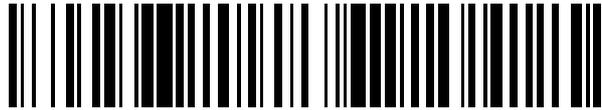


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 758**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61K 35/745** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2009 PCT/EP2009/054221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO09138300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2009 E 09745633 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2276498**

54 Título: **Uso de bacterias probióticas para el tratamiento de la hiperhomocisteinemia**

30 Prioridad:

**16.05.2008 IT MI20080898**

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

**12.04.2017**

73 Titular/es:

**PROBIOTICAL S.P.A. (100.0%)**

**Via Mattei 3**

**28100 Novara (NO), IT**

72 Inventor/es:

**MOGNA, GIOVANNI y**

**STROZZI, GIAN PAOLO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 608 758 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## USO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA

- 5 La presente invención se refiere a una composición que comprende bacterias probióticas particulares y al menos una vitamina seleccionada del grupo que comprende el grupo B de vitaminas, para uso en el tratamiento de la hiperhomocisteinemia en plasma.
- En Italia y en todos los países desarrollados, ciertas enfermedades del metabolismo van rápidamente en aumento, tales como obesidad, diabetes, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares y enfermedades sistémicas degenerativas y neurodegenerativas.
- 10 Adicionalmente a la predisposición genética, factores desencadenantes se encuentran en los regímenes alimentarios y estilos de vida de las sociedades "avanzadas", que implican un alto consumo de grasas saturadas y alimentos refinados, una baja ingesta de fibras solubles e insolubles, hábitos sedentarios, humo, contaminación ambiental y, en general, condiciones de vida estresantes.
- En un sentido estadístico, una persona afectada por una enfermedad metabólica no solamente tiene una menor esperanza de vida, sino también una peor calidad de vida.
- 15 Algunas de estas enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, están destinadas a seguir incrementándose en paralelo al aumento de la esperanza de vida de la población. Este fenómeno ya constituye un importante coste social y económico no solamente para las familias de los pacientes, sino también para los servicios nacionales de salud.
- 20 En el caso de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, la comunidad científica ha recalcado la existencia de un parámetro de alerta, la homocisteína, de la cual una alta concentración en la sangre constituye un factor de riesgo demostrado de apoplejía, patología arterial oclusiva, trombosis venosa, enfermedad cardiovascular aterosclerótica y probablemente de enfermedad de Alzheimer y demencias vasculares. Altas concentraciones de homocisteína en la mayoría de los casos han de atribuirse a una deficiencia nutricional resultante de una dieta desequilibrada y/o incompleta.
- 25 Por lo tanto, se mantiene la necesidad de ocuparse de las patologías resultantes de altas concentraciones de homocisteína en plasma, con el fin de mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por enfermedades metabólicas, tal como la hiperhomocisteinemia.
- En particular, se mantiene una necesidad de reducir la concentración de homocisteína en plasma, la cual es responsable de enfermedades graves y afecciones patológicas.
- 30 Finalmente, se mantiene la necesidad de tener disponible una formulación diseñada para reducir las altas concentraciones de homocisteína en el plasma.
- WO 2006/013588 A describe cepas bacterianas productoras de ácido fólico pertenecientes al género *Bifidobacterium*, así como formulaciones farmacéuticas, veterinarias o dietéticas de las mismas. En particular, están divulgadas nuevas cepas de *Bifidobacterium* de origen humano, pertenecientes a la especie *adolescentis*, la especie *breve* y la especie *pseudocatenulatum*.
- 35 Taki Kentaro et al. (Journal of Renal Nutrition, 2005, vol. 15(1), pp. 77-80) han reportado que la administración oral de *Bifidobacterium longum* en una cápsula gastroresistente sin junta a pacientes de hemodiálisis (HD) es eficaz para disminuir los niveles séricos pre-HD de homocisteína, sulfato de indoxilo, y triglicéridos. La reducción de homocisteína en el nivel sérico se atribuye a la provisión de folato producido por *Bifidobacterium longum* en los intestinos humanos.
- 40 Un estudio que ilustra los diferentes niveles de producción de folato por diferentes microorganismos, incluyendo *B. infantis*, *B. brevis* y *B. pseudocatenulatum*, se ha reportado en "Communicating Current Research and Trends in Applied Microbiology", 2007, Editado por A. Mendez-Vilas, publicado por Formatex, ISBN 978-84-611-9422-3).
- 45 El Solicitante ha seleccionado una serie de cepas de bacterias capaces de proporcionar una respuesta válida a las necesidades presentes en el estado de la técnica.
- Un aspecto de la presente invención se refiere a una composición para suplementos dietéticos que comprende: (i) al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352, y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353, y (ii) al menos una vitamina seleccionada del grupo B de vitaminas, para uso en el tratamiento de la hiperhomocisteinemia en plasma.
- 50

