

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 969**

51 Int. Cl.:

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/IB2013/061216**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102692**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13824661 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2943210**

54 Título: **Lactobacillus fermentum ME-3 para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico**

30 Prioridad:

24.12.2012 GB 201223370

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF TARTU (100.0%)
Ülikooli 18
50090 Tartu, EE**

72 Inventor/es:

**KULLISAAR, TIJU;
ZILMER, MIHKEL;
SMIDT, IMBI;
ZILMER, KERSTI;
MIKELSAAR, MARIKA y
HÜTT, PIRJE**

74 Agente/Representante:

DIÉGUEZ GARBAYO, Pedro

Observaciones :

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

ES 2 649 969 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

Lactobacillus fermentum ME-3 para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico

La presente divulgación que comprende la invención pertenece a los campos de la medicina y la nutrición, en particular previniendo, aliviando los síntomas, tratando y/o proporcionando tratamiento adyuvante, por ejemplo, como componente adyuvante, para enfermedades inflamatorias tales como la enfermedad cardiovascular, el ictus y el síndrome metabólico. La divulgación que comprende la invención se refiere a composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 para su uso en la prevención, el alivio de los síntomas, el tratamiento y/o para proporcionar un tratamiento adyuvante para enfermedades inflamatorias y métodos de prevención, alivio de los síntomas, tratamiento y/o para proporcionar un tratamiento adyuvante para enfermedades inflamatorias usando composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3. Dichas enfermedades preferidas son afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (preferentemente seleccionadas entre prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular). Este efecto de las composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede conseguirse mediante la reducción del nivel de hemoglobina glucosilada (HbA1c), el aumento del nivel de adiponectina y/o la disminución del nivel de inflamación celular de grado bajo (reducción del nivel de proteína C reactiva de alta sensibilidad e interleucina 6 y aumento del nivel de interleucina 10).

Antecedentes de la invención

Los organismos probióticos son microorganismos vivos que son beneficiosas para el organismo hospedador. Se conocen en la técnica muchas especies y cepas de bacterias probióticas. Las bacterias del ácido láctico (LAB) y las bifidobacterias son los tipos más comunes de microbios utilizados como probióticos, pero también pueden usarse ciertas levaduras y bacilos. Los probióticos se consumen habitualmente como parte de alimentos fermentados con cultivos vivos activos añadidos especialmente, tales como en el yogur, el yogur de soja o como complementos dietéticos.

El *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241 se ha descrito anteriormente como un probiótico antioxidante (documento EP1401457). Se conocen en la técnica muchas otras especies y cepas de bacterias probióticas. Sin embargo, existen pocos estudios en los se hayan comparado los efectos de diferentes bacterias probióticas dentro del mismo entorno clínico. Las bacterias probióticas *in vivo* difieren en su capacidad para inducir cambios clínicamente relevantes en los sujetos. Algunos efectos son específicos de la cepa. Se han desvelado algunas bacterias que pueden poseer un efecto antiinflamatorio débil reflejado como una disminución en los niveles séricos de hsCRP en adultos sanos (Kekkonen et al., *World J Gastroenterol.* 2008; 14(13):2029-36). En general, solo existe evidencia preliminar de las reivindicaciones sanitarias indicadas para cualquier tipo de bacteria probiótica (Mikelsaar y Zilmer (2009) *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21:1-27). Algunas de las cepas que se comercializan actualmente se han desarrollado lo suficiente en investigación básica y clínica para justificar la aplicación del estado de reivindicación sanitaria a una agencia reguladora tal como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

Por tanto, sigue existiendo una necesidad urgente de identificar nuevas cepas de bacterias probióticas que puedan utilizarse en un entorno clínico y para prevenir, aliviar los síntomas, tratar y proporcionar tratamiento adyuvante, por ejemplo, como componente adyuvante para enfermedades inflamatorias. Dichas enfermedades preferidas son afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (preferentemente seleccionadas entre prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular).

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que el *Lactobacillus fermentum* ME-3, a diferencia de otros *Lactobacillus* sp. (Mikelsaar y Zilmer (2009) *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21: 1-27), es un inhibidor significativo de marcadores proinflamatorios, tales como la hemoglobina glucosilada HbA1c, la proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) y la IL-6, y también es capaz de estimular la producción del péptido antiinflamatorio y antidiabético adiponectina. En consecuencia, como resultado de identificar el mecanismo subyacente por el cual actúa la cepa probiótica *Lactobacillus fermentum* ME-3, los presentes inventores han descubierto que puede usarse para prevenir, aliviar los síntomas, tratar y/o usarse como tratamiento adyuvante, por ejemplo, como componente adyuvante para enfermedades inflamatorias y, en particular, afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (seleccionadas preferentemente entre prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular). Esto es particularmente sorprendente, ya que el *Lactobacillus fermentum* ME-3 se ha notificado anteriormente como probiótico antimicrobiano y antioxidante (documento EP1401457 y Mikelsaar y Zilmer (2009) *Microbial Ecology in Health and Disease*, 21: 1-27). La presente invención se define por las reivindicaciones. Por tanto, la invención proporciona una composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241, en la *Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* el 19/4/2001, para su uso en la prevención, el tratamiento y/o para proporcionar un tratamiento adyuvante, por ejemplo, como componente adyuvante, en afecciones relacionadas con el síndrome metabólico como se define en las reivindicaciones 1 y 2. Debido a su mecanismo de acción, el *Lactobacillus fermentum* ME-3 es particularmente útil en ciertas subpoblaciones de sujetos tales como sujetos

