añaden a una concentración final de 2%.

30 En otra realización, la fuente de nitrógeno comprende (i) extracto de levadura y extracto de malta, extracto de levadura y extracto de vacuno, o hidrolisato de caseína y extracto de malta; y (ii) peptona o triptona. En una realización, la fuente de nitrógeno comprende además cisteína. La peptona puede ser cualquier peptona, que incluye aunque sin limitación, la peptona nº 3, peptona de pez, peptona de soja, peptona de proteosa y peptona de caseína. En una realización, la fuente de nitrógeno se añade a un total de 2,5%, por ejemplo, si se usa una fuente de peptona, levadura y extracto de malta, se añade un 1% de peptona, un 0,5% de extracto de levadura y un 1% de extracto de malta hasta una concentración final de 2,5%. En otra realización, el extracto de vacuno sustituye al extracto de malta y los sustitutos de caseína bien a la peptona o bien al extracto de levadura. En otra realización se
35 añade de 0,01 a 0,05% de cisteína, opcionalmente 0,01%.

En una realización, las bacterias con elevada actividad *bsh* son bacterias libres. El término “bacterias libres” tal como se usa en la presente memoria se refiere a bacterias que no están inmovilizadas sobre un polímero o encapsuladas por microencapsulación celular artificial.

40 En otra realización, las bacterias con elevada actividad de *bsh* están contenidas o inmovilizadas en un polímero, opcionalmente un polímero natural. Los polímeros naturales incluyen, sin limitación, alginato, chitosán, agarosa, pectina, agarpectina, genipina y celulosa. En una realización, las bacterias con elevada actividad de *bsh* están inmovilizadas sobre una película.

45 En otra realización adicional, las bacterias con elevada actividad de *bsh* están encapsuladas. Encapsulación es un término usado para incluir los métodos de macroencapsulación, microencapsulación y nanoencapsulación. Los términos microencapsulación y nanoencapsulación se refieren a una subclase de encapsulación, donde se producen cápsulas pequeñas, micro- o nano-encapsuladas. Las técnicas de encapsulación y microencapsulación son conocidas en la técnica. Las microcápsulas son pequeños recipientes esféricos o tejidos recubiertos en el rango de 1-999 μm y nanocápsulas en el rango de 1-999 nm, mientras que las macrocápsulas son recipientes membranosos de lámina plana o fibra hueca de mayor tamaño. Las macro-, micro- y nano-cápsulas deben contener un entorno
50 celular que sea capaz de soportar el metabolismo y la proliferación celular, ya que las células que acomodan proporcionan a la cápsula funcionalidad.

La microencapsulación o nanoencapsulación celular artificial es una técnica usada para encapsular materiales biológicamente activos en membranas poliméricas semi-permeables ultra finas especializadas (véase, p.ej., Chang and Prakash, 1997; Chang, 1964). Los métodos para preparar células artificiales han sido bien documentadas en la técnica pertinente. Las membranas celulares artificiales se seleccionan o diseñan opcionalmente para cada dispositivo terapéutico específico por parte del especialista en la técnica, porque se pueden diseñar varias
55

membranas diferentes para una aplicación deseada. El uso de membranas diferentes permite la variación en permeabilidad, transferencia de materia, estabilidad mecánica, capacidad de tamponamiento, biocompatibilidad y otras características. Se debe mantener un equilibrio entre las propiedades físicas de las membranas de la cápsula de tal modo que soporten la supervivencia de las células atrapadas.

- 5 Se pueden preparar microcápsulas para las bacterias de la invención usando técnicas como las de la Publicación de EE.UU. nº 2007-0116671 a nombre de Prakash y Jones, que se incorporan a la presente memoria a modo de referencia.

Las propiedades de transporte de materia de una membrana son críticas ya que el caudal de entrada de moléculas, esencial para la supervivencia celular, y el caudal de salida de residuos metabólicos determina en definitiva la viabilidad de las células atrapadas. Potencialmente se puede aplicar cualquier barrera para aplicaciones enzimáticas. Ordinariamente, la permeabilidad de cápsula deseada se determina por el umbral de peso molecular (MWCO, del inglés "molecular weight cut-off"), y depende de la aplicación. El MWCO es el peso molecular máximo de una molécula que se permite pasar a través de los poros de la membrana de la cápsula (Uludag et al. (2000) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 42: 29-64). Para trasplantes, el MWCO debe ser suficientemente alto para permitir el paso de nutrientes, pero suficientemente bajo para rechazar anticuerpos y otras moléculas del sistema inmune. El rango de MWCO opcionalmente es de 3000 D a 950.000 D (Chang y Prakash, 1998). El MWCO de microcápsulas administradas oralmente debe permitir el paso de metabolitos no deseados desde el plasma hacia el interior de la microcápsula, y a continuación debe facilitar la posterior eliminación de la molécula alterada o proporcionar su almacenamiento (Uludag et al., 2000). Para las células de la presente descripción que deben administrarse oralmente, opcionalmente se usa un contenedor que permita el paso de nutrientes, pero que bloquee los anticuerpos y otras moléculas inmunes, por ejemplo una membrana semi-permeable que tenga un MWCO de 3000 D a 950.000 D (Chang y Prakash, 1998). Alternativamente, el extremo inferior del rango puede ser de aproximadamente: 2000 D, 4000 D, 5000 D ó 10.000 D, y el extremo superior del rango puede ser de aproximadamente: 900.000 D, 750.000 D ó 500.000 D.

El tipo más común de membrana usada para terapia celular es la membrana de polímero basada en alginato; sin embargo, se puede usar otras varias sustancias tales como proteínas, polihemoglobina y lípidos (Uludag et al., 2000; Prakash y Jones, 2002). Otra estrategia adicional para la composición de membrana es usar un polímero sintético biodegradable tal como polilactida, ácido poliglicólico y polianhídrido. Las membranas usadas comúnmente incluyen membranas de fibra hueca, membrana de alginato-polilisina-alginato (APA), nitrato de celulosa, poliamida, polímero acompañado con lípidos y vesículas de lípidos. Los polímeros establecidos y prometedores para la encapsulación de células vivas y la encapsulación de enzimas incluyen alginato-polilisina-alginato (APA), alginato-polimetileno-co-guanidina-alginato (A-PMCG-A), hidroximetilacrilato-metil metacrilato (HEMA-MMA), HEMA-MMA-MAA multilaminado, poliácronitrilo cloruro de vinilo (PAN-PVC), acrilonitrilo/metaliisulfonato sódico (AN-69), polietileno glicol/poli pentametilciclopentasiloxano/polidimetilsiloxano (PEG/PD₅/PDMS), poli *N,N*-dimetil acrilamida (PDMAAm), encapsulados silíceos y sulfato de celulosa/alginato sódico/polimetileno-co-guanidina (CS/A/PMCG). Otros materiales que son útiles incluyen, sin limitación, acetato ftalato de celulosa, alginato de calcio y partículas de gel de k-carragenato-goma garrofin, partículas de gelano-xantano, poli(lactida-co-glicólidos), carragenano, polianhídridos de almidón, polimetacrilatos de almidón, poliaminoácidos, polímeros de recubrimiento entérico.

El diseño de una membrana, destinada a uso en terapias de células vivas orales, debe considerar varios factores primarios de tal modo que se minimice la muerte microbiana y se maximice la eficacia terapéutica. Para asegurar su eficacia, se pueden diseñar células encapsuladas artificialmente destinadas a administración oral para proteger su carga viva contra el entorno ácido del estómago y la inmunoglobulina liberada por respuesta inmune intestinal.

Una composición útil es la encapsulación de partículas de alginato cálcico con poli-L-lisina (PLL) que forman microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato (APA). En la microcápsula de membrana APA, el alginato forma el núcleo y la matriz para la célula y la PLL se une al núcleo de alginato. La unión de PLL al alginato es el resultado de los numerosos grupos alquilamino de cadena larga presentes en la PLL que se extienden desde la cadena principal de poliamida en una serie de direcciones y que interaccionan con varias moléculas de alginato, a través de interacciones electrostáticas. La reticulación resultante produce una membrana compleja estable que reduce la porosidad de la membrana de alginato y forma una barrera inmunoprotectora.

Alternativamente, para encapsulación se usan membranas de alginato/poli-L-lisina/pectina/poli-L-lisina/alginato (APPPA), alginato/poli-L-lisina/pectina/poli-L-lisina/pectina (APPPP) y alginato/poli-L-lisina/chitosán/poli-L-lisina/alginato (APCPA). Estas composiciones de membrana multicapa se comportan bien en los ensayos de estabilidad GI, proporcionando un incremento de la resistencia a disolución completa en agua, ácidos diluidos y bases, así como en presencia de agentes quelantes de iones, a la vez que permiten un control más preciso de la permeabilidad de la membrana.

Existen varios métodos disponibles para preparar células artificiales que contienen células vivas para terapia. Por ejemplo, para la preparación de la membrana clásica de alginato-polilisina-alginato (APA), las células vivas, tal como células bacterianas, son suspendidas en una matriz del polímero natural de alginato (1,5%). La suspensión viscosa de polímero-bacterias se hace pasar a través de una aguja de medida 23 usando una bomba de jeringa. A continuación se usa aire comprimido, pasado a través de una aguja coaxial de medida 16, para romper las gotitas

que se forman en la punta de la aguja de medida 23. Se deja que las gotitas gelifiquen durante 15 minutos en una disolución enfriada en hielo con agitación suave de agentes químicos solidificantes, tal como CaCl_2 (1,4 %). Después de la gelificación en CaCl_2 , las partículas son lavadas con HEPES (0,05 % en HEPES, pH 7,20), recubierto con polilisina (0,1% durante 10 minutos) y se volvió a lavar en HEPES (0,05 % en HEPES, pH 7,20). Las cápsulas resultantes son recubiertas a continuación con los productos químicos apropiados para disolver su contenido de núcleo interior. Para esta etapa, a menudo se usa un baño de citrato al 3,00 % (3,00 % en HEPES:tampón salino 1:1, pH 7,20). Las microcápsulas formadas pueden almacenarse entonces a 4°C en una disolución mínima (10% de nutriente celular hasta 90% de agua).

Por consiguiente, en una realización, las bacterias con elevada actividad de *bsh* son encapsuladas en microcápsulas semipermeables poliméricas (1-999 μm) o en nanocápsulas semipermeables poliméricas (1-999 nm). En una realización, las microcápsulas o nanocápsulas poliméricas semipermeables comprenden membranas de alginato/poli-L-lisina/alginato (APA), alginato/chitosán/alginato (ACA) o alginato/genipina/alginato (AGA). En otra realización, la microcápsula o nanocápsula comprende membranas de alginato/poli-L-lisina/pectina/poli-L-lisina/alginato (APPPA), alginato/poli-L-lisina/pectina/poli-L-lisina/pectina (APPPP), alginato/poli-L-lisina/chitosán/poli-L-lisina/alginato (APCPA), alginato-polimetileno-co-guanidina-alginato (A-PMCG-A), hidrometilacrilato-metil metacrilato (HEMA-MMA), HEMA-MMA-MAA multicapa, poliácridonitrilo cloruro de vinilo (PAN-PVC), acrilonitrilo/metililsulfonato sódico (AN-69), polietileno glicol/poli pentametilciclopentasiloxano/polidimetilsiloxano (PEG/PD5/PDMS) o poli N,N-dimetil acrilamida (PDMAAm). En otra realización adicional, la microcápsula o nanocápsula comprende fibra hueca, nitrato de celulosa, poliamida, polímero acompañado con lípidos, una vesícula de lípidos, un encapsulado síliceo, sulfato de celulosa/alginato sódico/polimetileno-co-guanidino (CS/A/PMCG), acetato ftalato de celulosa, alginato de calcio, partículas de gel de k-carragenano-goma garrofín, partículas de gelano-xantano, poli(lactida-co-glicólidos), carragenano, polianhídridos de almidón, polimetacrilatos de almidón, poliaminoácidos o polímeros de recubrimiento entérico.

En una realización adicional, las microcápsulas o nanocápsulas poliméricas son resistentes a las condiciones gastro-intestinales, tales como pH 1-8 y/o bilis [1-30 mmol]).

Las composiciones orales descritas en la presente memoria opcionalmente están liofilizadas, secadas mediante calor, secadas mediante pulverización o secadas por congelación. Alternativamente, las composiciones orales se preparan de forma opcional húmedas.

En una realización, las composiciones orales descritas en la presente memoria están liofilizadas con lioprotectores para asegurar la viabilidad y una mejor actividad de *bsh* con el tiempo. Los lioprotectores típicos incluyen, sin limitación, una concentración final de 0,2% a 10% de maltodextrina y de 0,05% a 0,33% de extracto de levadura ó 0,05-2,5% de inulina y de 0,05 a 0,1% de extracto de levadura. En una realización, los lioprotectores comprenden una concentración final de 2-4% de maltodextrina y 0,1% de extracto de levadura, 0,3% de inulina y 0,1% de extracto de levadura, ó 0,3% de inulina.

En otra realización, las composiciones orales descritas en la presente memoria se almacenan en líquido para asegurar la viabilidad y una actividad mejorada de *bsh*. Las condiciones de almacenamiento líquido típicas incluyen, aunque sin limitación, una concentración final de disolución conservante que comprende 2,5-10% de medio de crecimiento (tal como se describe en la presente memoria), 50-90,99% de yogur u otro lácteo fermentado, 50-99,99% de sobrenadante de cultivo o 5% de MRS.

En otra realización adicional, las composiciones orales descritas en la presente memoria son congeladas espontáneamente para asegurar la viabilidad y la mejor actividad de *bsh*. Las condiciones típicas de congelación espontánea incluyen, sin limitación, una concentración final de disolución crioprotectora que comprende 0,2-10% de maltodextrina, opcionalmente 1-3%, maltodextrina y de 0,05 a 0,33% de extracto de levadura, opcionalmente 0,1-0,2% de extracto de levadura, de 0,05 a 2,5% de inulina, opcionalmente al menos 0,2% de inulina, trehalosa 0,5M, fructosa 0,5M, lactosa 0,5M, maltosa 0,5M o 50-99,99%, opcionalmente 50% de medio agotado.

El término "vehículo" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un vehículo aceptable que facilite la administración al sujeto. Por ejemplo, un vehículo aceptable que facilita la administración oral incluye, sin limitación, un suplemento, un producto alimentario, una bebida, un alimento funcional o un nutracéutico, o un excipiente. "Nutracéutico" significa un producto aislado o purificado a partir de alimentos (o fuentes usadas para preparar alimentos, tales como plantas, animales u otros organismos) que se cree que tienen beneficios para la salud, tales como un efecto medicinal, fisiológico o profiláctico. "Producto alimenticio funcional" significa que es un alimento, que se consume como parte de una dieta y que tiene beneficios para la salud, tales como beneficios medicinales, fisiológicos o profilácticos, más allá de la función nutricional básica de suministro de nutrientes.

En otra realización, el vehículo comprende una cápsula, píldora, cápsula de gel, líquido o película disoluble.