Otro aspecto de la presente invención está relacionada con el uso de al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352, y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353, y al menos una vitamina seleccionada del grupo B de vitaminas, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la hiperhomocisteinemia en plasma.

El Solicitante ha encontrado que la combinación de al menos una cepa de bacterias particular seleccionada, con al menos una vitamina seleccionada del grupo que comprende el grupo B de vitaminas es capaz de reducir y normalizar los niveles de hiperhomocisteinemia en plasma.

La asociación de una vitamina, seleccionada del grupo que comprende el grupo B de vitaminas (vitaminas inmediatamente disponibles para el organismo) y ácido fólico producido *in situ* por las cepas de bacterias seleccionadas, garantiza una mayor eficacia en la reducción y normalización de los niveles de homocisteína en plasma.

Otras realizaciones preferidas de la presente invención se citan a continuación y se reivindican en las reivindicaciones dependientes adjuntas.

En el contexto de la presente invención, ácido fólico y folatos a menudo se emplean como sinónimos, identificando una serie de compuestos que tienen una actividad vitamínica común y la misma fórmula química básica que comprende una molécula de ácido pterico y una o más moléculas de ácido glutámico (ácido fólico pteroilmonoglutamato o ácido fólico pteroilpoliglutamato).

El Solicitante ha aislado y caracterizado cepas productoras de ácido fólico pertenecientes a especies GRAS (generalmente reconocidas como seguras). El Solicitante ha identificado y caracterizado ciertas cepas de *Bifidobacterium* capaces de producir ácido fólico "in vitro".

Estudio "in vitro"

La detección y determinación cuantitativa del ácido fólico producido por las cepas bajo examen se realizaron por medio de un ensayo microbiológico, evaluando turbidimétricamente el desarrollo de otras especies bacterianas (tales como *Enterococcus hirae* ATCC 8043), cuyo crecimiento es una función de la cantidad de ácido fólico presente en el medio de cultivo empleado.

A partir de esta primera fase del trabajo, se identificaron 9 cepas de bacterias capaces de producir ácido fólico y se depositaron por el Solicitante en la Colección Internacional DSMZ en Alemania.

Bacteria	Depositada en el Instituto	Número de Depósito	Fecha de depósito	Propietario
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 03	DSMZ	DSM 16594	21.07.2004	Probiotal S.p.A.
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> BA 04	DSMZ	DSM 16595	21.07.2004	Probiotal S.p.A.
<i>Bifidobacterium breve</i> BR 04	DSMZ	DSM 16596	21.07.2004	Probiotal S.p.A.
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> BP 01	DSMZ	DSM 16597	21.07.2004	Probiotal S.p.A.
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> BP 02	DSMZ	DSM 16598	21.07.2004	Probiotal S.p.A.
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI 3	DSMZ	DSM 18350	15.06.2006	Probiotal S.p.A.
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> EI 18	DSMZ	DSM 18352	15.06.2006	Probiotal S.p.A.
<i>Bifidobacterium catenulatum</i> EI 20	DSMZ	DSM 18353	15.06.2006	Probiotal S.p.A.

## ES 2 608 758 T3

<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> B 660	DSMZ	DSM 21444	13.05.2008	Probiotal S.p.a.
--	------	--------------	------------	---------------------