asintomáticos, incluyendo aquellas con grado bajo de inflamación, en riesgo de desarrollar una enfermedad inflamatoria, tal como la enfermedad cardiovascular (ECV), la diabetes de tipo 2 o el síndrome metabólico; y pacientes que han sufrido un ictus. Los presentes inventores también han descubierto que el *Lactobacillus fermentum* ME-3 también es particularmente beneficioso cuando se usa en combinación con una o más vitaminas y/o monocalina K.

Por tanto, la presente invención proporciona una composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3, para su uso en la prevención, el tratamiento y/o para proporcionar un tratamiento adyuvante (por ejemplo, como componente adyuvante), las afecciones relacionadas con el síndrome metabólico mediante uno o más de:

a. disminuir el nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c;
b. disminuir o prevenir la inflamación de grado bajo a nivel celular; y
c. aumentar el nivel de adiponectina, en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 2. La divulgación también proporciona *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241 para su uso en la fabricación de un medicamento y/o un medicamento adyuvante para la prevención, el alivio de los síntomas, el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante (por ejemplo, como componente adyuvante), para una enfermedad inflamatoria y, en particular, para afecciones relacionadas con síndrome metabólico, mediante uno o más de:

a. disminuir el nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c;
b. disminuir o prevenir la inflamación de grado bajo a nivel celular; y
c. aumentar el nivel de adiponectina

en un sujeto.

En todos los casos, como resultado del tratamiento con *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241, se producen todos de:

a. disminuir el nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c;
b. disminuir o prevenir la inflamación de grado bajo a nivel celular; y
c. aumentar el nivel de adiponectina. Estos se producen simultáneamente.

Por ejemplo, el tratamiento con *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241 puede dar como resultado la disminución del nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c y disminuir o prevenir la inflamación de grado bajo a nivel celular; disminuir el nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c y aumentar el nivel de adiponectina; o disminuir o prevenir la inflamación de grado bajo a nivel celular y aumentar el nivel de adiponectina. Preferentemente, estos se producen simultáneamente.

Hemoglobina glucosilada HbA1c

La inflamación, la inflamación crónica de grado bajo y la glucosilación de hemoglobina (Hb) no específica son algunos de los factores de riesgo más importantes de la prediabetes, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. En general, el intervalo de referencia, que se encuentra en sujetos sanos, es de aproximadamente 20-40 mmol/mol (4 %-5,9 % de hemoglobina glucosilada) ("Ensayo de hemoglobina A1c". MedicineNet.com). La glucosilación anormal de Hb, que puede definirse como un nivel de hemoglobina glucosilada mayor o igual a aproximadamente 48 mmol/mol ($\geq 6,5$ % de hemoglobina glucosilada) (Kekkonen RA, et al. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(13):2029-36) está ligada a la fisiología del envejecimiento y específicamente a la fisiopatología de la diabetes de tipo 2. Por tanto, cualquier glucosilación de hemoglobina anormal, es decir, la glucosilación en exceso de aproximadamente 40 mmol/mol ($\geq 5,9$ % de hemoglobina), puede potenciar el desarrollo de ECV.

De acuerdo con las directrices (*ADA Diabetes Care*, 2011, etc.) para las personas sin diabetes, el intervalo normal para la HbA1c es de entre el 4 % y el 5,6 %, los niveles de HbA1c de entre el 5,7 % y el 6,4 % (estado prediabético) indican un mayor riesgo de diabetes de tipo dos y niveles del 6,5 % o más altos, indican diabetes. Por ejemplo, las personas dentro de un intervalo de HbA1c del 5,5-6,0 % tienen una incidencia acumulada a los 5 años de diabetes que oscila entre el 12 y el 25 % (*ADA Diabetes Care*, 2011). Por tanto, cualquier reducción del nivel de HbA1c se acepta como objetivo principal para la prevención, el alivio y el tratamiento de la prediabetes y la diabetes.