Las composiciones orales descritas en la presente memoria para reducir el nivel de colesterol en suero, el de lípidos en suero, la grasa corporal o el índice aterogénico, o para la profilaxis y el tratamiento de aterosclerosis, y de enfermedades cardiovasculares o cerebrovasculares, comprenden además opcionalmente otros agentes o sustancias terapéuticas para dichas indicaciones. Por consiguiente, en una realización, la composición oral

comprende además un agente reductor de triglicéridos, opcionalmente, inhibidores de escualeno sintasa, inhibidores de proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, estatinas, secuestrantes de ácido biliar, inhibidores de la absorción de colesterol, fibratos y otros agonistas alfa de PPAR, agonistas de PPAR duales, inhibidores de lipasa, inhibidores de proteína tirosina fosfatasa 1B, péptido pancreático YY₃₋₃₆, antagonistas de receptor recombinantes y otros receptores cannabinoides o agonistas de 5-HT_{2c}, tales como lorcaserina. En otra realización, la composición comprende además un agente para aumentar el nivel de HDL o para limitar la reducción del nivel de HDL, opcionalmente, estatinas, secuestrantes de ácido biliar, inhibidores de absorción de colesterol, fibratos y otros agonistas de PPAR alfa, agonistas de PPAR duales, inhibidores de lipasa, inhibidores de proteína tirosina fosfatasa 1B, péptido pancreático YY₃₋₃₆, antagonistas de receptor recombinantes y otros receptores cannabinoides o agonistas de 5-HT_{2c}, tales como lorcaserina. En otra realización adicional, la composición oral comprende además un agente reductor del nivel de colesterol, opcionalmente un secuestrante de ácido biliar (BAS), una estatina, ezetimibe, ácido alfa-linoleítico, ácido omega-3,6,9-eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), fibratos, fibra soluble, polifenol, metabolito de gama-orizanol hesperetina, fitoquímico, otro probiótico, psyllium, fitosterol, fitostanol, vitamina, antioxidante o antibiótico. La estatina se puede seleccionar del grupo que consiste en Lovastatina, Pravastatina, Zocor, Fluvastatina, Mevastatina, Pitavastatina, Cerivastatina, Simvastatina, Rosuvastatina y Atorvastatina. El BAS puede ser colestiramina, colestipol o colesevelam. El fibrato puede ser clofibrato, bezafibrato, gemfibrozil o fenofibrato. En una realización adicional, la composición oral comprende además un agente para preservar la actividad de *bsh*, opcionalmente, inulina, trehalosa, maltodextrano, extracto de levadura, polietilén glicol, glicerol, lípido, grasa emulsificada, un producto lácteo, glucosa, fructosa, sacarosa, un polisacárido, anhidrobiosis, un policosanol, polietilén glicol (PEG), un esteroles vegetal, un estanol vegetal o un ácido graso omega. El policosanol puede ser octacosanol, triacontanol, alcohol de behenilo, alcohol de lignocerilo, alcohol de cerilo, 1-heptacosanol, 1-nonacosanol, 1-dotriacontanol o alcohol de geddilo. En otra realización adicional, la composición oral comprende además un agente para modular adipocinas u hormonas de la obesidad, opcionalmente, leptina, ghrelina, resistina, adiponectina, quemerina, IL-6, visfatina, proteína de unión a retinol 4 o inhibidor-1 de activador de plasminógeno. En otra realización adicional, la composición oral comprende además un agente hipoglucémico, opcionalmente, metformina, rosiglitazona, pioglitazona, gliburide, glicazide, glimepiride, nateglinide, repaglinide, mitiglinide, alogliptina, saxagliptina, vildagliptina y dapaglifozina. Incluso en otra realización adicional, la composición oral comprende además un agente terapéutico para reducir las citocinas pro-inflamatorias IL-1 α/β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN-gamma, TNF-alfa, o para aumentar el nivel de las citocinas anti-inflamatorias IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11.

En otra realización adicional, la composición oral comprende además vitamina B12. En una realización adicional, la composición oral comprende además ácido linoleico conjugado (CLA). En otra realización adicional, la composición oral comprende además reuterina y/o reuteriicina.

Métodos y usos

La descripción incluye métodos y usos de las composiciones orales descritas en la presente memoria. En una realización, se proporciona un método de terapia que comprende la administración de una composición oral descrita en la presente memoria a un animal que lo necesite. También se proporciona un uso de una composición oral descrita en la presente memoria para la terapia de un animal. Además se proporciona un uso de una composición oral descrita en la presente memoria en la preparación de un medicamento para terapia. También se proporciona la composición oral descrita en la presente memoria para uso en terapia.

Las composiciones descritas en la presente memoria son útiles para reducir el nivel de colesterol en suero de un animal que lo necesite. Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona un método para reducir el nivel de colesterol en suero en un animal que lo necesite, que comprende la administración de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral descrita en la presente memoria. También se proporciona un uso de una composición oral descrita en la presente memoria para reducir el nivel de colesterol en suero en un animal que lo necesite. También se proporciona un uso de una composición oral descrita en la presente memoria en la preparación de un medicamento para reducir el nivel de colesterol en suero en un animal que lo necesite. Se proporciona además una composición oral descrita en la presente memoria para uso en la reducción del nivel de colesterol en suero en un animal que lo necesite.

En una realización, el animal que lo necesite tiene una enfermedad o trastorno que se caracteriza por un aumento de la acumulación de colesterol en suero y/o tejidos que produce una patología o tiene un nivel de colesterol excesivo como factor de riesgo. Los trastornos de colesterol incluyen hipercolesterolemia familiar o el trastorno de colesterol heredado (ICD, del inglés "inherited cholesterol disorder"), defectos en los productos genéticos del metabolismo de colesterol, p.ej., 7-alfa-hidroxilasa y varias formas de xantomias. Los niveles incrementados de colesterol en suero pueden indicar aterosclerosis, cirrosis biliar, hiperlipidemias familiares, dieta elevada en colesterol, hipotiroidismo, infarto de miocardio, síndrome nefrítico y diabetes no controlada. "Colesterol excesivo" significa fuera del rango de colesterol típico (normal). El nivel típico de colesterol es menos de 200 mg/dL. El límite alto es de 200-239 mg/dL y cualquier valor por encima de 240 mg/dL es elevado. El informe del "National Cholesterol Education Program NCEP III" sobre el colesterol incluye un "Full Report" ("Informe completo") y una sección de "Drug Therapy" ("Terapia de fármacos"). Éstos proporcionan una revisión de ejemplos de tratamiento del colesterol mediante estatinas, secuestrantes de ácido biliar, dieta, etc. y se refieren a niveles de colesterol y factores de riesgo

(p.ej., véanse las Tablas IV. 1-1; VI. 1-1; VI. 1-2; VI. 1-3). Las composiciones descritas en la presente memoria son similares a los secuestrantes de ácido biliar en que reducen los niveles de bilis. El informe de NCEP proporciona una guía sobre el uso de terapias farmacéuticas en relación a la presencia de otros factores de riesgo. Existen dos tipos de colesterol, colesterol HDL (a veces denominado colesterol bueno) y colesterol LDL (a veces denominado colesterol malo). El "colesterol excesivo" también se puede determinar respecto al LDL. Por ejemplo, la terapia de fármacos se considera opcionalmente para individuos con múltiples factores de riesgo (2 ó más) cuando el nivel de colesterol LDL es: >100 mg/dL (p.ej., con una meta para reducir el nivel de colesterol LDL hasta <100 mg/dL), al menos 130 mg/dL (p.ej., con una meta para reducir el nivel de colesterol LDL a menos de 130 mg/dL), al menos 160 mg/dL (p.ej., con una meta para reducir el nivel de colesterol LDL a menos de 130 mg/dL). Adicionalmente, la terapia de fármacos también se considera opcionalmente para individuos con 0-1 factores de riesgo cuando el nivel de colesterol LDL es de al menos 190 mg/dL (p.ej., con una meta para reducir el nivel de colesterol LDL hasta menos de 160 mg/dL). Los valores normales tienden a aumentar con la edad, y las mujeres pre-menopáusicas presentan niveles algo menores que los hombres de la misma edad.

En otra realización, los métodos y usos para reducir el nivel de colesterol en suero aumentan o limitan la reducción del nivel de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) en suero del animal. En una realización adicional, los métodos y usos para reducir el nivel de colesterol en suero también disminuyen el nivel de triglicéridos en suero de un animal. En otra realización adicional, los métodos y usos para reducir el nivel de colesterol en suero también reducen los factores de riesgo ateroesclerótico del animal. Los factores de riesgo ateroesclerótico incluyen, sin limitación, homocistina en suero, fibrinógeno, proteína C-reactiva, lipoproteína (a), ácido úrico, matriz metalopeptidasa 9 (MMP-9), inhibidor-1 de activador de plasminógeno (PAI-1) o su antígeno, activador de plasminógeno de tejido (tPA), TNF alfa, IL-6, P-selectina, proteína-1 quimotáctica de monocito (MCP-1), ligando de CD40 soluble (sCD40L), molécula 1 de adhesión inter-celular (ICAM-1), mieloperoxidasa (MPO), adiponectina, leptina, fosfolipasa A asociada a lipoproteína e insulina.

En otra realización adicional, los métodos y usos para reducir el nivel de colesterol en suero también producen y administran vitamina B12 al animal. En una realización adicional, los métodos y uso para reducir el nivel de colesterol en suero también producen y administran ácido linoleico conjugado (CLA) al animal. En otra realización adicional, los métodos y usos para reducir el nivel de colesterol en suero también producen y administran reuterina y reuteriicina al animal.

Las composiciones orales descritas en la presente memoria también son útiles para reducir el nivel de triglicéridos en suero en un animal que lo necesite. Por consiguiente, en un aspecto, la presente descripción proporciona un método para reducir el nivel de triglicéridos en suero en un animal que lo necesite que comprende la administración de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición descrita en la presente memoria. También se proporciona un uso de una composición oral descrita en la presente invención para reducir el nivel de triglicéridos en suero en un animal que lo necesite. También se proporciona un uso de una composición oral descrita en la presente memoria para la preparación de un medicamento para reducir el nivel de triglicéridos en suero en un animal que lo necesite. También se proporciona una composición oral descrita en la presente memoria para uso en la reducción del nivel de triglicéridos en suero en un animal que lo necesite.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para reducir el índice aterogénico de un animal, que comprende la administración al animal de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido de una composición de la descripción para reducir el índice aterogénico de un animal. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción en la preparación de un medicamento para reducir el índice aterogénico de un animal. Además se proporciona una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para uso en la reducción del índice aterogénico de un animal. El índice aterogénico se calcula usando al menos una de las ecuaciones mostradas en la Tabla 1.

En otro aspecto adicional, la descripción proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento de la aterosclerosis o de un trastorno degenerativo provocado por aterosclerosis en un animal que comprende la administración al animal de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para la profilaxis o el tratamiento de la aterosclerosis o de un trastorno degenerativo producido por la aterosclerosis. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de la aterosclerosis o un trastorno degenerativo producido por la aterosclerosis. Además se proporciona una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para uso en la profilaxis o el tratamiento de la aterosclerosis o de un trastorno degenerativo producido por la aterosclerosis. Los trastornos degenerativos incluyen, aunque sin limitación, enfermedad cerebrovascular, apoplejía, enfermedad vascular, enfermedad arterial coronaria, infarto de miocardio, trombosis, angina, angina inestable, claudicación intermitente, ataque isquémico transitorio o fallo renal.

El término "profilaxis o tratamiento" se refiere a la reducción de la probabilidad de una afección o al alivio de una afección.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona un método para reducir la grasa corporal total o para tratar la obesidad o la pre-obesidad en un animal, que comprende la administración al animal de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para reducir la grasa corporal total o para tratar la obesidad o la pre-obesidad en un animal. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción en la preparación de un medicamento para reducir la grasa corporal total o para tratar la obesidad o la pre-obesidad en un animal. Además se proporciona una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para uso en la reducción de la grasa corporal total o para tratar la obesidad o la pre-obesidad en un animal. El término "obesidad" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una enfermedad, afección o trastorno médico, y se define como un índice de masa corporal (IMC) >30. Un IMC de 25-30 es pre-obeso.

En otro aspecto adicional, la descripción proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno metabólico en un animal que comprende la administración al animal de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción. También se describe un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno metabólico en un animal. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno metabólico en un animal. Además se proporciona una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno metabólico en un animal. Las enfermedades y trastornos metabólicos incluyen, sin limitación, hiperlipidemia, hiperglucemia, hiperlipoproteinemia, tolerancia a la glucosa alterada (IGT, del inglés "impaired glucose tolerance"), resistencia a la insulina, pre-diabetes, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II y síndrome metabólico.

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático asociado a concentraciones elevadas de lípidos y triglicéridos en suero o en el hígado, a inflamación hepática, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), enfermedad de hígado graso alcohólico (AFLD) esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis hepática, esteatosis hepática, fibrosis hepática, niveles anormalmente elevados de ALT, AST, GGT o Alk-P en suero, virus de Epstein-Barr, hepatitis, hepatitis autoinmune, enfermedad granulomatosa hepática, colangitis, cáncer hepatocelular, colangiocarcinoma, enfermedad hepática metabólica en un animal, que comprende la administración al animal de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático asociado a concentraciones elevadas de lípidos y triglicéridos en suero o en el hígado, inflamación hepática, enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), enfermedad de hígado graso alcohólica (AFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis hepática, esteatosis hepática, fibrosis hepática, niveles anormalmente elevados de ALT, AST, GGT o Alk-P en suero, virus de Epstein-Barr, hepatitis, hepatitis autoinmune, enfermedad granulomatosa hepática, colangitis, cáncer hepatocelular, colangiocarcinoma, enfermedad hepática metabólica en un animal. También se proporciona un uso de una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático asociado a concentraciones elevadas de lípidos y triglicéridos en suero o en el hígado, inflamación hepática, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), enfermedad de hígado graso alcohólico (AFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis hepática, esteatosis hepática, fibrosis hepática, niveles anormalmente elevados de ALT, AST, GGT o Alk-P en suero, virus de Epstein-Barr, hepatitis, hepatitis autoinmune, enfermedad granulomatosa hepática, colangitis, cáncer hepatocelular, colangiocarcinoma, enfermedad hepática metabólica en una animal. Además se proporciona una cantidad reductora de ácido biliar de una composición oral de la descripción para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático asociado a concentraciones elevadas de lípidos y triglicéridos en suero o en el hígado, inflamación hepática, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), enfermedad de hígado graso alcohólico (AFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis hepática, esteatosis hepática, fibrosis hepática, niveles anormalmente elevados de ALT, AST, GGT o Alk-P en suero, virus de Epstein-Barr, hepatitis, hepatitis autoinmune, enfermedad granulomatosa hepática, colangitis, cáncer hepatocelular, colangiocarcinoma, enfermedad hepática metabólica en un animal.

Se pueden coadministrar o usar otros agentes o sustancias terapéuticas en combinación con las composiciones orales descritas en la presente memoria. Por consiguiente, en una realización, los métodos y usos descritos en la presente memoria comprenden además la administración de un agente reductor del nivel de triglicéridos, opcionalmente, inhibidores de escualeno sintasa, inhibidores de proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, estatinas, secuestrantes de ácido biliar, inhibidores de la absorción de colesterol, fibratos y otros agonistas de PPAR alfa, agonistas de PPAR duales, inhibidores de lipasa, inhibidores de proteína tirosina fosfatasa 1B, péptido pancreático YY₃₋₃₆, antagonistas de receptor recombinantes y otros antagonistas cannabinoides o agonistas de 5-HT_{2c}, tal como lorcaserina. En otra realización, los métodos y usos descritos en la presente memoria comprenden además la administración de un agente para aumentar el nivel de HDL o para limitar la reducción del nivel de HDL, opcionalmente, estatinas, secuestrantes de ácido biliar, inhibidores de la absorción de colesterol, fibratos y otros agonistas de PPAR alfa, agonistas de PPAR duales, inhibidores de lipasa, inhibidores de proteína tirosina fosfatasa 1B, péptido pancreático YY₃₋₃₆, antagonistas de receptor recombinante y otros antagonistas

cannabinoides, o agonistas de 5-HT_{2c}, tal como lorcaserina. En otra realización adicional, los métodos y usos descritos en la presente memoria comprenden además la administración de un agente reductor del nivel de colesterol, opcionalmente un secuestrante de ácido biliar (BAS), una estatina, ezetimibe, ácido alfa-linolítico, ácido omega-3,6,9 eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), fibratos, fibra soluble, polifenol, metabolito de gama-orizanol hesperetina, fitoquímicos, otro probiótico, psyllium, fitosterol, fitostanol, vitamina, antioxidante o antibiótico. Las estatinas incluyen, sin limitación, lovastatina, pravastatina, zocor, fluvastatina, mevastatina, pitavastatina, cerivastatina, simvastatina, rosuvastatina y atorvastatina. El BAS incluye, sin limitación, colestiramina, colestipol y colesevelam. Los fibratos incluyen, sin limitación, clofibrato, bezafibrato, gemfibrozil y fenofibrato. En otra realización adicional, los métodos y usos descritos en la presente memoria comprenden además la administración de un agente para preservar la actividad de *bsh*, opcionalmente, inulina, trealosa, maltodextrano, extracto de levadura, polietilén glicol, glicerol, lípidos, grasa emulsificada, un producto lácteo, glucosa, fructosa, sacarosa, un polisacárido, anhidrobiosis, un policosanol, polietilén glicol (PEG), un esteroles vegetal, un estanol vegetal, o un ácido graso omega. El policosanol incluye, sin limitación, octacosanol, triacontanol, alcohol de behenilo, alcohol de lignocerilo, alcohol de cerilo, 1-heptacosanol, 1-nonacosanol, 1-dotriacontanol y alcohol de geddilo. En una realización adicional, los métodos y usos descritos en la presente memoria comprenden además la administración de un agente para modular adipocinas u hormonas de obesidad, opcionalmente, leptina, ghrelina, resistina, adiponectina, quemerina, IL-6, visfatina, proteína 4 de unión a retinol o inhibidor-1 de activador de plasminógeno. En otra realización adicional, los métodos y usos descritos en la presente memoria comprenden además la administración de un agente hipoglucémico, opcionalmente, metformina, rosiglitazona, pioglitazona, gliburide, gliclazide, glimepiride, glipizidebile, glibenclamide, acarbosa, miglitol, voglibosa, sitagliptina, nateglinide, repaglinide, mitiglinide, alogliptina, saxagliptina, vildagliptina y dapagliflozina. En otra realización, los métodos y usos descritos en la presente memoria comprenden además la administración de un agente terapéutico para reducir las citocinas pro-inflamatorias IL-1 α/β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN-gamma, TNF-alfa, o para aumentar el nivel de las citocinas anti-inflamatorias IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11.