5 Para la cepa DSM 21444 las condiciones de cultivo son como sigue: el medio - TPY - tripticasa 10 g/l, fitona 5 g/l, extracto de levadura 5 g/l, glucosa 10 g/l, tween 80 1 ml/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l, MgCl<sub>2</sub> 0,5 g/l, ZnSO<sub>4</sub> 0,25 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0,15 g/l, hidrocloreuro de L-cisteína 1-hidrato 0,5 g/l. La esterilización se lleva a cabo durante 15 minutos a 121 °C a un pH inicial de 7,10 ± 0,1 y un pH final de 6,6. Temperatura de incubación 37 °C durante un tiempo de 17±1 horas. Las condiciones de almacenamiento a largo plazo son a -25 °C. El crecimiento se lleva a cabo en condiciones anaerobias forzadas en un medio de cultivo TPY a 37 °C. La cepa gram-positiva es anaerobia y se presenta como bastones de varias formas. No consumidora de ácido, no formadora de esporas y no móvil. La glucosa presente en el medio se degrada exclusivamente por la vía metabólica (shunt) de la fructosa-6-fosfato.

10 Las cepas anteriormente mencionadas fueron entonces comprobadas con respecto a la estabilidad genotípica y fenotípica, la ausencia de resistencias a antibióticos adquiridas y/o transmisibles, la resistencia a los jugos gástricos, la secreción pancreática y sales biliares, y la viabilidad de la producción de cada cepa a una escala industrial.

15 Las cepas anteriormente mencionadas son productoras de ácido fólico fácilmente asimilable por los enterocitos, ya que se compone de un número limitado de residuos glutámicos (1, 2 y 3 moléculas de ácido glutámico).

20 La cantidad promedio de ácido fólico que son capaces de producir las cepas en 48 horas en el medio de cultivo es de aproximadamente 10 a más de 100 ng/ml, preferiblemente de 25 a 100 ng/ml, incluso más preferiblemente de 40 a 85 ng/ml. La producción de ácido fólico también sucede en cultivos fecales mixtos, lo que demuestra que se produce a nivel del colon en presencia de una microbiota compleja, a menudo formada por más de 1.000 especies diferentes pertenecientes a diferentes géneros y/o familias: *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Bacterioides*, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Fusobacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Propionibacterium*, *Micrococcaceae*, *Staphilococcaceae*.

25

### Estudio en un modelo animal

30 El solicitante también ha llevado a cabo un estudio *in vivo* con ratas Wistar. Estas ratas se han mantenido con una dieta controlada, totalmente libre de folatos. El objetivo del estudio *in vivo* era inducir una deficiencia y, al mismo tiempo, comprobar si la administración de las cepas de Bifidobacterias productoras de ácido fólico anteriormente referidas era capaz de aumentar la cantidad de ácido fólico/folatos en las ratas. Los animales se dividieron en 4 grupos y se alimentaron según la tabla:

Grupo 1 Control	Dieta libre de folatos
Grupo 2 PRO	Dieta suplementada con una mezcla de 3 cepas de bacterias productoras de ácido fólico (DSM 18350, DSM 18352, DSM 18353)
Grupo 3 PRE	Dieta suplementada con fructooligosacáridos (FOS)
Grupo 4 SYM	Dieta suplementada con una mezcla de DSM 18350, DSM 18352, DSM 18353 y fructooligosacáridos (FOS)

35 Los 4 grupos fueron alimentados con la misma dieta libre de folatos durante el período completo del estudio. La dieta de Grupo 2 (PRO) se suplementó con una mezcla de 3 cepas probióticas productoras de ácido fólico (DSM 18350, DSM 18352 y DSM 18353), a razón de 2x10<sup>8</sup> células por cepa por día; Grupo 3 (PRE) se alimentó con una cantidad de fructooligosacáridos (FOS) igual a 10 gramos/litro de agua; Grupo 4 (SYM) se alimentó tanto con las 3 cepas de probióticos y los FOS en una cantidad igual a la que se describió anteriormente para el Grupo 2 y el Grupo 3. Las cepas se administraron en una proporción de 1:1:1 con una dosis de 2x10<sup>8</sup> células por cepa por día.