El término “animal” tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier miembro del reino animal, opcionalmente, un mamífero, tal como un humano.

La administración de una “cantidad efectiva” o “cantidad reductora de ácido biliar” de los agentes descritos en la presente memoria se define como una cantidad efectiva a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para alcanzar el resultado deseado. La cantidad efectiva de la composición bacteriana con elevada actividad de *bsh* se ajusta opcionalmente de acuerdo a factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del animal. Los regímenes de dosificación se ajustan fácilmente para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar varias dosis divididas diariamente o la dosis se puede reducir proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En una realización, las composiciones pueden administrarse o usarse de 1 a 4 veces al día.

Las composiciones se pueden preparar mediante métodos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a pacientes, y de tal modo que se combina una cantidad efectiva de la célula en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos adecuados se describen, por ejemplo, en “Remington’s Pharmaceutical Sciences” (Remington’s Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., EE.UU. 2003 – 20^a Edición) y en “The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19)”, publicado en 1999).

Procesos para cultivar y preparar las bacterias

En la presente memoria también se describen procesos para preparar una bacteria con una elevada actividad de *bsh* que comprenden cultivar bacterias productoras de *bsh* en condiciones de fermentación que favorezcan el desarrollo de una elevada actividad de *bsh*. Las condiciones de fermentación adecuadas han sido descritas en la sección anterior de composiciones. Por ejemplo, las condiciones de fermentación comprenden opcionalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, un pH de 4 a 7 y un tiempo de recolección de 12 a 24 horas. En una realización, la fuente de carbono es un azúcar que opcionalmente comprende maltosa, sacarosa, dextrina, una combinación de sorbitol y glucosa o una combinación de inulina y glucosa. En una realización particular, la fuente de carbono es maltosa. En otra realización, la fuente de nitrógeno comprende (i) extracto de levadura y extracto de malta, extracto de levadura y extracto de vacuno, o hidrolisato de caseína y extracto de malta; y (ii) peptona o triptona. En otra realización, la fuente de nitrógeno comprende además cisteína. En una realización particular, la peptona es la peptona n° 3. Las concentraciones típicas de las fuentes de carbono y nitrógeno son como se describe en la sección anterior de composiciones.

En una realización adicional, el proceso comprende además liofilizar las composiciones bacterianas libres o microencapsuladas con lioprotectores como los descritos en la presente memoria. En una realización, los lioprotectores comprenden una concentración final de 0,2% a 10% de maltodextrina y de 0,05% a 0,33% de extracto de levadura o de 0,05-2,5% de inulina y de 0,05 a 0,1% de extracto de levadura. En una realización, los lioprotectores comprenden una concentración final de 2-4% de maltodextrina y de 0,1% de extracto de levadura, de 0,3% de inulina y 0,1% de extracto de levadura, o de 0,3% de inulina.

En una realización alternativa, el proceso comprende además almacenar la composición de bacterias de elevada actividad de *bsh* libres o microencapsuladas en condiciones de almacenamiento líquido. En una realización, las condiciones de almacenamiento comprenden una disolución conservante final que comprende un 2,5-10% de medio de crecimiento, un 50-99,99% de yogur u otro lácteo fermentado, un 50-99,99% de sobrenadante de cultivo o un 5% de MRS.

En otra realización adicional, el proceso comprende además la congelación espontánea de la composición libre o microencapsulada en una disolución crioprotectora tal como se describe en la presente memoria. En una realización, la disolución crioprotectora comprende una concentración final de 0,2-10% de maltodextrina, opcionalmente 1-3%, maltodextrina y de 0,05 a 0,33% de extracto de levadura, opcionalmente 0,1-0,2% de extracto de levadura, de 0,05 a 2,5% de inulina, opcionalmente al menos 0,2% de inulina, Trehalosa 0,5M, fructosa 0,5M, lactosa 0,5M, maltosa 0,5M o 50-99,99%, opcionalmente 50%, de medio agotado. La congelación espontánea tal como se usa en la presente memoria se refiere a someter a la composición a temperaturas por debajo de -80 grados Celsius, por ejemplo, sometiendo a la composición libre o microencapsulada a nitrógeno líquido tal como a una temperatura de -196 grados Celsius, o congelando la composición a temperaturas ultra bajas, tal como -130 grados Celsius, o usando hielo seco.

La descripción anterior describe generalmente la presente descripción. Se puede obtener una comprensión más completa en referencia a los siguientes ejemplos específicos. Dichos ejemplos se describen únicamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la descripción. Se contemplan cambios en forma y sustitución por equivalentes, si las circunstancias lo sugieren o lo hacen necesario.

Los siguientes ejemplos no limitativos son ilustrativos de la presente descripción:

EJEMPLOS

Desconjugación de TDCA y GDCA mediante cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (Figuras 1 y 2)

Resultados

Las Figuras 1 y 2 demuestran la desconjugación de ácido taurodesoxicólico y ácido glicodesoxicólico, medido mediante HPLC, en un ensayo *in vitro* usando 0,4 gramos de *Lactobacillus reuteri* (ATCC 53608, ATCC 53609, ATCC 55148, ATCC 55739 y NCIMB 701359) con el tiempo. Las cepas de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 70159 y ATCC 55739 tienen la mayor actividad de *bsh*, determinado mediante HPLC. Se deberían considerar las limitaciones de la "resolución" del ensayo (usando 0,4 gramos y tomando muestra durante más de 2,5 horas); sin embargo, aun así estas cepas demostraron una actividad de *bsh* considerablemente mayor que otras evaluadas en este experimento y, puesto que el nivel de GDCA no es medible a las 2,5 horas, existe una diferencia incluso mayor en la actividad de *bsh*, ya que el sustrato se vuelve limitante.

Materiales y métodos

Bacterias y condiciones de cultivo

Se cultivaron cuatro cepas de *Lactobacillus reuteri* obtenidas de ATCC (53609, 53608, 55148 y 55739) y NCIMB 701359 en caldo de cultivo esterilizado de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) a 37°C durante 20 horas. Los cultivos fueron aislados mediante centrifugación y las células bacterianas recolectadas se usaron en el siguiente ensayo BSH.

Medida de actividad BSH

Para medir la actividad BSH, se añadieron las bacterias recolectadas a 100% de MRS suplementado con una combinación de glicodesoxicolato sódico y taurodesoxicolato sódico, ambos a 5 mM (0,4 g de células bacterianas/20 mL de MRS suplementado con GDCA y TDCA). A continuación las bacterias se incubaron en el caldo de reacción anaeróbicamente a 37°C con agitación mínima (100 rpm), y se tomaron muestras del sobrenadante a intervalos de 2,5 horas y se procesaron para determinar las concentraciones de sales biliares conjugadas. Resumidamente, se acidificaron muestras de 500 µL con 5 µL de HCl 6N tras retirar las células bacterianas por centrifugación a 10000g durante 3 minutos. Los sobrenadantes fueron suplementados entonces con 500 µL de metanol que contienen GCA (ácido glicocólico) 4 mM como patrón interno. Las muestras fueron sometidas a vórtice durante 10 minutos y se centrifugaron a 1000g durante 15 minutos. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm antes de ser analizadas mediante HPLC. Los análisis de HPLC de sales biliares siguieron el procedimiento descrito por Jones et al. 2003.

Análisis de sales biliares por HPLC

El análisis de HPLC de sales biliares siguió el procedimiento descrito por Jones et al. 2003. El análisis se llevó a cabo en una columna C-18 de fase inversa: LiChrosorb RP-18, 5 µm, 250 x 4,6 mm. El sistema de HPLC consistió en dos módulos de suministro de disolvente ProStar 210, un detector UV-VIS ProStar 320, un autoinyector ProStar 410 y un sistema de datos cromatográficos Galaxie (versión 1.9.3.2). Se aplicó una mezcla de metanol y tampón de

acetato sódico 50 mM ajustada a pH 4,3 con ácido o-fosfórico (70:30, v/v) como fase móvil con un caudal de 1,0 mL/min. El detector se fijó a 210 nm y todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Desconjugación de TDCA y GDCA por *Lactobacillus reuteri* libre y *Lactobacillus fermentum* (Figuras 3 y 4)

Resultados

- 5 Las Figuras 3 y 4 muestran la desconjugación de ácido taurodesoxicólico y ácido glicodesoxicólico, medida mediante HPLC, en un ensayo *in vitro* de *Lactobacillus reuteri* (Lab Met, NCIMB 701359) o *Lactobacillus fermentum* (ATCC 11976) e incluso una fracción (1/8) de la cantidad de células de *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) superan a las *Lactobacillus reuteri* (LabMet) *in vitro*.

Materiales y métodos

10 *Bacterias y condiciones de cultivo*

Las cepas bacterianas usadas en este estudio son *L. reuteri* (LabMet, NCIMB 701359) y *L. fermentum* (ATCC 11976). Las bacterias se cultivaron en caldo de cultivo esterilizado de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) a 37°C durante 20 horas. Los cultivos fueron aislados mediante centrifugación y las células bacterianas recolectadas fueron usadas en el siguiente ensayo BSH.

15 *Medida de actividad BSH*

- Para medir la actividad BSH, se añadieron las bacterias recolectadas a 100% de MRS suplementado con una combinación de glicocolato sódico y taurocolato sódico 5 mM (0,4 g ó 0,05 g de bacterias /20 mL de MRS suplementado con GDCA y TDCA). A continuación las bacterias se incubaron anaeróticamente a 37°C, y se tomaron muestras del sobrenadante a intervalos de 3 horas y se procesaron para determinar las concentraciones de sales biliares conjugadas en los tubos de reacción. Resumidamente, se acidificaron muestras de 500 µL con 5 µL de HCl 6N tras retirar las células bacterianas por centrifugación a 10000g durante 3 minutos. Los sobrenadantes fueron suplementados entonces con 500 µL de metanol que contiene GCA (ácido glicocólico) 4 mM como patrón interno. Las muestras fueron sometidas a vórtice durante 10 minutos y se centrifugaron a 1000g durante 15 minutos. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm antes de ser analizadas mediante HPLC. Los análisis de HPLC de sales biliares siguieron el procedimiento descrito por Jones et al.

Análisis de sales biliares por HPLC

- El análisis de HPLC de sales biliares siguió el procedimiento descrito por Jones et al. 2003. El análisis se llevó a cabo en una columna C-18 de fase inversa: LiChrosorb RP-18, 5 µm, 250 x 4,6 mm. El sistema de HPLC consistió en dos módulos de suministro de disolvente ProStar 210, un detector UV-VIS ProStar 320, un autoinyector ProStar 410 y un sistema de datos cromatográficos Galaxie (versión 1.9.3.2). Se aplicó una mezcla de metanol y tampón de acetato sódico 50 mM ajustada a pH 4,3 con ácido o-fosfórico (70:30, v/v) como fase móvil con un caudal de 1,0 mL/min. El detector se fijó a 210 nm y todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Desconjugación de TDCA y GDCA por las cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (Figuras 5 y 6)

Resultados

- 35 Las Figuras 5 y 6 muestran la desconjugación de ácido taurodesoxicólico y ácido glicodesoxicólico, medida mediante HPLC en un ensayo *in vitro*, usando 0,2 gramos de *Lactobacillus reuteri* libre (NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702656, NCIMB 11951, ATCC 23272 y LMG 9213) con el tiempo. Las cepas NCIMB 701359, NCIMB 701089 y ATCC 23272 tienen el mayor grado de actividad de *bsh*, determinada mediante HPLC, nuevamente limitado por la resolución del estudio.

40 Materiales y métodos

Bacterias y condiciones de cultivo

- Las cepas bacterianas usadas en este estudio son *L. reuteri* NCIMB 701359, *L. reuteri* NCIMB 701089, *L. reuteri* NCIMB 702656, *L. reuteri* NCIMB 11951, *L. reuteri* ATCC 23272 y *L. reuteri* LMG 9213. Las bacterias fueron inoculadas a partir de una única colonia y se sometieron a pasaje dos veces con inóculos al 1%. Las bacterias fueron cultivadas en caldo de cultivo esterilizados de Man, Rogosa, Sharpe (MRS, Difco) a 37°C durante 20 horas cada vez. Los cultivos se aislaron por centrifugación y las células bacterianas recolectadas se usaron en el ensayo en el siguiente ensayo BSH.

Medida de actividad BSH

- 50 Para medir la actividad BSH, se añadieron 0,2 g de bacterias recolectadas a 100% de MRS suplementado con una combinación de glicocolato sódico y taurocolato sódico 5 mM (0,2 g de bacterias /20 mL de MRS suplementado con GDCA 5 mM y TDCA 5 mM). A continuación las bacterias se incubaron anaeróticamente a 37°C, y se tomaron

muestras del sobrenadante a las 1, 3, 5 y 7 horas para determinar las concentraciones de sales biliares conjugadas en los tubos de reacción. Resumidamente, se acidificaron muestras de 500 µL con 5 µL de HCl 6N tras retirar las células bacterianas por centrifugación a 10000g durante 3 minutos. Los sobrenadantes fueron suplementados entonces con 500 µL de metanol que contiene GCA (ácido glicocólico) 4 mM como patrón interno. Las muestras fueron sometidas a vórtice durante 10 minutos y se centrifugaron a 1000g durante 15 minutos. Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm antes de ser analizadas mediante HPLC. Los análisis de HPLC de sales biliares siguieron el procedimiento descrito por Jones et al.

L. reuteri con elevada actividad de *bsh* y reducción del nivel de colesterol

Materiales y métodos

La actividad de *bsh* de las cepas de *Lactobacilli* se calculó mediante el ensayo estándar de HPLC para TDCA y GDCA descrito en las secciones de materiales y métodos anteriores. Las tasas de eliminación de xDCA se calcularon tomando la concentración de GDCA o TDCA eliminada de contenidos intestinales simulados en el punto final y restando el valor de línea base. La cantidad de DCA producido, o de xDCA eliminado, se dividió entre la masa de microcápsulas usadas y se multiplicó por el volumen de contenido intestinal simulado y se dividió por el tiempo transcurrido, en horas, desde la línea base hasta el punto final. Esto se realizó mediante la ecuación: xDCA reducido = µmol de DCA producido ó xDCA reducido/g microcápsula/h.

Resultados

La Tabla 2 muestra la actividad de *bsh* de las cepas de *Lactobacillus reuteri* evaluadas preclínicamente o clínicamente y expresada como una velocidad (µmol DCA/g/h) medida para 5 horas y para 30 minutos. Aunque se demostró que la *Lactobacillus reuteri* (LabMet) reduce el nivel de colesterol preclínicamente, se requerían dosis elevadas de *L. reuteri* y una elevada frecuencia de dosificación. Se confirmó que la *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) con mayor actividad de *bsh*, que redujo el nivel de colesterol en estudios preclínicos, reduce significativamente el nivel de colesterol en ensayos clínicos humanos. Se cree que la mayor tasa de actividad de *bsh* es la responsable de la actividad y existen evidencias considerables que apoyan la reivindicación de que se requiere un nivel umbral de actividad de *bsh* para células libres administradas en dosis diarias elevadas. Parece ser que los organismos que degradan >50 µmol de GDCA/gramo/hora y >2 µmol de TDCA/gramo/hora medido a 1 hora y a 5 horas, respectivamente, y que son administrados en la cantidad de 10^6 - 10^{12} organismos son suficientes para reducir el nivel de colesterol. Por esta razón, se predice que la *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089), con una actividad de *bsh* incluso más elevada, reduce el nivel de colesterol y proporciona buenos resultados en estudios preclínicos y clínicos. Adicionalmente, la actividad de *bsh* se midió con el mismo ensayo de HPLC para TDCA y GDCA; sin embargo, la velocidad media se calculó para un periodo de 30 minutos. Esto proporciona una determinación precisa de la velocidad enzimática real, ya que la curva de desconjugación de xDCA es más lineal entre 0 y 30 minutos, y la reacción no está limitada por la baja disponibilidad de sustrato observada a tiempos más altos.

Los materiales y métodos son los mismos que en la sección de ensayo de HPLC descrita anteriormente.

35 Eficacia y seguridad de *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) microencapsulada de elevada actividad de *bsh* en hámster sirio dorado F1B (Tabla 3)

Resultados

La Tabla 3 muestra el cambio porcentual final de lípidos respecto a los valores de control para hámsters F1B inducidos para ser hipercolesterolémicos y a los que se administró después por sonda nasogástrica *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) microencapsuladas o libres. Aunque se producen reducciones similares del nivel de colesterol total entre grupos, hay una reducción incrementada del nivel de LDL-C, una menor reducción del de HDL-C, y una mejor eliminación de triglicéridos con el organismo libre en este modelo. Esto da como resultado una diferencia drástica en el índice aterogénico (IA) global y demuestra que aunque hay ventajas en la microencapsulación en términos de una mejor administración y supervivencia, también tiene ventajas la administración del organismo libre con elevada actividad de *bsh*, ya que se puede obtener un mejor perfil de lípidos.

Materiales y métodos

Se adquirió un total de 38 hámsters sirios dorados Bio F1B de 7-8 semanas de edad a Biobreeders, EE.UU. Tras la recepción, se dejó a los animales una semana de aclimatación. Los animales fueron alojados en jaulas individuales en una habitación con control de temperatura y humedad, y con un ciclo de luz-oscuridad invertido de doce horas, con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Tras la aclimatación, los animales fueron pesados y se les extrajeron muestras de sangre para determinar el nivel de lípidos de línea base como se describe a continuación.

Se indujo hipercolesterolemia mediante cinco semanas de alimentación con la dieta de ensayo, que contenía un 0,05% de colesterol. Semanalmente se monitorizó el consumo de alimento y la ganancia de peso. Se tomaron muestras de sangre a las cuatro y cinco semanas de la inducción y se analizó el nivel de lípidos. Adicionalmente, se determinaron marcadores de seguridad antes de iniciar el tratamiento (cinco semanas de inducción). Se recogieron muestras fecales el último día del periodo de inducción y se determinó el contenido de ácido biliar.

5 Todos los animales que no presentaron hipercolesterolemia tras cinco semanas de alimentación con la dieta de inducción de hipercolesterolemia fueron excluidos (5 animales). Los animales estantes fueron asignados entonces a uno de los tres grupos de tratamiento mediante aleatorización en bloque basada en los niveles de LDL en suero, y se ajustaron para igualar el promedio de peso de cada grupo (n=11 para cada grupo). Tras la aleatorización, se administró a los animales el tratamiento mediante sonda nasogástrica durante seis semanas.

10 Durante el periodo de tratamiento se mantuvo la alimentación con la dieta de ensayo hipercolesterolémico. La ingesta de alimento y el peso fueron monitorizados semanalmente y se midieron los niveles de lípidos en sangre cada dos semanas. Tras seis semanas de tratamiento, se recogieron muestras fecales de punto final y los animales fueron sacrificados usando dióxido de carbono. Se extrajo sangre mediante punción cardiaca para análisis del nivel de lípidos de punto final, para los marcadores de seguridad y para hematología. Durante la necropsia, se tomaron los hígados de animales representativos de cada grupo para análisis histológico.

Eficacia y seguridad de yogur que contiene *Lactobacillus reuteri* (LabMet) microencapsulada de menor actividad de *bsh* para reducir el nivel de lípidos (Tabla 4)

Resultados

15 La Tabla 4 muestra el cambio porcentual en el nivel de lípidos en ayunas de sujetos medianamente hipercolesterolémicos en respuesta al consumo de *Lactobacillus reuteri* (LabMet) microencapsulada a lo largo de un periodo de tratamiento de 6 semanas. El resultado muestra algún cambio en el nivel de colesterol en suero respecto al control, con niveles reducidos de triglicéridos en suero.

Materiales y métodos

20 Este estudio examinó la eficacia de composiciones de yogur probiótico que contiene la *Lactobacillus reuteri* (LabMet) microencapsulada de menor actividad de *bsh* sobre los parámetros de salud relativos a enfermedad degenerativa en humanos.

25 Se anticipó que el consumo del producto probiótico induciría cambios favorables en los marcadores de riesgo para varias enfermedades debilitantes de edad creciente y que el consumo de probiótico alteraría favorablemente el nivel de lípidos frente a tratamientos convencionales en individuos hiperlipidémicos.

El diseño del estudio fue un ensayo multi fase/lavado, aleatorizado, doblemente ciego, controlado, en el que los sujetos recibieron yogures de control o yogures de ensayo a lo largo de un periodo de 6 semanas seguido de un periodo de lavado de 6 semanas antes de las siguientes fases.

30 Se aleatorizaron un total de 30 hombres y mujeres sanos, de 18-60 años de edad, con nivel de LDL-C en plasma de 130-260 mg/dL, niveles de TG inferiores a 400 mg/dL y un índice de masa corporal (IMC) de 22-32 kg/m².

Se proporcionaron dietas metabólicas de composición conocida con precisión a los sujetos, bajo una estricta supervisión en una instalación de investigación clínica. Las dietas fueron nutricionalmente adecuadas y proporcionaron el 100% de los requerimientos energéticos. Adicionalmente, los sujetos recibieron un yogur de ensayo al día durante el periodo de tratamiento.

35 Se tomaron muestras de sangre en ayuno de 12 horas al principio y al final de las fases del ensayo. Las muestras de sangre obtenidas en el día 1 y 2 fueron usadas para medir los valores de línea base para las diferentes mediciones del estudio, mientras que las muestras de sangre obtenidas en los últimos días se usaron para medir los valores finales para los niveles de lípidos en suero.

Eficacia y seguridad de yogur que contiene *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) microencapsulada de elevada actividad de *bsh* para reducir el nivel de lípidos (Tablas 5 y 6)

Resultados

45 Las Tablas 5 y 6 muestran el cambio porcentual en el nivel de lípidos en ayunas en sujetos hipercolesterolémicos en respuesta al consumo de *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) de mayor actividad de *bsh* a lo largo de un periodo de tratamiento de 6 semanas. El resultado muestra reducciones significativas en el nivel de colesterol total y LDL, así como en ApoB, como se predeciría a partir de los valores de actividad de *bsh* (26,4 μmol de GDCA/gramo/hora y 182,6 μmol de TDCA/gramo/hora). Este brazo de estudio paralelo, aleatorizado, doblemente ciego, fue bien establecido y estuvo bien controlado; por tanto, cualquier reducción del nivel de colesterol fue debida al ingrediente probiótico.

Materiales y métodos

50 Este estudio examinó la eficacia de formulaciones de yogur probiótico que contiene *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) microencapsulada de elevada actividad de *bsh* sobre parámetros de salud relativos a enfermedades degenerativas en humanos.

5 El objetivo fue evaluar los efectos del consumo de una formulación de yogur que contiene *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) de elevada actividad de hidrolasa de sal biliar (*bsh*) microencapsulada en alginato poli-L-lisina alginato (APA) sobre los niveles de lípidos en adultos hipercolesterolémicos y acceder a los cambios relativos de concentración de colesterol LDL en plasma en adultos hipercolesterolémicos tras 6 semanas de consumo del producto frente al producto de control.

10 El experimento implicó un ensayo controlado con placebo de brazo paralelo aleatorizado doblemente ciego multi-céntrico (5 centros). Los sujetos recibieron instrucciones de seguir las recomendaciones dietarias de "Health Canada", que tienen el objetivo de ayudar a reducir riesgos de obesidad y enfermedad cardíaca. La duración del estudio fue de 10 semanas, incluyendo un lavado de 2 semanas, periodos de preparación de 2 semanas y un periodo de tratamiento de 6 semanas. Durante el periodo de lavado, los sujetos siguieron solo instrucciones dietarias. Durante el periodo de preparación, se tomó placebo. El producto de tratamiento o de placebo se tomó durante el periodo de tratamiento completo.

15 Se aleatorizaron un total de 120 hombres y mujeres sanos con edades entre 18 y 74 años, con un nivel de colesterol LDL >3,4 mmol/L, y los niveles de TG <4,0 mmol/L, y un rango de IMC de 22-32 kg/m² y se evaluaron 109 sujetos como pre-protocolo.

Se tomaron muestras de sangre en ayuno de doce horas al principio y al final del periodo de tratamiento. Las muestras de sangre obtenidas en el día 1 y 2 fueron usadas para medir los valores de línea base para las diferentes mediciones del estudio, mientras que las muestras de sangre obtenidas en los últimos días se usaron para medir los valores finales para los niveles de lípidos en suero.

20 **Identificación de bacterias con elevada actividad de *bsh* (Figura 7 y Tabla 7)**

Resultados

25 El ensayo de escrutinio de zona de precipitación de MRS-TDCA-placa muestra que, como método para determinar la actividad de *bsh* de TDCA, la placa está sin purificar y puede no ser suficiente para identificar probióticos candidatos para reducir el nivel de colesterol con una elevada actividad de *bsh*. Como puede observarse, los cultivos con mayor actividad de *bsh* tienen mayores zonas de precipitación; sin embargo, en los casos en los que el precipitado de DCA se concentra más densamente, el escrutinio con placas de TDCA solo no identifica los organismos con mayor actividad de *bsh* como candidatos potenciales. Por esta razón puede requerirse un ensayo con una mayor resolución, tal como un ensayo de HPLC, que cuantifique la actividad de *bsh* para glico- y tauro-conjugados.

30 La Figura 7 muestra tres *Lactobacillus reuteri* con actividad de *bsh* cultivadas anaeróbicamente en un placa MRS-TDCA durante 24 horas. El tamaño de la zona de precipitación y la densidad de precipitación son claramente diferentes para cada organismo.

35 La Tabla 7 muestra el diámetro de precipitación (mm) de ácido desoxicólico (DCA) medido sobre placas MRS-TDCA después de 24 horas de crecimiento anaeróbico mediante discos de filtración impregnados con cultivo. Los valores son promedios de mediciones por triplicado en 3 placas MRS-TDCA de agar. La comparación de los resultados de la Tabla 7 con los de la Tabla 2 demuestra que el ensayo de zona de precipitación no siempre diferencia bacterias con elevada actividad de *bsh* como es evidente a partir del hecho de que la LR050 tiene una mayor zona de precipitación que la LR052, mientras que el HPLC demuestra que en realidad la LR052 tiene mayor actividad de *bsh*.

Materiales y métodos

40 Se cultivaron *Lactobacillus* durante una noche en medio MRS a 37°C. Se centrifugaron 500 µL de cada cultivo en un Eppendorf pesado previamente. Se retiró el sobrenadante y se pesaron las partículas. Las partículas fueron resuspendidas con MRS para conseguir la misma proporción 1:10 de p/v se añadieron 10 µL de cada cultivo a discos de filtración por duplicado sobre diferentes placas de agar MRS-TDCA. Las placas fueron incubadas anaeróbicamente a 37°C y se realizaron medidas.

45 **Desconjugación de TDCA y GDCA por cepas libres de *Lactobacillus reuteri* (Figuras 8 y 9)**

Resultados

50 Las Figuras 8 y 9 muestran la desconjugación de ácido taurodesoxicólico y ácido glicodesoxicólico, determinada mediante HPLC, en un ensayo in vitro usando 0,2 gramos de *Lactobacillus reuteri* libre (ATCC 55148, ATCC 55739, NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, LMG 22877, LMG 22878, LMG 22879, CCUG 32271, CCUG 32305, CCUG 37470, CCUG 44001, CCUG 44144, CCUG 47824) con el tiempo. Los resultados muestran que las cepas ATCC 55148, NCIMB 701359, NCIMB 701089, NCIMB 702655, LMG 18238, CCUG 32271, CCUG 32305, CCUG 37470, CCUG 44001 y CCUG 44144 presentan particularmente una elevada actividad de *bsh*, determinada mediante HPLC.

Materiales y métodos

Bacterias y condiciones de cultivo

Las cepas de *Lactobacillus reuteri* fueron cultivadas en caldo esterilizado de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) a 37°C durante 20 horas. Los cultivos fueron aislados por centrifugación y las bacterias recolectadas fueron usadas en el siguiente ensayo BSH.

5 **Medición de la actividad BSH**

Para medir la actividad BSH, las bacterias recolectadas se añadieron a un 100% de MRS suplementado con una combinación de glicodesoxicolato sódico y tauro desoxicolato sódico, ambos a 5 mM (0,2 g de células bacterianas/20 mL de MRS suplementado con GDCA y TDCA). A continuación las bacterias fueron incubadas en el caldo de reacción anaeróticamente a 37°C con mínima agitación (100 rpm), y se tomaron muestras del sobrenadante a intervalos de 2,5 horas y se procesaron para determinar las concentraciones de sales biliares conjugadas. Resumidamente, se acidificaron muestras de 500 µL con 5 µL de HCl 6N tras eliminar las células bacterianas mediante centrifugación a 10000g durante 3 minutos. Los sobrenadantes fueron suplementados entonces con 500 µL de metanol que contenía GCA (ácido glicocólico) 4 mM como patrón interno. Las muestras fueron sometidas a vórtice durante 10 minutos y se centrifugaron a 1000g durante 15 minutos. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 0,22 µm antes de ser analizadas mediante HPLC. El análisis de HPLC de las sales biliares siguió el procedimiento descrito por Jones et al. 2003.

Análisis de HPLC de sales biliares

El análisis de HPLC de sales biliares siguió el procedimiento descrito por Jones et al. 2003. El análisis se llevó a cabo en una columna C-18 de fase inversa: LiChrosorb RP-18, 5 µm, 250 x 4,6 mm. El sistema de HPLC consistió en dos módulos de suministro de disolvente ProStar 210, un detector UV-VIS ProStar 320, un autoinyector ProStar 410 y un sistema de datos cromatográficos Galaxie (versión 1.9.3.2). Se aplicó una mezcla de metanol y tampón de acetato sódico 50 mM ajustada a pH 4,3 con ácido o-fosfórico (70:30, v/v) como fase móvil con un caudal de 1,0 mL/min. El detector se fijó a 210 nm y todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Ejemplo 2 – Elevada actividad BSH25 **Materiales y métodos generales**

Siembra y crecimiento bacterianos: las superficies de reservas bacterianas en glicerol congeladas fueron rascadas con un palo de madera esterilizado para rayar placas de agar MRS. Tras una incubación de una noche a 37°C en condiciones anaeróbicas, se seleccionó una única colonia de *L. reuteri* NCIMB 701359 con un lazo metálico en condiciones esterilizadas y se transfirió a un tubo que contenía 10 mL de MRS. Los cultivos fueron incubados durante una noche a 37°C para uso experimental.

Microencapsulación de *L. reuteri* NCIMB 701359: se prepararon microcápsulas con un 8% de carga celular y un 1,75% de concentración de alginato usando una boquilla de 200 µm. El proceso de recubrimiento fue el siguiente: en primer lugar, las partículas de alginato fueron drenadas de CaCl₂; en segundo lugar, las partículas de alginato fueron lavadas en NaCl al 0,85% (p/v) durante 10 minutos; en tercer lugar, las partículas de alginato fueron recubiertas en ε-PLL al 0,1% (p/v) durante 20 minutos; en cuarto lugar, las microcápsulas alginato-PLL fueron lavadas con NaCl al 0,85% (p/v) durante 10 minutos; en quinto lugar, las microcápsulas de alginato-PLL fueron recubiertas con alginato al 0,1% (p/v) durante 20 minutos; y finalmente las microcápsulas de alginato-PLL-alginato fueron lavadas con NaCl al 0,85% (p/v) durante 10 minutos.

Ensayo BSH para células libres congeladas y liofilizadas: células libres congeladas fueron descongeladas, centrifugadas y lavadas, y se añadieron (0,05 g) a 20 mL de MRS que contenía TDCA 5 mM y GDCA 5 mM. Las células libres liofilizadas se añadieron (0,15 g) a 20 mL de MRS que contenía TDCA 5 mM y GDCA 5 mM. Las muestras fueron sacadas después de 30 minutos y se analizaron con HPLC. Los controles fueron medio solo y microcápsulas recién preparadas cultivadas en MRS.

Ensayo BSH para microcápsulas: microcápsulas descongeladas y lavadas (muestra entre 0,3 g y 2,5 g, dependiendo de la actividad relativa) fueron añadidas a 20 mL de MRS que contenía TDCA 5 mM y GDCA 5 mM. Se sacaron muestras después de 30 minutos y se analizaron con HPLC. Los controles fueron medio solo y microcápsulas recién preparadas cultivadas en MRS. 0,3 g de microcápsulas contenían 0,03 g de partícula de células libres.