40 Después de 14 días se sacrificaron las ratas y se analizaron las muestras de sangre y las muestras de biopsia. El ácido fólico se determinó empleando un método biológico, mucho más sensible y preciso,

## ES 2 608 758 T3

basado en el uso del micro-organismo de ensayo *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus* ATCC 7469. A partir de los datos presentes en la literatura, este microorganismo es capaz de crecer solamente en presencia de folatos, concretamente ácido fólico, tanto en su estado nativo como en formas reducidas de diversas maneras, tales como ácido dihidrofólico (DHF), ácido tetrahidrofólico (THF) y sus derivados metilados o formilados. La cepa utiliza de manera eficaz las formas monoglutamato y, en menor medida, también las formas di- y tri-glutamato. Se demostró una ligera sensibilidad, sin embargo, hacia las formas poliglutamato. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Concentración de ácido fólico encontrada después de 14 días de alimentación diferenciada

Concentración de ácido fólico encontrada después de 14 días de alimentación diferenciada			
Grupo	Plasma (ng/ml)	Hígado (mcg/g)	Riñones (mcg/g)
1) Control	2,39	1,09	0,71
2) PRO	5,73	1,27	0,67
3) PRE	5,85	1,23	0,71
4) SYM	9,90	1,58	0,77

- 10 Los valores reportados representan el promedio de aquellos obtenidos para los animales individuales que constituyen un grupo.

La concentración plasmática de ácido fólico se incrementó en más de 2 veces para el Grupo (2) PRO y en más de 4 veces para el Grupo (4) SYM. En este último caso, la importancia de la fibra prebiótica es evidente, como fuente de energía para las cepas empleadas.

- 15 En conclusión, los estudios realizados con el modelo animal demostraron que las cepas son capaces de colonizar los intestinos de ratas en un tiempo corto, y sintetizar vitamina B9 en cantidades tales como para provocar que sea absorbida a través del epitelio intestinal y posteriormente distribuida por vía del plasma, acumulándose en el hígado, el órgano designado también con esta función en el humano.

- 20 El Solicitante también ha llevado a cabo un estudio "in vivo" para evaluar la capacidad de las tres cepas probióticas que pertenecen a las dos especies *Bifidobacterium adolescentis* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* para producir folatos en el entorno intestinal humano. La evaluación se realizó por medio de un estudio randomizado que comprende un total de 23 sujetos sanos que habían seguido una dieta variada promedio. En particular, se dividieron los sujetos en tres grupos:

- 25 Grupo A (5 sujetos) se trató con la cepa probiótica *Bifidobacterium adolescentis* DSM 18350, administrada en una cantidad de  $5 \times 10^9$  UFC/día;

Grupo B (13 sujetos) se trató con la cepa probiótica *Bifidobacterium adolescentis* DSM 18352, administrada en una cantidad de  $5 \times 10^9$  UFC/día; y

Grupo C (5 sujetos) tomó la cepa *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 18353 en una cantidad de  $5 \times 10^9$  UFC/día;

- 30 La capacidad de las cepas de colonizar el intestino y producir ácido fólico se evaluó comparando tanto el número de microorganismos que pertenecen al género *Bifidobacterium* como la cantidad de folatos presente en las heces evacuadas a lo largo de un período de 48 horas, antes y después del tratamiento con las cepas probióticas.

- 35 Como un preámbulo, se llevó a cabo una investigación observacional de los hábitos alimentarios de los sujetos que tomaron parte en el estudio, con especial referencia al consumo de alimentos ricos en folatos. Después se determinó el valor base para la concentración de ácido fólico/g de heces y se realizó un cálculo de la cantidad total de vitamina excretada en 48 horas. En el momento del inicio del tratamiento se pidió a los sujetos que mantuvieran sin cambios su régimen dietético en la medida de lo posible, a fin de no alterar el aporte de ácido fólico exógeno.

- 40 Después de 30 días de la administración de las cepas probióticas, se analizó la nueva concentración de ácido fólico en las heces, recalculando la cantidad total de vitamina excretada en 48 horas. La diferencia entre los dos valores (d30 - d0) se debe a la producción de ácido fólico endógeno por las cepas de *Bifidobacterium* que colonizaron el intestino.

## ES 2 608 758 T3

La cuantificación de la vitamina se efectuó empleando el mismo protocolo que se había adoptado para el estudio en el modelo animal anteriormente mencionado, donde se empleó *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 como el organismo de ensayo.