Ensayo de HPLC para actividad BSH: los análisis se llevaron a cabo en una columna C-18 de fase inversa (LiChrosorb RP-18 250 mm x 4,6 mm, 5 µm) con un caudal de 1,0 mL/min. La fase móvil era una mezcla de metanol y tampón de acetato sódico 50 mM (pH 4,3 ajustado con ácido o-fosfórico) en una proporción de 70:30 y la detección se midió a 210 nm. La actividad de *bsh* se evaluó a través de la cantidad de GDCA y TDCA desconjugados en las muestras por hora y gramo de microcápsulas.

A. Actividad de *bsh* mejorada mediante fermentación (Tablas 8-10)

Materiales y métodos

5 *Aumento de la actividad de bsh en base a las fuentes de carbono y nitrógeno:* se cultivaron células de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 mediante el método general descrito anteriormente. Se inoculó un 1% de *L. reuteri* NCIMB 701359 en medio MRS modificado con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. Los cultivos inoculados fueron incubados a 37°C durante 24 h. Tras el periodo de incubación, se añadió 0,05 g ó 0,1 g de partícula de células a 20 mL de MRS que contenía TDCA 5 mM y GDCA 5 mM. Se retiraron muestras después de 0,5 h y 1,5 h, y se analizaron mediante HPLC. Se usó MRS como medio de crecimiento de control. Los análisis se llevaron a cabo mediante HPLC como se ha descrito en los métodos generales anteriormente.

10 *Aumento de la actividad de bsh en base al pH y al tiempo de recolección:* se cultivaron células de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 mediante el método general descrito anteriormente. Se inoculó un 1% de *L. reuteri* NCIMB 701359 en medio MRS modificado con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, y se ajustó el pH a pH 5, 6 y 6,8 mediante la adición de NaOH o HCl. Los cultivos inoculados a diferentes condiciones de pH fueron incubados a 37°C para tiempos de recolección de 12h a 48h. Tras el periodo de incubación, se añadió 0,05 g ó 0,1 g de partícula de célula a 20 mL de MRS que contenía TDCA 5 mM y GDCA 5 mM. Las muestras se retiraron tras 0,5 h y 1,5 h, y se analizaron con HPLC como se ha descrito en los métodos generales anteriormente. Los controles se cultivaron en medio MRS no modificado.

Resultados

20 Los resultados más favorables a partir de una fuente de carbono para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 fermentada en MRS modificado, que incrementan la actividad de *bsh* y el rendimiento, fueron con maltosa. El GDCA y TDCA se desconjugaron a velocidades de 2.253 ($\mu\text{mol/g/h}$) y 173 ($\mu\text{mol/g/h}$) respectivamente y se mantuvo un rendimiento de 0,015 g/mL (Tabla 8). Los resultados más favorables a partir de una fuente de nitrógeno para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 fermentada con esta fuente de carbono (maltosa) y buscando incrementar la desconjugación de GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$), la desconjugación de TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) (HPLC), y el rendimiento (g/mL) fueron con una combinación de peptona n° 3, extracto de levadura, extracto de malta y cisteína. El GDCA y TDCA se desconjugaron a velocidades de 21.185 ($\mu\text{mol/g/h}$) y 2.323 ($\mu\text{mol/g/h}$) respectivamente y se mantuvo un rendimiento de 0,013 g/mL (Tabla 9). Los resultados más favorables para el tiempo de recolección y el pH inicial para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 fermentada en el medio comentado anteriormente (maltosa + peptona n° 3 + extracto de levadura + extracto de malta + cisteína) o MRS, buscando incrementar la desconjugación de GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$), la desconjugación de TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) (HPLC), y el rendimiento (g/mL) fueron para un pH de 5 y un tiempo de recolección de 12-20 horas (Tabla 10).

35 Estos resultados muestran que las condiciones que incluyen fuentes de carbono y nitrógeno, pH y tiempo de recolección alcanzan una elevada actividad de *bsh* y un elevado rendimiento celular con *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359; estas condiciones producen un producto de elevada actividad, que mantiene niveles elevados de *bsh* durante el almacenamiento en formato de alimento funcional o suplemento alimenticio, y que es económicamente viable para producción comercial. Estos datos demuestran que las células probióticas con maquinaria productora de *bsh* son fermentadas fácilmente con un medio y unas condiciones definidas para alcanzar niveles terapéuticos de actividad enzimática y niveles de biomasa comercialmente viables. Este proceso es útil para preparar probióticos con actividad de *bsh* viables comercialmente para reducir el nivel de lípidos y para otras aplicaciones.

B. Actividad de bsh mejorada por liofilización (Tabla 11 y Figura 10)Materiales y métodos

45 *Condiciones de almacenamiento de liofilización para elevada actividad BSH:* se prepararon microcápsulas que contenían *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 mediante el método general descrito anteriormente. Las microcápsulas fueron almacenadas con una proporción de 7:3 de microcápsulas a disolución lioprotectora como se indica a continuación: trehalosa 1M, 10% de maltodextrina, 1% de inulina, 10% de maltodextrina y 0,33% de extracto de levadura, trehalosa 1M y 0,33% de extracto de levadura, 1% de inulina y 0,33% de extracto de levadura, 10% de maltodextrina y 1% de hidrolisato de caseína, y 10% de leche desnatada. Se liofilizaron suspensiones que contenían las microcápsulas y disolución lioprotectora y se almacenaron a 4°C durante 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas en alícuotas individuales. Para cada tiempo, muestras duplicadas de microcápsulas liofilizadas que contenían todas lioprotector fueron rehidratadas con salino. Se usó el ensayo de *bsh* para microcápsulas descrito anteriormente para preparar las muestras para análisis mediante HPLC empleando el método general anterior.

55 Se preparó *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 libre mediante el método general descrito anteriormente. Se añadieron lioprotectores a la suspensión de células libres a una concentración final de: 10% de maltodextrina y 0,33% de extracto de levadura. Las suspensiones fueron liofilizadas y almacenadas a 4°C ó a temperatura ambiente durante 0, 1, 2 y 3 meses en alícuotas individuales. Para cada tiempo, muestras duplicadas de células liofilizadas que contenían todas lioprotector fueron rehidratadas con salino. Se usó el ensayo de *bsh* para material liofilizado descrito anteriormente para preparar las muestras para análisis mediante HPLC empleando el método general anterior.

Resultados

Los resultados más favorables a partir de un lioprotector para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359, que aumenta la actividad de *bsh*, fueron con un 10% de maltodextrina y un 0,33% de extracto de levadura, un 1% de inulina y un 0,33% de extracto de levadura, y con un 1% de inulina (Tabla 11).

- 5 Estos resultados demuestran que los lioprotectores mantienen una elevada actividad de *bsh* para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359; el lioprotector mantiene la morfología de las microcápsulas tras rehidratación (Figura 10), mantiene niveles elevados de *bsh* durante el almacenamiento en formato de alimento funcional o suplemento alimenticio, y es económicamente viable para producción comercial. Estos datos demuestran que las células probióticas libres o microencapsuladas con maquinaria productora de *bsh* son liofilizadas fácilmente con lioprotectores para mantener niveles terapéuticos de actividad enzimática. Este proceso es útil para preparar probióticos liofilizados con actividad *bsh* comercialmente viables para reducir el nivel de lípidos y para otras aplicaciones.

C Actividad de *bsh* mejorada por almacenamiento líquido (Tabla 12)Materiales y métodos

- 15 *Condiciones de almacenamiento en líquido para actividad BSH:* se prepararon microcápsulas que contenían *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 mediante el método general descrito anteriormente. Las microcápsulas fueron almacenadas en una proporción de 1:1 de microcápsulas a disoluciones conservadoras como se indica a continuación: 5% de medio de crecimiento, 10% de medio de crecimiento, 20% de medio de crecimiento, 10% de medio MRS, yogur, sobrenadante de cultivo, 1% de maltosa, 0,85% de salino, 1% de extracto de malta, 1% de inulina, 10% de sorbitol, 0,33% de extracto de levadura, 1% de inulina y 0,33% de extracto de levadura y fructosa 1M. Las microcápsulas resultantes fueron almacenadas en disoluciones conservantes a 4 grados para almacenamiento a un plazo corto de 4 días en alícuotas individuales. Se extrajeron del medio de almacenamiento muestras duplicadas de microcápsulas que contenían la disolución conservante y se lavaron con salino. Se usó el ensayo de *bsh* para microcápsulas descrito anteriormente para preparar las muestras para análisis de HPLC mediante el método general anterior.

Resultados

- Los resultados más favorables a partir de una condición de almacenamiento líquido para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359, considerando la actividad de *bsh* tras 4 días de almacenamiento líquido, fueron con yogur (1:1), 5% de medio de crecimiento (1:1), 10% de medio de crecimiento, 20% de medio de crecimiento (1:1), sobrenadante de cultivo (1:1) y 10% de MRS (1:1) (Tabla 12).

- Estos resultados demuestran que las condiciones de almacenamiento líquido mantienen la elevada actividad de *bsh* de la *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359; que estas condiciones dan como resultado la producción de un producto altamente activo, que mantiene niveles de *bsh* elevados durante el almacenamiento líquido temporal, y que es económicamente viable para usarse en un proceso comercial. Estos datos demuestran que determinadas condiciones de almacenamiento específicas son beneficiosas para el almacenamiento en medio líquido a fin de alcanzar niveles terapéuticos de actividad enzimática. Este proceso es útil para mantener la actividad de *bsh* durante el almacenamiento a corto plazo, y hace que el proceso de producción sea viable comercialmente para producir probióticos con actividad de *bsh* para reducir el nivel de lípidos y para otras aplicaciones terapéuticas en enfermedades metabólicas.

D Actividad de *bsh* mejorada por congelación espontánea (Tabla 13)Materiales y métodos

- Condiciones de almacenamiento por congelación espontánea para actividad de *bsh*:* se prepararon microcápsulas que contenían *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 mediante el método general anterior. Las microcápsulas fueron almacenadas en una proporción de 1:1 de microcápsulas a disolución crioprotectora como se indica a continuación: trehalosa 1M, fructosa 1M, 1% de inulina, maltosa 1M, sacarosa 1M, 10% de PEG 8000, 0,85% de salino, 10% de leche desnatada, 10% de almidón o 10% de fructooligosacáridos. Las suspensiones que contenían las microcápsulas y la disolución crioprotectora se hicieron pasar lentamente a través de una jeringa esterilizada para formar gotitas esféricas que fueron suspendidas en nitrógeno líquido. Las partículas congeladas espontáneamente resultantes fueron aisladas del nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C en alícuotas individuales. Inmediatamente y después de 3 semanas de almacenamiento, se tomaron muestras duplicadas de microcápsulas en partículas que contenían disolución crioprotectora del medio de almacenamiento y se lavaron con salino. Se usó el ensayo de *bsh* para microcápsulas descrito anteriormente para preparar las muestras para el análisis de HPLC descrito anteriormente en los métodos generales.

- Se prepararon *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 libres mediante el método general anterior. La partícula de células libres se re-suspendió en medio agotado con una proporción 1:1 de células a medio agotado. La suspensión celular resultante se hizo pasar lentamente a través de una jeringa esterilizada para formar gotitas esféricas que

fueron suspendidas en nitrógeno líquido. Las partículas congeladas espontáneamente resultantes fueron aisladas del nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Del medio de almacenamiento se retiraron muestras duplicadas de células en partículas que contenían disolución crioprotectora de medio agotado. Se usó el ensayo de *bsh* para células libres descrito anteriormente para preparar las muestras para el análisis de HPLC descrito anteriormente en los métodos generales.

Resultados

Los resultados más favorables a partir de medio crioconservante para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359, congeladas espontáneamente en nitrógeno líquido, cuando se considera la morfología de la cápsula y/o el % de actividad de *bsh* remanente inmediatamente post-congelación espontánea y a las 3 semanas, incluyeron 1:1 de bacterias libres o microencapsuladas a disolución crioconservante con maltodextrina y extracto de levadura, inulina, trehalosa, fructosa, sacarosa, lactosa, maltosa y medio agotado a las concentraciones indicadas (Tabla 13).

Estos resultados demuestran que las condiciones de crioconservación en congelación espontánea en nitrógeno líquido para almacenamiento en congelación alcanzan una elevada actividad de *bsh* y una buena morfología de microcápsula con *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359; lo que permite la producción de un producto con niveles elevados de *bsh* a lo largo de un almacenamiento extendido en formato de alimento funcional o suplemento alimenticio, y que es económicamente viable para la producción comercial. Estos datos demuestran que las células probióticas libres o microencapsuladas con elevada actividad de *bsh* se preparan fácilmente en diversas condiciones crioconservadoras y que la congelación espontánea en nitrógeno líquido alcanza niveles terapéuticos de actividad enzimática, así como una excelente morfología de microcápsula. Este proceso es útil para preparar probióticos con actividad de *bsh* comercialmente viables para reducir el nivel de lípidos y para otras aplicaciones.

Aunque la presente descripción ha sido descrita en referencia a lo que actualmente se considera que son los ejemplos preferidos, debe entenderse que la descripción no está limitada por los ejemplos incluidos. Al contrario, la descripción pretende cubrir las diversas modificaciones y disposiciones equivalentes incluidas dentro del espíritu y el alcance de las reivindicaciones acompañantes.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente se incorporan plenamente a la presente memoria a modo de referencia, en la misma extensión que si cada publicación, patente o solicitud de patente individual estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada plenamente a modo de referencia.

Tabla 1: Dos ecuaciones usadas habitualmente para determinar el índice aterogénico (IA), que representa el riesgo aterogénico, y que se usan como indicadores pronósticos en pacientes en riesgo de desarrollar aterosclerosis.

Índice Aterogénico (IA) = Log (Triglicéridos / Colesterol HDL)
Índice Aterogénico (IA) = (Colesterol Total – Colesterol HDL) / (Colesterol HDL)

Tabla 2: La actividad BSH de *Lactobacillus reuteri* libre determinada mediante HPLC se muestra en µmol de DCA por gramo y hora (µmol de DCA/g/h). Ácido taurodesoxicólico = TDCA, Ácido glicodesoxicólico = GDCA, Ácido desoxicólico = DCA.

	TDCA (µmol de DCA/g/h) Velocidad media (0-5h)	GDCA (µmol de DCA/g/h) Velocidad media (0-1h)	TDCA (µmol de DCA/g/h) Velocidad media (0-0,5h)	GDCA (µmol de DCA/g/h) Velocidad media (0-0,5h)
<i>L. reuteri</i> (LabMet) libre	1,5	47,8	7,2	65,3
<i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) libre	26,4	182,6	44,0	372,0
<i>L. reuteri</i> (NCIMB 701089) libre	77,5	424,0	93,0	805,0

Tabla 3: Se muestran los valores finales de nivel de lípidos (% de cambio respecto al control) correspondientes a hámsters F1B inducidos para ser hipercolesterolémicos (0,5% de colesterol en dieta) (5 semanas) y tratados después (6 semanas) mediante sonda nasogástrica con *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) microencapsulada o libre (n=33).

	C-LDL (%)	Colesterol Total (%)	C-HDL (%)	TG (%)	IA (%)
<i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) microencapsulada	-23,60	-16,83	-11,11	-5,05	-11,27
<i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) libre	-27,43	-16,94	-6,26	-11,63	-18,53

5

Tabla 4: Cambio porcentual en los niveles de lípidos en ayunas (sobre el control) en sujetos humanos moderadamente hipercolesterolémicos en respuesta al consumo de *Lactobacillus reuteri* (LabMet) microencapsulada en APA de baja actividad de *bsh* en un periodo de tratamiento de 6 semanas (n=30, siguiendo el protocolo).

	C-LDL (%)	Colesterol Total (%)	C-HDL (%)	TG (%)
<i>L. reuteri</i> (LabMet) microencapsulada	-0,07	-3,63	-2,37	-12,51

10 **Tabla 5:** Se proporcionan los niveles de lípidos en ayunas, como diferencia porcentual respecto al placebo, en sujetos humanos moderadamente hipercolesterolémicos en respuesta al consumo de *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) microencapsulada de elevada actividad de *bsh* en un periodo de tratamiento de 6 semanas (n=109, siguiendo el protocolo).