5 La siguiente tabla muestra las cantidades promedio de ácido fólico excretado con las heces a lo largo de un período de 24 horas en los tres grupos:

Cantidad promedio de ácido fólico excretada con las heces durante un periodo de 24 horas				
Grupo	d <sub>0</sub>	D <sub>30</sub>	d <sub>30</sub> -d <sub>0</sub>	p
A	98,6 ± 25,1	167,0 ± 28,3	68,4 ± 38,5	0,004
B	121,9 ± 31,5	202,2 ± 39,1	80,3 ± 28,7	<0,001
C	105,2 ± 32,3	155,4 ± 35,9	50,2 ± 30,5	0,049

10 Los resultados demuestran que ingerir cepas probióticas específicas capaces de producir ácido fólico ha mediado un aumento estadísticamente significativo en la concentración de esta vitamina incluso en las heces de todos los grupos tratados, especialmente aquellos pertenecientes al Grupo B. La evaluación numérica de las Bifidobacterias presentes en las heces ha confirmado el potencial de todas las cepas para colonizar el entorno intestinal, especialmente en lo que respecta *B. adolescentis* DSM 18352.

15 Los estudios realizados demuestran la capacidad efectiva de las cepas de bacterias aquí descritas para sintetizar y secretar folatos incluyendo en el entorno intestinal humano, confirmando que una preparación sobre la base de estas cepas podría representar una fuente complementaria endógena de vitamina B9, lo cual es particularmente útil para la homeostasis de los enterocitos de la mucosa del colon y para asegurar la biodisponibilidad constante de la vitamina, en contraste con lo que ocurre cuando ésta se toma por vía oral.

20 En este sentido, la invención se refiere a una composición para suplementos dietéticos que comprende: (i) al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352, y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353, y (ii) al menos una vitamina seleccionada del grupo B de vitaminas, para uso en el tratamiento de la hiperhomocisteinemia en plasma.

25 La composición para uso de acuerdo con la invención puede comprender *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352 y al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 16594, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 16595, *Bifidobacterium breve* No. DSM 16596, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* No. DSM 16597, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 16598, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* No. DSM 21444.

30 La composición para uso de acuerdo con la invención puede comprender *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352, y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353.

En una realización preferida, el grupo B de vitaminas se selecciona del grupo que comprende vitamina B2 (riboflavina 5-fosfato de sodio), vitamina B6 (hidrocloruro de piridoxina), vitamina B9 (ácido fólico) y vitamina B12 (cianocobalamina).

35 La composición para uso de acuerdo con la invención puede comprender al menos una fibra prebiótica conocida por los expertos en el campo, tales como, por ejemplo, inulina, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos, glucooligosacáridos, xilooligosacáridos, arabinogalactana, glucomananos, galactomananos y/o sus combinaciones. En una realización preferida, la fibra prebiótica es una con actividad bifidogénica prebiótica seleccionada de inulina y fructooligosacáridos (FOS). La inulina puede tener un grado de polimerización (GP) de entre 9 y 12 y los FOS pueden tener un GP de entre 2 y 4. La fibra prebiótica puede estar presente en una cantidad suficiente para asegurar una colonización rápida y continua por las cepas de bacterias presentes.

45 Ambas fibras anteriormente mencionadas pertenecen a la clase de fructanos, polisacáridos que consisten de mezclas de polímeros lineales de fructosa con varios grados de polimerización, que tienen una unidad de glucosa en posición terminal.

La composición para uso de acuerdo con la invención puede comprender al menos un elemento esencial seleccionado del grupo que comprende zinc y selenio. El zinc puede provenir de una sal orgánica, tal

## ES 2 608 758 T3

como gluconato de zinc, o de una levadura o una bacteria capaz de internalizar el zinc. El selenio puede provenir de una sal orgánica tal como gluconato de selenio o de una levadura o una bacteria capaz de internalizar el selenio.

- 5 El Solicitante ha encontrado que la presencia de un complejo vitamínico del grupo B, en forma inmediatamente disponible, capaz de suministrar todas las vitaminas y elementos que presiden directa o indirectamente el ciclo de homocisteína, permite el tratamiento de hiperhomocisteinemia.

La composición para uso de acuerdo con la presente invención puede comprender de 0,1 a  $100 \times 10^9$  UFC/dosis de bacterias y de 0,1 a 10 UFC/dosis de fibra(s) prebiótica(s). La una o más vitaminas del grupo B pueden estar presentes cada una en cantidades que varían del 5 al 100% de la CDR.

- 10 El ácido fólico producido por las bacterias, junto con el grupo B de vitaminas presente en la composición, contribuyen para regular la concentración de homocisteína, la cual es responsable del incremento en el riesgo de aparición de numerosas patologías graves.

- 15 Una realización preferida de la presente invención es en la forma de un suplemento dietético que comprende al menos una del grupo B de vitaminas capaz de garantizar, de forma inmediatamente disponible, una cantidad igual al 50% de la CDR (Cantidad Diaria Recomendada) de todas las vitaminas y elementos que presiden directa o indirectamente el ciclo de homocisteína.

- 20 La eficacia del suplemento anteriormente mencionado se manifiesta tanto a nivel intestinal tópico, gracias al trofismo inducido por el ácido fólico secretado por las bacterias de las cepas, en particular por *B. adolescentis* DSM 18352, sobre los enterocitos del colon, y a nivel sistémico, a través de la disminución de la concentración plasmática de homocisteína, debido a la metilación provocada por 5-metiltetrahidrofolato.

La formulación del suplemento anteriormente mencionado tiene las siguientes ventajas.

- 25 1A) Rápida disminución de la concentración de homocisteína en la sangre gracias al componente de vitamina B, presente en una cantidad adecuada (50% CDR) y de forma inmediatamente biodisponible. En particular, 5-metiltetrahidrofolato representa un tipo de ácido fólico utilizable incluso por individuos deficientes en L-glutamyl-transferasa y folato/deshidrofolato-reductasa.

1B) Normalización de los niveles plasmáticos base de la homocisteína gracias a la síntesis de ácido fólico efectuada en el colon por las cepas de bacterias presentes, las cuales logran colonizar los diferentes segmentos intestinales gracias a la acción bifidogénica de las diversas fibras prebióticas presentes.

- 30 El mecanismo de síntesis permite alcanzar concentraciones significativas, en el lumen intestinal, de vitamina B9, la cual, al estar compuesta de formas con un número limitado de residuos glutamilo, puede entrar en los enterocitos, no solamente por medio de transporte activo, sino también por difusión pasiva a través de la membrana basolateral.

- 35 La aportación constante de ácido fólico endógeno, metabolizado a través de las mismas vías que el ácido fólico exógeno, asegura una suplementación continua de folatos a nivel sistémico, normalizando así la concentración plasmática de homocisteína.

En consecuencia, hay una reducción en el riesgo de la aparición de patologías graves, tales como arteriosclerosis, apoplejía, infarto cardíaco y enfermedades neurodegenerativas de gran importancia social, tales como demencia vascular, depresión senil y enfermedad de Alzheimer.

- 40 Ejemplo no limitante de una formulación de un suplemento que es un objeto de la presente invención.

Suplemento	Mg / paquete	% CDR
Mezcla de DSM 18350, DSM 18352, DSM 18353	250	n.a.
Inulina	2.000	n.a.
FOS	1.000	n.a.
Vitamina B9	0,10	50%
Vitamina B6	1	50%
Vitamina B2	0,80	50%
Vitamina B12	0,001	50%

## ES 2 608 758 T3

Gluconato de zinc	52	50%
-------------------	----	-----

5 La presencia de vitamina B<sub>9</sub>, en cantidades iguales al 50% de la CDR, inmediatamente garantiza una cantidad efectiva en la reducción del riesgo de aparición de patologías graves. La producción de cantidades biológicamente significativas de ácido fólico por las cepas probióticas comienza solamente después de 10-15 días, debido a que las cepas necesitan este lapso de tiempo para multiplicarse y colonizar el intestino. Solamente cuando su población pasa de un umbral particular, la producción de vitamina se convierte en significativa e importante, garantizando una aportación continua, independiente de la cantidad ingerida con la alimentación.

10 Las cepas de bacterias descritas en este documento, en particular las cepas DSM 18350, 18352 y 18353, han sido seleccionadas por su capacidad para producir ácido fólico.