<i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) microencapsulada				
Parámetro de lípidos	% de cambio (3 semanas)	Valor-P	% de cambio (6 semanas)	Valor-P
CT	-2,89	0,2321	-4,86	0,0501
C-LDL	-3,83	0,1660	-9,23	0,0061
C-HDL	+0,14	0,9697	+0,49	0,9101
TG	-23,69	0,0275	+21,05	0,0869
ApoB-100	-3,84	0,2056	-6,66	0,0405

15 **Tabla 6:** Se proporcionan los niveles de lípidos en ayunas, como diferencia porcentual respecto al placebo, en sujetos humanos hipercolesterolémicos, con un riesgo elevado y un riesgo muy elevado, en respuesta al consumo de *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359) microencapsulada en APA de elevada actividad de *bsh* en un periodo de tratamiento de 6 semanas (n=65).

<i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) microencapsulada		
Parámetro de lípidos	% de cambio (6 semanas)	Valor-P
CT	-5,53	0,101
C-LDL	-10,22	0,024
C-HDL	-0,19	0,97

<i>L. reuteri</i> (NCIMB 701359) microencapsulada		
Parámetro de lípidos	% de cambio (6 semanas)	Valor-P
TG	+11,09	0,54
ApoB-100	-10,69	0,0082

Tabla 7: Diámetro de precipitación (mm) de ácido desoxicólico (DCA) medido sobre placas de MRS-TDCA tras 24 horas de crecimiento anaeróbico mediante discos de filtración impregnados con cultivo. Los valores son promedios de medidas por triplicado en 3 placas de agar de MRS-TDCA.

	Lr010	Lr050	Lr052
2 días	12,6	17,3	17
3 días	13	20	18
4 días	13,2	20,3	18,2

5

Tabla 8: Resultados experimentales para determinar la fuente de carbono para incrementar la desconjugación de GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$), la desconjugación de TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) (HPLC), y el rendimiento (g/mL) para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 fermentada en MRS modificado (extracto de levadura + extracto de vacuno + peptona nº 3) con diferentes fuentes de carbono.

10

	Extracto de levadura + Extracto de vacuno + Peptona nº 3		
	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	Rendimiento (g/mL)
Sacarosa	950	117	0,012
Xilosa	225	75	0,008
Inulina + Glucosa	2050	825	0,008
Lactosa	145	18	0,011
Dextrina	1640	180	0,01
Sorbitol + Glucosa	1889	689	0,009
Glucosa (MRS)	957	57	0,014
Maltosa	2253	173	0,015

Tabla 9: Resultados experimentales para determinar la fuente de nitrógeno para incrementar la desconjugación de GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$), la desconjugación de TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) (HPLC), y el rendimiento (g/mL) para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 fermentada en la fuente de carbono (maltosa) con diferentes fuentes de nitrógeno.

Maltosa (Fuente de carbono) +	Extracto de levadura + Extracto de vacuno			Hidrolisato ácido de caseína + extracto de malta			Extracto de levadura + Extracto de malta		
	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	Rto. (g/mL)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	Rto. (g/mL)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	Rto. (g/mL)
Peptona nº 3	2253	173	0,015	2156	167	0,018	3322	933	0,018
Triptona				843	514	0,014	1013	67	0,015
Peptona de pez				680	80	0,005	1067	107	0,015
Peptona de soja				367	67	0,012	689	78	0,018
Peptona nº3 + Cisteína							21185	2323	0,013
Triptona + Cisteína	6271	1271	0,014						
Proteosa peptona + cisteína							2786	671	0,014
Peptona de caseína + cisteína	6271	1414	0,014						
Peptona de pez + Cisteína	8415	1446	0,013						
Peptona de soja + Cisteína	1779	179	0,019						

Tabla 10: Resultados experimentales para determinar el tiempo de recolección y el pH inicial para incrementar la desconjugación de GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$), la desconjugación de TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$) (HPLC), y el rendimiento (g/mL) para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 fermentada con medio de crecimiento (maltosa + peptona nº 3 + extracto de levadura + cisteína) o medio MRS a diferentes valores de pH inicial y a diferentes tiempos de recolección.

	Medio de crecimiento pH 5			Medio de crecimiento pH 6			Medio de crecimiento pH 6,8			Medio MRS pH 6,8		
	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)
12h	19350	3475	3,12	15775	3063	3,09	18752	2288	2,69	201	0	1,20
16h	19078	3772	3,18	16163	3547	3,06	18173	2448	2,60	168	0	1,62

	Medio de crecimiento pH 5			Medio de crecimiento pH 6			Medio de crecimiento pH 6,8			Medio MRS pH 6,8		
	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)	GDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	TDCA ($\mu\text{mol/g/h}$)	DO (600 nm)
20h	17750	3463	3,21	18013	3001	3,02	15765	2175	2,72	186	0	1,57
24h	19187	3711	3,10	18860	3048	2,99	16362	2362	2,66	483	33	1,63
36h										961	80	1,82
48h										1704	339	1,77

Tabla 11: Resultados experimentales para lioprotectores, en una proporción 7:3 de microcápsulas a disolución lioprotectora, y % de la actividad original de *bsh* para *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359 a valores promedio para 2 y 3, así como para 5 y 6 semanas.

Disoluciones lioprotectoras que retienen la morfología de microcápsula tras liofilización y rehidratación	% de actividad original tras liofilización y almacenamiento a 4°C	
	Semanas 2 y 3	Semanas 5 y 6
Células libres: (concentración final: 10% de maltodextrina + 0,33% de extracto de levadura)		100% (1, 2, 3 meses a 4°C y temp. ambiente)
Microcápsulas: trehalosa 1M (7:3) (conc. final 0,3M)	70,4%	67,4%
Microcápsulas: 10% de maltodextrina (7:3) (conc. final 3%)	<25%	<25%
Microcápsulas: 1% de inulina (7:3) (conc. final 0,3%)	83,1%	85,3%
Microcápsulas: 10% de maltodextrina + 0,33% de extracto de levadura (7:3) (conc. final 3% + 0,1%)	100%	100%
Microcápsulas: trehalosa 1M + 0,33% de extracto de levadura (7:3) (conc. final 0,3M + 0,1%)	69,2%	65,2%
Microcápsulas: 1% de inulina + 0,33% de extracto de levadura (7:3) (conc. final 0,3% + 0,1%)	75,2%	80,5%
Microcápsulas: 10% de maltodextrina + 1% de hidrolisato de caseína (7:3) (conc. final 3% + 0,3%)	<25%	<25%

Tabla 12: Resultados experimentales para condiciones de almacenamiento líquido en base a la actividad de *bsh* (% del original) a 4 días.

Condición de almacenamiento	% de la actividad de <i>bsh</i> original tras almacenamiento a corto plazo (4 días) a 4°C
Microcápsulas: Yogur (3:97)	87,1% (1 semana)
Microcápsulas: Yogur (3:97)	54,6% (4 semanas)
Microcápsulas: Yogur (3:97)	53,5% (6 semanas)
Microcápsulas: Yogur (1:1)	96,0%
Microcápsulas: 5% de medio de crecimiento (1:1) (conc. final 2,5%)	92,6%
Microcápsulas: 10% de medio de crecimiento (1:1) (conc. final 5%)	92,4%
Microcápsulas: 20% de medio de crecimiento (1:1) (conc. final 10%)	88,2%
Microcápsulas: 100% de sobrenadante de cultivo (1:1) (conc. final 50%)	87,0%
Microcápsulas: 10% de MRS (1:1) (conc. final 5%)	81,5%
Microcápsulas: 1% de maltosa (1:1) (conc. final 0,5%)	22,0%
Microcápsulas: 1% de extracto de malta (1:1) (conc. final 0,5%)	<15%
Microcápsulas: 1% de inulina (1:1) (conc. final 0,5%)	<15%
Microcápsulas: 10% de sorbitol (1:1) (conc. final 5%)	<15%
Microcápsulas: 0,33% de extracto de levadura (1:1) (conc. final 0,165%)	<15%
Microcápsulas: 1% de Inulina + 0,33% de extracto de levadura (1:1) (conc. final 0,5% + 0,165%)	<15%
Microcápsulas: fructosa 1M (1:1) (conc. final 0,5M)	<15%
Microcápsulas: No líquido	<15%
Microcápsulas: 0,85% de salino (1:1) (conc. final 0,425%)	<15%

- 5 **Tabla 13:** Resultados experimentales para disolución crioprotectora, cuando se congela espontáneamente y se almacena a -80°C, para microcápsulas de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 701359, determinados mediante microscopía para morfología de microcápsula (% de calidad original) y HPLC para actividad de *bsh* (% de actividad original), datos inmediatamente después de congelación espontánea en nitrógeno líquido y después de 3 semanas de almacenamiento a -80°C.

Condiciones de crioconservación	% de Calidad Original	% de actividad BSH Original	
	Morfología de microcápsula	Después de proceso de congelación espontánea y descongelación	Después de congelación espontánea + almacenamiento (3 semanas)
Células libres: células + 100% de medio agotado (1:1) (conc. final 50%)		100%	
Microcápsulas: 1% de maltodextrina + 0,23% de extracto de levadura (1:1) (conc. final 0,5% + 0,115%)		77,8%	
Microcápsulas: 2% de maltodextrina + 0,23% extracto de levadura (1:1) (conc. final 1% + 0,115%)		100%	
Microcápsulas: 10% de maltodextrina + 0,33% extracto de levadura (1:1) (conc. final 5% + 0,165%)		100%	
Microcápsulas: 1% de inulina (1:1) (conc. final 0,5%)	100%	98,5%	90,3%
Microcápsulas: trehalosa 1M (1:1) (conc. final 0,5M)	98,3%	100%	88,3%
Microcápsulas: fructosa 1M (1:1) (conc. final 0,5M)	98,2%	<50%	<50%
Microcápsulas: sacarosa 1M (1:1) (conc. final 0,5M)	97,1%	97,7%	93,3%
Microcápsulas: lactosa 1M (1:1) (conc. final 0,5M)	95,0%	100%	92,3%
Microcápsulas: maltosa 1M (1:1) (conc. final 0,5M)	90,0%	94,2%	92,1%
Microcápsulas: 10% de FOS (1:1) (conc. final 5%)	70,0%	No evaluado debido a morfología	
Microcápsulas: 10% de PEG8000 (1:1) (conc. final 5%)	28,1%	No evaluado debido a morfología	
Microcápsulas: 10% de leche desnatada (1:1) (conc. final 5%)	25,5%	No evaluado debido a morfología	
Microcápsulas: 10% de almidón (1:1) (conc. final 5%)	24,4%	No evaluado debido a morfología	
Microcápsulas: 0,85% de salino (1:1) (conc. final 0,425%)	12,0%	No evaluado debido a morfología	

LISTA DE REFERENCIAS

- Angulo, P. "Nonalcoholic fatty liver disease", *N. Engl. J. Med.* 346, 1221 (2002).
- Aso, Y. et al., "Preventive Effect of A Lactobacillus-Casei Preparation on the Recurrence of Superficial Bladder-Cancer in A Double-Blind Trial", *European Urology* 27(2), 104 (1995).
- 5 Chang, T.M.S. Semipermeable microcapsules. *Science* 146, 524-525 (1964).
- Chang, T.M. & Prakash, S. Artificial cells for bioencapsulation of cells and genetically engineered E. coli. For cell therapy, gene therapy, and removal of urea and ammonia. *Methods Mol. Biol.* 63, 343-358 (1997).
- Chang, T.M. & Prakash, S. Therapeutic uses of microencapsulated genetically engineered cells. *Mol. Med. Today* 4, 221-227 (1998).
- 10 Dobrogosz, W.J. "Enhancement of human health with Lactobacillus reuteri: A probiotic, immunobiotic and immunoprotective", *NUTRAfoods* 4, 15 (2005).
- Ford, E.S. et al. Prevalence of metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 287(3):356 (2002).
- Gaist, D. et al., "Lipid-lowering drugs and risk of myopathy: A population based follow-up study", 12(5), 565 (2001).
- 15 Gaist, D. et al., "Statins and risk of polyneuropathy - A case-control study", 58(9), 1333 (2002).
- Goldenberg, I., M. Benderly, y U. Goldbourt, "Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate", 4(1), 131 (2008).
- Hallikainen, M. A. y M. I. J. Uusitupa, "Effects of 2 low-fat stanol ester-containing margarines on serum cholesterol concentrations as part of a low-fat diet in hypercholesterolemic subjects", 69(3), 403 (1999).
- 20 Huang, J.S. et al., "Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis", *Dig. Dis. Sci.* 47(11), 2625 (2002).
- Jenkins, D. J. A. et al., "The effect on serum lipids and oxidized low-density lipoprotein of supplementing self-selected low-fat diets with soluble-fiber, soy, and vegetable protein foods", 49(1), 67 (2000).
- Jones et al. "Method for Bile Acid Determination by High Performance Liquid Chromatography". *J Med Sci* 2003; 23(5): 277-280.
- 25 Lodinova-Zadnikova, R. y U. Sonnenborn, "Effect of preventive administration of a nonpathogenic Escherichia coli strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants", *Biol. Neonate* 71(4), 224 (1997).
- Lopez-Garcia, E. "Consumption of Trans Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction". *The Journal of Nutrition* 135 (3): 562 (2005).
- 30 McIntosh, G. H., P. J. Royle, y M. J. Playne, "A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats", *Nutr. Cancer* 35(2), 153 (1999).
- Omar, M. A. y J. P. Wilson, "FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis", 36(2), 288 (2002).
- Ornish, D. et al., "Can Life-Style Changes Reverse Coronary Heart-Disease", 336(8708), 129 (1990).
- 35 Pedersen, T. R. et al., "Randomized Trial of Cholesterol-Lowering in 4444 Patients with Coronary-Heart-Disease - the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)", 344(8934), 1383 (1994).
- Pepys, M.B. et al., "Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease". *Nature* 440: 1217 (2006).
- Prakash, S. y Jones M.L. Engineering Artificial Cells for Therapy. 7-22-2002. Sarawak, Malaysia, 2nd World Engineering Congress. Ref Type: Conference Proceeding
- 40 Prakash, S. y Urbanska A.M. (2007). Fermented milk product and uses thereof. WO 2007/140613.
- Probstfield, J. L. y B. M. Rifkind, "The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial: design, results, and implications", 40 Suppl 1, S69-S75 (1991).
- Rayes, N. et al., "Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients", *Transplantation* 74(1), 123 (2002).

- Scalia. "Simultaneous determination of free and conjugated bile acids in human gastric juice by HPLC". *J of Chrom*, 431 (1988) 259-269.
- Sgro, C. y A. Escousse, "Side-Effects of Hypolipidemic Drugs", 46(5), 351 (1991).
- Staffa, J. A., J. Chang, y L. Green, "Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis", 346(7), 539 (2002).
- 5 Szajewska, H. et al., "Efficacy of Lactobacillus GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants", *J. Pediatr.* 138(3), 361 (2001).
- Tabas, K. J. Williams, y J. Boren, "Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis - Update and therapeutic implications", 116 (16), 1832 (2007).
- Tall, A. R. "An overview of reverse cholesterol transport", 19 Suppl A, A31-A35 (1998).
- 10 "Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report," 106(25), 3143 (2002).
- Tobias, P.S., L.K. Curtiss, "Toll-like receptors in atherosclerosis", *Biochem Soc Trans.* 35(6) 1453 (2007).
- Uludag, H., De Vos, P., & Tresco, P.A. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 42, 29-64 (2000).
- 15 Urbanska A.M., Bhathena J., Martoni C., Prakash S. "Estimation of the Potential Antitumor Activity of Microencapsulated Lactobacillus acidophilus Yogurt Formulation in the Attenuation of Tumorigenesis in Apc(Min/+) Mice". *Dig. Dis. Sci.* (2009) 54: 264-273.