Composición 1	Mg / paquete	% CDR
Cepa DSM 18352	250	-
Inulina	2.000	-
FOS	1.000	-
Hidrocloruro de piridoxina (Vitamina B <sub>6</sub> )	1	50
Riboflavina 5- fosfato sódico (Vitamina B <sub>2</sub> )	0,8	50
Cianocobalamina (Vitamina B <sub>12</sub> )	0,001	50
5-metiltetrahydrofolato (ácido fólico - Vitamina B <sub>9</sub> )	0,10	50
Gluconato de zinc	52	50
Sorbitol E420	2.000	-
Aroma natural de vainilla	300	-
Fibra insoluble	189	-
Acido cítrico	20	-
Sucralosa E955	5	-
TOTAL	5.818	

Composición 2	Mg / paquete	% CDR
Cepa DSM 18352	250	-
Inulina	2.000	-
FOS	1.000	-
Hidrocloruro de piridoxina (vitamina B <sub>6</sub> )	1	50
Riboflavina 5 - fosfato sódico (Vitamina B <sub>2</sub> )	0,8	50
Cianocobalamina (Vitamina B <sub>12</sub> )	0,001	50
5-metiltetrahydrofolato (ácido fólico - Vitamina B <sub>9</sub> )	0,10	50
Gluconato de zinc	52	50
Sorbitol E420	500	-
Aroma natural de grosella negra	500	-
Fibra insoluble	139	-
Acido cítrico	20	-
Zanahoria negra	100	
Sucralosa E955	10	-
TOTAL	4.573	

## ES 2 608 758 T3

Composición 3	Mg / paquete	% CDR
Mezcla de DSM 18350, DSM 18352, DSM 18353	300	-
Inulina	2.000	-
FOS	1.000	-
Hidrocloruro de piridoxina (vitamina B <sub>6</sub> )	1	50
Riboflavina 5 - fosfato sódico (Vitamina B <sub>2</sub> )	0,8	50
Cianocobalamina (Vitamina B <sub>12</sub> )	0,001	50
5-metiltetrahidrofolato (ácido fólico - Vitamina B <sub>9</sub> )	0,10	50
Gluconato de zinc	52	50
Sorbitol E420	500	-
Fibra insoluble	129	
Saborizante de manzana	100	-
Ácido cítrico	20	-
Sucralosa E955	5	-
TOTAL	5.008	

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición para suplementos dietéticos que comprende:
  - (i) al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352, y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353, y
  - (ii) al menos una vitamina seleccionada del grupo B de vitaminas, para uso en el tratamiento de hiperhomocisteinemia en plasma.
2. La composición para uso según la reivindicación 1, donde dicha composición comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352 y al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 16594, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 16595, *Bifidobacterium breve* No. DSM 16596, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* No. DSM 16597, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 16598, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* No. DSM 21444.
3. La composición para uso según la reivindicación 2, donde dicha composición comprende dichos *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352 y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353.
4. La composición para uso según la reivindicación 3, donde dicha composición comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352.
5. La composición para uso según una de las reivindicaciones 1-4, donde la vitamina se selecciona del grupo que comprende vitamina B2 (riboflavina 5-fosfato sódico), vitamina B6 (hidrocloruro de piridoxina), vitamina B9 (ácido fólico) y vitamina B12 (cianocobalamina).
6. La composición para uso según una de las reivindicaciones 1-5, donde dicha composición comprende además al menos una fibra con actividad bifidogénica prebiótica.
7. La composición para uso según la reivindicación 6, donde dicha fibra se selecciona del grupo que comprende inulina y fructooligosacáridos.
8. La composición para uso según la reivindicación 7, donde la inulina tiene un grado de polimerización de entre 9 y 12 y los fructooligosacáridos tienen un grado de polimerización de entre 2 y 4.
9. La composición para uso según una de las reivindicaciones 1-8, donde dicha composición comprende además al menos un elemento esencial seleccionado del grupo que comprende zinc y selenio.
10. La composición para uso según la reivindicación 9, donde el zinc proviene de una sal orgánica, tal como gluconato de zinc, o de una levadura o bacteria capaz de internalizar el zinc.
11. La composición para uso según la reivindicación 9, donde el selenio proviene de una sal orgánica, tal como gluconato de selenio, o de una levadura o bacteria capaz de internalizar el selenio.
12. Uso de al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352, y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353, y al menos una vitamina seleccionada del grupo B de vitaminas, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de hiperhomocisteinemia en plasma.
13. Uso según la reivindicación 12, donde dicha composición comprende la cepa bacteriana *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352 y al menos una cepa bacteriana seleccionada del grupo que comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 16594, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 16595, *Bifidobacterium breve* No. DSM 16596, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* No. DSM 16597, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* DSM 16598, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* No. DSM 21444.
14. Uso según la reivindicación 13, donde dicha composición comprende *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18350, *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18352 y *Bifidobacterium adolescentis* No. DSM 18353.