REIVINDICACIONES

1. Una composición oral que comprende una bacteria con elevada actividad BSH, un elemento aislado o sobrenadante del mismo, en donde la bacteria de elevada actividad BSH degrada >2000 µmol de GDCA/g/h y >500 µmol de TDCA/g/h cuando se determina a los 30 minutos, u opcionalmente >15000 µmol de GDCA/g/h y >2000 µmol de TDCA/g/h cuando se determina a los 30 minutos.
2. La composición oral de la reivindicación 1, en donde la bacteria es *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* o *Leuconostoc*, en donde la *Lactobacillus* es opcionalmente *Lactobacillus reuteri*, opcionalmente *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701359), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 701089), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 55148), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272), *Lactobacillus reuteri* (NCIMB 702655), *Lactobacillus reuteri* (LMG 18238), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32271), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 32305), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 37470), *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44001) o *Lactobacillus reuteri* (CCUG 44144).
3. La composición oral de la reivindicación 1 ó 2, en donde las bacterias de elevada actividad BSH son cultivadas en condiciones de fermentación que comprenden una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, un pH de 4-7 y un tiempo de recolección de 12 a 24 horas, opcionalmente 12-16 horas, y en donde la concentración de bacterias es opcionalmente $10^6 - 10^{12}$ CFU/gramo; que opcionalmente comprende cisteína; en donde la fuente de carbono comprende opcionalmente maltosa, sacarosa, dextrina, una combinación de sorbitol y glucosa, o una combinación de inulina y glucosa; y en donde la fuente de nitrógeno comprende opcionalmente (i) extracto de levadura y extracto de malta, extracto de levadura y extracto bovino o hidrolisato de caseína y extracto de malta; y (ii) peptona, opcionalmente peptona nº 3, o triptona.
4. La composición oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde las bacterias están inmovilizadas en un polímero, que comprende opcionalmente alginato, chitosán, agarosa, pectina, agarpectina, genipina o celulosa; o están encapsuladas en microcápsulas o nanocápsulas poliméricas semi-permeables, en donde la microcápsula o nanocápsula comprende opcionalmente membranas de Alginato/Poli-L-lisina/Alginato (APA), Alginato/Chitosán/Alginato (ACA), Alginato/Genipina/Alginato (AGA), Alginato/Poli-L-lisina/Pectina/Poli-L-lisina/Alginato (APPPA), Alginato/Poli-L-lisina/Pectina/Poli-L-lisina/Pectina (APPPP), Alginato/Poli-L-lisina/Chitosán/Poli-L-lisina/Alginato (APCPA), alginato-polimetileno-co-guanidina-alginato (A-PMCG-A), hidroximetilacrilato-metil metacrilato (HEMA-MMA), HEMA-MMA-MAA multicapa, poliácridonitrilovinilcloruro (PAN-PVC), acrilonitrilo/metaliulfonato sódico (AN-69), polietilen glicol/poli pentametilciclopentasiloxano/polidimetilsiloxano (PEG/PD5/PDMS) o poli N,N-dimetil acrilamida (PDMAAm).
5. La composición oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición está liofilizada, secada por calor, secada por pulverización, preparada húmeda o congelada espontáneamente en una disolución crioprotectora.
6. La composición oral de la reivindicación 5, en donde la composición está liofilizada con lioprotectores que comprende (a) 0,2 a 10% de maltodextrina y 0,05 a 0,33% de extracto de levadura, (b) de 0,05 a 2,5% de inulina y de 0,05 a 0,1% de extracto de levadura, o (c) 0,3% de inulina.
7. La composición oral de la reivindicación 5, en donde la composición se almacena en líquido, en donde las condiciones de almacenamiento líquido comprenden una disolución conservante final que comprende 2,5-10% de medio de crecimiento, 50-99,99% de yogur u otro lácteo fermentado, 50-99,99% de sobrenadante de cultivo o 5% de disolución de MRS.
8. La composición oral de la reivindicación 5, en donde la disolución crioprotectora comprende una concentración final de (a) 0,2-10% de maltodextrina y 0,05 a 0,33% de extracto de levadura, (b) de 0,05 a 2,5% de inulina, (c) Trehalosa 0,5M, (d) fructosa 0,5M, (e) lactosa 0,5M, (f) maltosa 0,5M o (g) 50-99,99% de medio agotado.
9. La composición oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un vehículo, en donde el vehículo comprende opcionalmente un suplemento, producto alimenticio, bebida, alimento funcional, sustancia nutracéutica, cápsula, píldora, cápsula de gel, líquido o película disoluble.
10. La composición oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición comprende además (a) un agente reductor del nivel de triglicéridos, opcionalmente un inhibidor de escualeno sintasa, un inhibidor de proteína de transferencia de triglicérido microsomal, una estatina, un secuestrante de ácido biliar (BAS), un inhibidor de la absorción de colesterol, fibrato u otro agonista PPAR alfa, agonista PPAR dual, inhibidor de lipasa,

inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B, péptido pancreático YY₃₋₃₆, antagonista de receptor recombinante u otro antagonista de receptor cannabinoide o agonista 5-HT_{2c}, tal como lorcaserina;

5 (b) un agente para aumentar el nivel de HDL o para limitar la reducción del nivel de HDL, opcionalmente una estatina, un secuestrante de ácido biliar (BAS), un inhibidor de la absorción de colesterol, fibrato u otro agonista PPAR alfa, agonista PPAR dual, inhibidor de lipasa, inhibidor de proteína tirosina fosfatasa 1B, péptido pancreático YY₃₋₃₆, antagonista de receptor recombinante u otro antagonista de receptor cannabinoide, o agonistas 5-HT_{2c}, tal como lorcaserina;

10 (c) un agente reductor del nivel de colesterol, opcionalmente un secuestrante de ácido biliar (BAS), una estatina, ezetimibe, ácido alfa-linoléico, ácido omega-3,6,9 eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), fibratos, fibra soluble, polifenol, metabolito de gama-oziranol hesperetina, un fitoquímico, otro probiótico, psyllium, fitosterol, fitostanol, vitamina, antioxidante o antibiótico;

15 (d) un agente para preservar la actividad BSH, opcionalmente inulina, trealosa, maltodextrano, extracto de levadura, polietilen glicol, glicerol, lípido, grasa emulsificada, un producto lácteo, glucosa, fructosa, sacarosa, un polisacárido, anhidrobiosis, un policosanol, polietilen glicol (PEG), un esteroil vegetal, un estanol vegetal o un ácido graso omega;

(e) un agente para modular adipocinas u hormonas de la obesidad, opcionalmente leptina, ghrelina, resistina, adiponectina, quemerina, IL-6, visfatina, proteína 4 de unión a retinol o inhibidor-1 activador de plasminógeno;

20 (f) un agente hipoglucémico, opcionalmente Metformina, Rosiglitazona, Pioglitazona, Gliburide, Gliclazide, Glimepiride, Glipizidebile Glibenclamide, Acarbosa, Miglitol, Voglibosa, Sitagliptina, Nateglinide, Repaglinide, Mitiglinide, Alogliptina, Saxagliptina, Vildagliptina o Dapagliflozina;

(g) un agente terapéutico para reducir el nivel de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 α/β , IL-2, IL-15, IL-3, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IFN-gamma, TNF-alfa, o para aumentar el nivel de las citocinas anti-inflamatorias IL-1ra, IL-9, IL-10, IL-11;

(h) vitamina B12;

25 (i) ácido linoleico conjugado (CLA);

(j) reuterina; y/o

(k) reuteriicina.

30 **11.** La composición oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10: (a) para uso en la reducción del nivel de colesterol en suero de un animal; (b) para uso en el incremento o la limitación de la reducción del nivel de lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) en suero de un animal; (c) para uso en la reducción del nivel de triglicéridos en suero del animal; (d) para uso en la producción y el suministro de vitamina B12, ácido linoleico conjugado (CLA), reuterina y/o reuteriicina al animal; (e) para uso en la reducción del índice aterogénico de un animal, en donde el índice aterogénico (IA) se calcula mediante al menos una de las siguientes ecuaciones: $IA = \text{Log}(\text{Triglicéridos}/\text{C-HDL})$ ó $IA = \text{CT} - \text{C-HDL} / \text{C-HDL}$; o (f) para uso en la reducción de factores de riesgo ateroesclerótico del animal, en donde los factores de riesgo ateroesclerótico se seleccionan entre homocisteína en suero, fibrinógeno, proteína C reactiva, lipoproteína(a), ácido úrico, metalopeptidasa 9 de matriz (MMP-9), inhibidor-1 de activador de plasminógeno (PAI-1) o su antígeno, activador de plasminógeno de tejido (tPA), TNF alfa, IL-6, P-selectina, proteína-quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), ligando de CD40 soluble (sCD40L), molécula de adhesión inter-celular 1 (ICAM-1), mieloperoxidasa (MPO), adiponectina, leptina, fosfolipasa asociada a lipoproteína A, e insulina.

40 **12.** La composición oral de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10: (a) para uso en la profilaxis o el tratamiento de la aterosclerosis o de un trastorno degenerativo provocado por la aterosclerosis en un animal, opcionalmente en donde el trastorno degenerativo comprende enfermedad cerebrovascular, apoplejía, enfermedad vascular, enfermedad arterial coronaria, infarto de miocardio, trombosis, angina, angina inestable, claudicación intermitente, ataque isquémico transitorio o fallo renal; (b) para uso en la reducción de la grasa corporal total o para tratar la obesidad o la pre-obesidad en un animal; (c) para uso en la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad o trastorno metabólico en un animal, opcionalmente en donde la enfermedad o trastorno metabólico comprenden hiperlipidemia, hiperglucemia, hiperlipoproteinemia, tolerancia a la glucosa alterada (IGT), resistencia a insulina, pre-diabetes, diabetes de tipo I, diabetes de tipo II o síndrome metabólico, o (d) para uso en la profilaxis o el tratamiento de una

- 5 enfermedad o trastorno hepático asociado a concentraciones elevadas de lípidos y triglicéridos en suero o en el hígado, inflamación hepática, enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD), enfermedad de hígado graso alcohólico (AFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), cirrosis hepática, esteatosis hepática, fibrosis hepática, niveles en suero anormalmente elevados de ALT, AST, GGT o Alk-P, virus de Epstein-Barr, hepatitis, hepatitis autoinmune, enfermedad granulomatosa hepática, colangitis, cáncer hepatocelular, colangiocarcinoma o enfermedad hepática metabólica en un animal.
- 10 **13.** Un proceso para preparar una bacteria con elevada actividad BSH como se ha definido en la reivindicación 1, que comprende cultivar la bacteria productora de BSH en un medio que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, y un pH de 4 a 7, y recolectar las bacterias después de 12 a 24 horas, opcionalmente 12-16 horas, en donde el medio comprende además cisteína; en donde la fuente de carbono comprende maltosa, sacarosa, dextrina, una combinación de sorbitol y glucosa o una combinación de inulina y glucosa; y en donde la fuente de nitrógeno comprende (i) extracto de levadura y extracto de malta, extracto de levadura y extracto vacuno, o hidrolisato de caseína y extracto de malta; y (ii) peptona, opcionalmente peptona nº 3, o triptona.
- 15 **14.** El proceso de la reivindicación 13, que además comprende liofilizar la bacteria libre o microencapsulada con lioprotectores, en donde los lioprotectores comprenden (a) de 0,2 a 10% de maltodextrina y de 0,05 a 0,33% de extracto de levadura, (b) de 0,05 a 2,5% de inulina y de 0,05 a 0,1% de extracto de levadura, o (c) 0,3% de inulina.
- 20 **15.** El proceso de la reivindicación 13, que además comprende almacenar la bacteria de elevada actividad BSH libre o microencapsulada en condiciones de almacenamiento líquido, en donde las condiciones de almacenamiento líquido comprenden una disolución conservante final que comprende 2,5-10% de medio de crecimiento, 50-99,99% de yogur u otro lácteo fermentado, 50-99,99% de sobrenadante de cultivo o 5% de disolución MRS.
- 25 **16.** El proceso de la reivindicación 13, que además comprende congelar espontáneamente la composición y la disolución crioprotectora a al menos -80 grados Celsius, en donde la disolución crioprotectora comprende una concentración final de (a) 0,2-10% de maltodextrina y de 0,05 a 0,33% de extracto de levadura, (b) de 0,05 a 2,5% de inulina, (c) Trehalosa 0,5M, (d) fructosa 0,5M, (d) lactosa 0,5M, (f) maltosa 0,5M o (g) 50-99,99% de medio agotado.

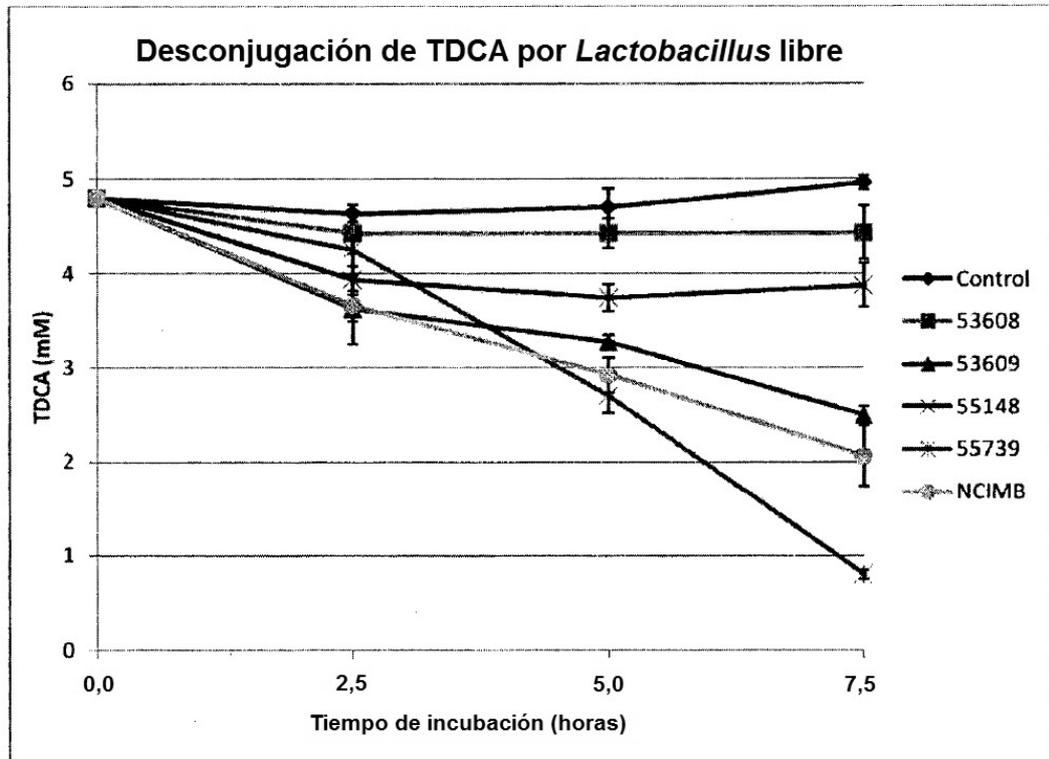


Figura 1

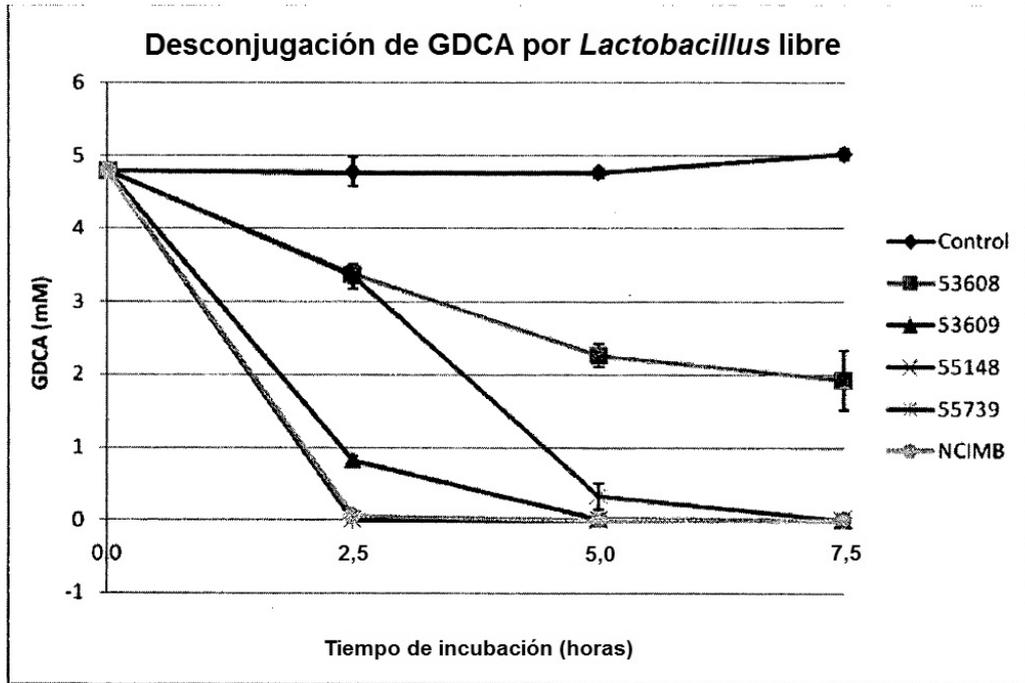


Figura 2

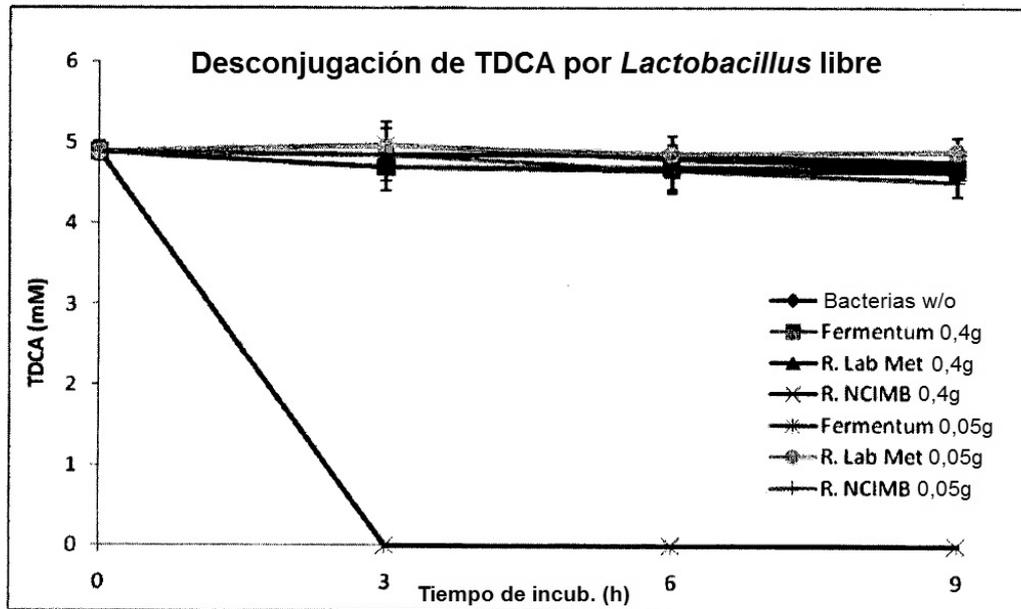


Figura 3

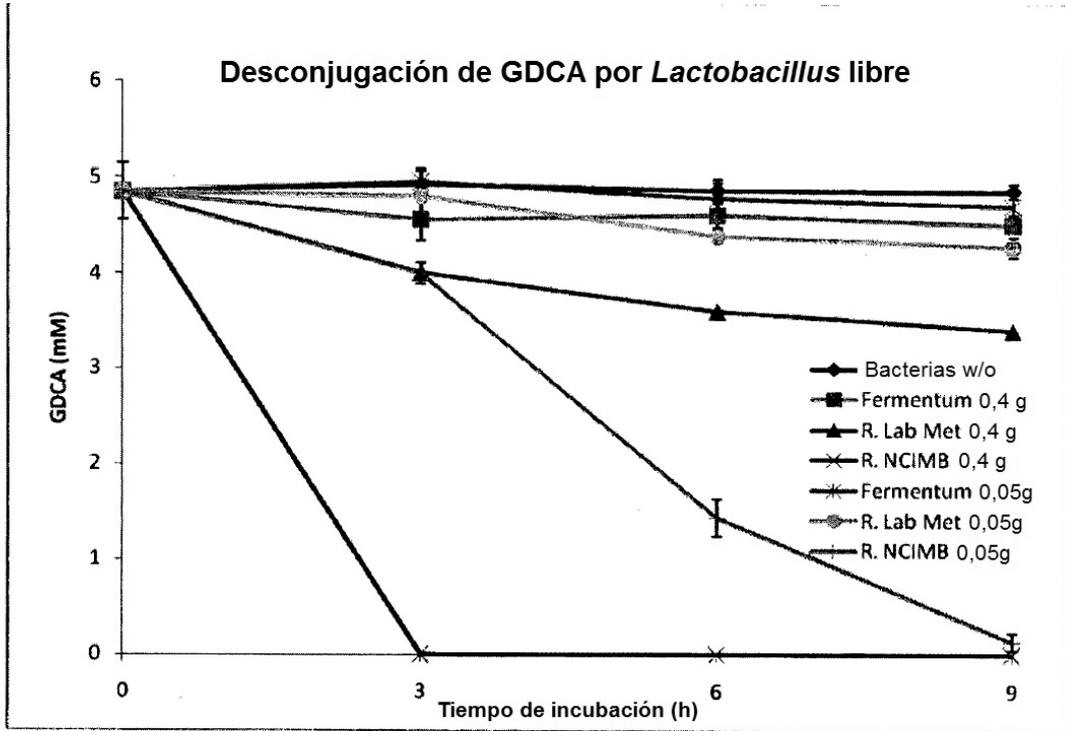


Figura 4

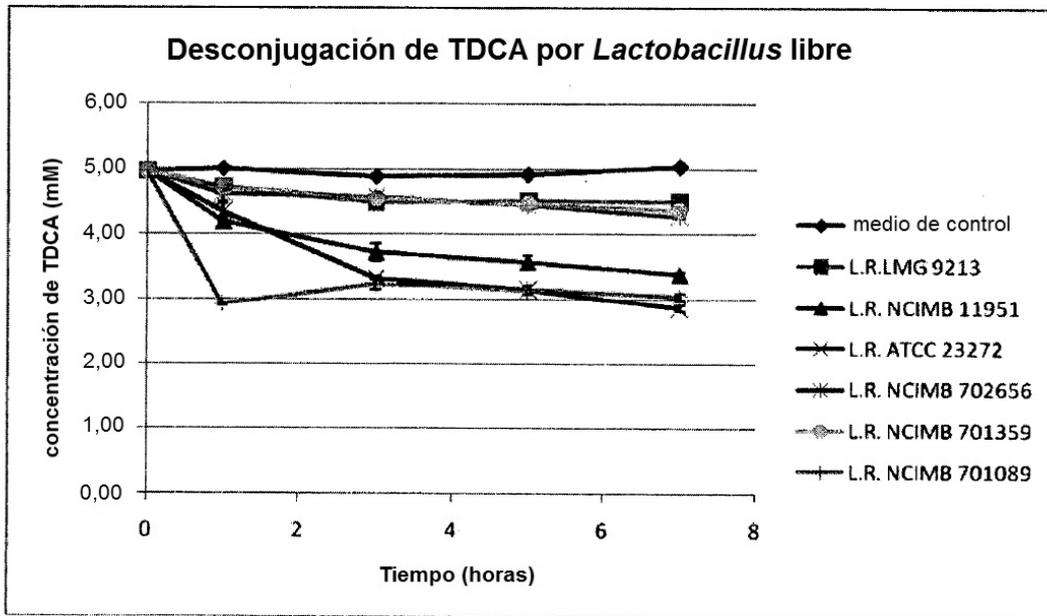


Figura 5

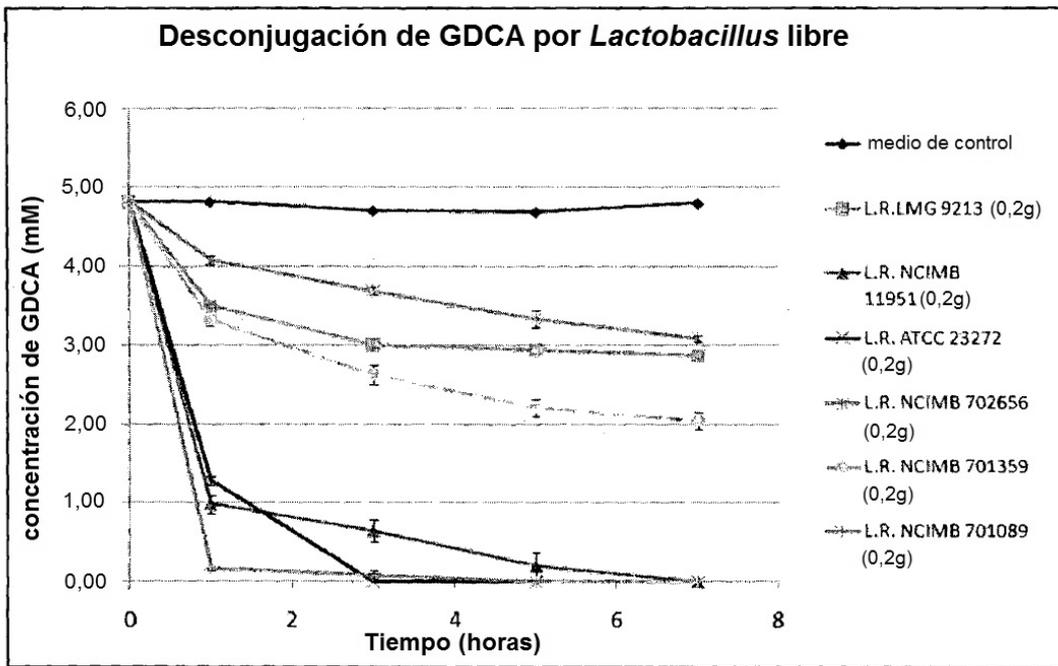


Figura 6

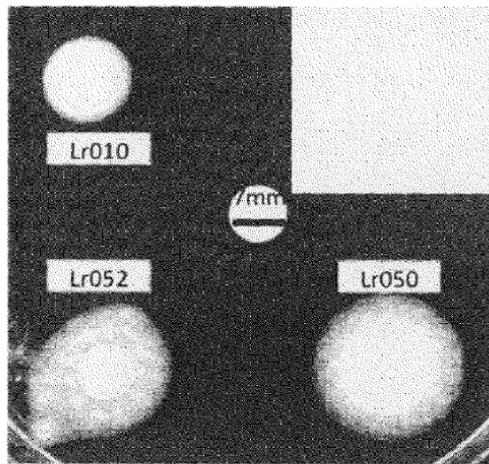


Figura 7

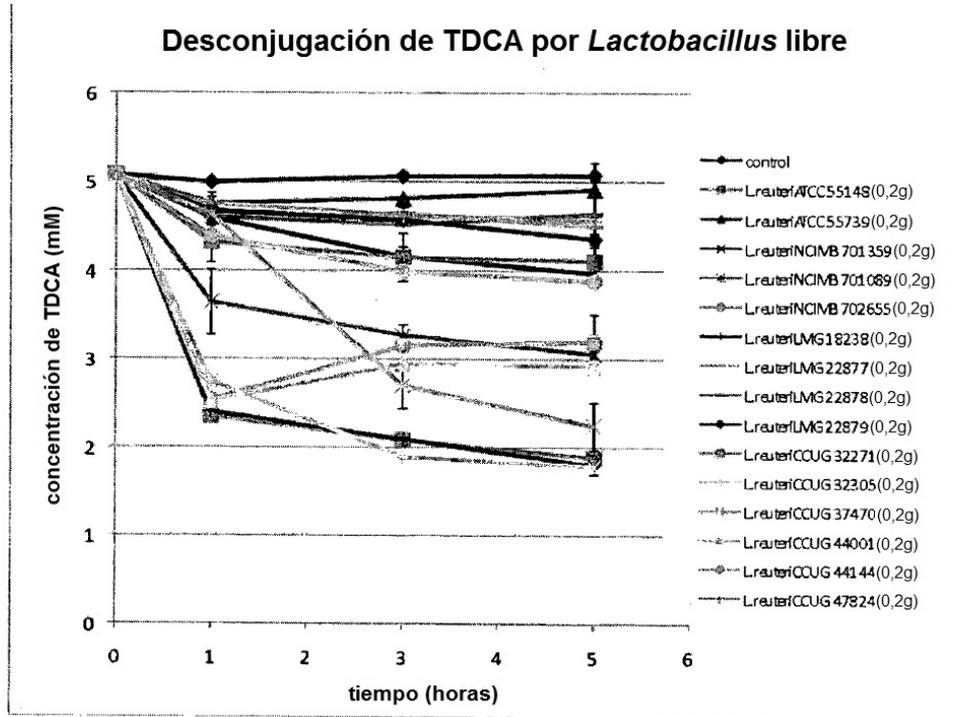


Figura 8

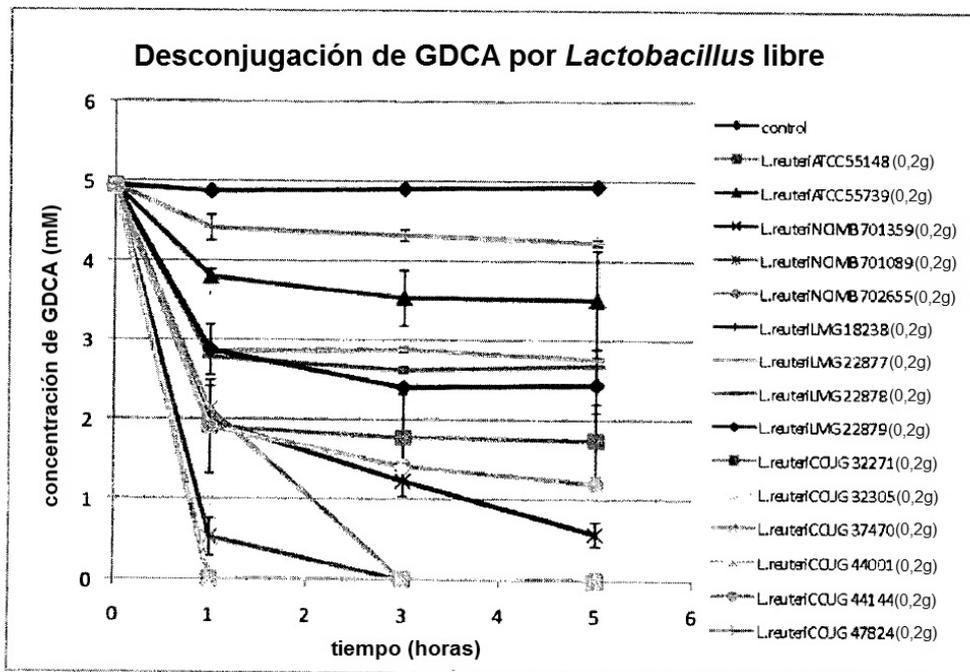


Figura 9

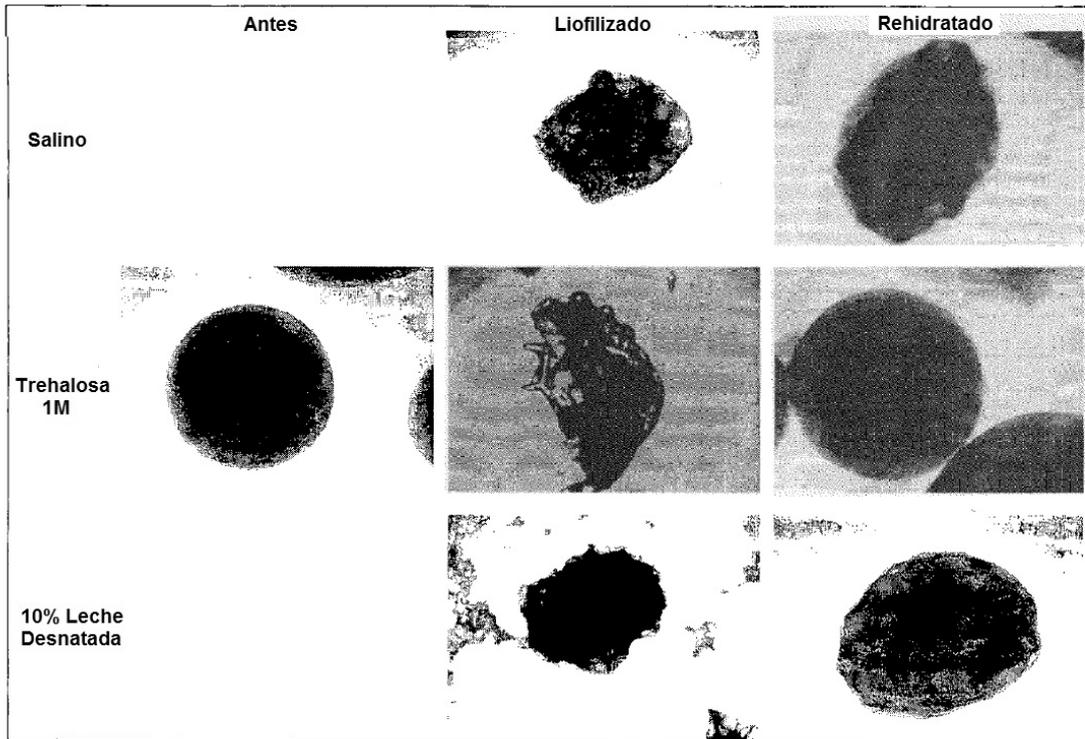


Figura 10