En la población objetivo, el nivel de hemoglobina glucosilada es mayor o igual a aproximadamente 40 mmol/mol, por ejemplo, mayor o igual a aproximadamente 48, 50, 53, 55, 60 o 65 mmol/mol. Esto también puede expresarse como aproximadamente el 5,9 %, el 6,5 %, el 7,0 %, el 7,2 %, el 7,6 % o el 8,1 % de hemoglobina glucosilada. Como se define de forma alternativa, la población objetivo pueden tener niveles de HbA1c que son indicativos de estado prediabético (*ADA Diabetes Care*, 2011), es decir, niveles de HbA1c de entre el 5,7 % y el 6,4 % o niveles que indican diabetes (*ADA Diabetes Care*, 2011), es decir, niveles de HbA1c del 6,5 % o mayores.

Los niveles de glucosilación de hemoglobina no específica (Hb) (es decir, los niveles de nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c) pueden medirse como se describe en el presente documento o por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los niveles de glucosilación de hemoglobina no específica (Hb) (es decir, los niveles de

nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c) pueden medirse como se describe en las referencias (Pitsavos et al., *Rev Diabet Stud.* 2007; 4(2):98-104) y (Festa y Haffner. *Circulation.* 2005; 17; 111 (19):2414-5).

Adiponectina

La adiponectina es una hormona polipeptídica adipocina producida exclusivamente por los adipocitos. Entre las adipocinas, la adiponectina es la más abundante. La adiponectina modula una serie de procesos metabólicos, incluyendo la regulación de la glucosa y la oxidación de ácidos grasos y normalmente está presente en la sangre en un nivel de aproximadamente 5 a 21 ng/ml en individuos sanos. Los niveles de adiponectina se reducen en la población objeto diana y normalmente son de menos de aproximadamente 10-20 ng/ml o de menos de aproximadamente 20 ng/ml, 15 ng/ml, 10 ng/ml, 8 ng/ml, 5 ng/ml o incluso menos.

Los niveles de adiponectina pueden medirse como se describe en el presente documento o por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los niveles de adiponectina pueden medirse como se describe en la referencia (Ebinuma H, et al. *Clin Chem.* Agosto de 2007; 53(8): 1541-4. Epub 28 de junio de 2007).

Inflamación de grado bajo a nivel celular

La inflamación de grado bajo (IGB) normalmente se produce en la vasculatura y el tejido adiposo de un sujeto. La IGB tiene una naturaleza normalmente crónica. Los marcadores bien aceptados de inflamación de grado bajo a nivel celular incluyen proteínas C reactivas de alta sensibilidad (hsCRP) e IL-6.

La CRP (proteína C reactiva por sus siglas en inglés) es un reactante de fase aguda que pertenece a la familia pentraxina altamente conservada de proteínas plasmáticas. La CRP se produce principalmente en el hígado, pero también en el riñón, las neuronas, los macrófagos alveolares y las lesiones ateroscleróticas (Devaraj S et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1368-1374). La hsCRP es también un marcador excelente de la inflamación de grado bajo (alta-normal) a nivel celular. Se ha demostrado que la CRP se une a las células apoptóticas y de este modo puede ser un nivel de la inmunidad innata contra la expresión patógena de las células apoptóticas y de esta manera aumenta en respuesta a estímulos nocivos que inducen inevitablemente la lesión celular y/o tisular (Chang MK et al. *PNAS USA.* 1 de octubre de 2002; 99(20): 13043-13048). Muchos estudios han demostrado que la hsCRP estimula los monocitos para que produzcan factores proinflamatorios, incluyendo la IL-6. La hsCRP también activa el sistema del complemento e induce la disfunción celular endotelial vascular y la migración y la proliferación de células de músculo liso vascular (Li JT et al., *Scand J Immunol.* 2007; 66(5): 555-62).

Como se usa en el presente documento, la expresión "inflamación de grado bajo a nivel celular" se refiere a un estado inflamatorio en el que el nivel de proteína C reactiva (CRP) en el suero sanguíneo de un sujeto es inferior o igual a 20,0 mg/l (Van den Bruel A et al. (2011) *BMJ.* 8 de junio de 2011; 342:d3082), específicamente de aproximadamente 3,0 a 10,0 mg/l. El riesgo cardiovascular más bajo se ha visto en pacientes que tenían tanto hsCRP < 1 mg/l como LDL-C < 70 mg/dl (Koenig W. 2013. *Int J Cardiol.* 168, 5126-5134). La Asociación Estadounidense del Corazón y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades recomiendan la siguiente interpretación de los resultados de hsCRP: < 1 mg/l - bajo riesgo; 1-3 mg/l - riesgo promedio; > 3 mg/l - riesgo alto (Pearson TA, et al. 2003. *Circulation.* 107:499-511). En realizaciones particulares, el grupo de sujetos objetivo tiene un nivel de CRP de menos de o igual a 10,0 mg/l, de aproximadamente 3,0 a 10,0 mg/l, de aproximadamente 4,0 a 9,0 mg/l o de aproximadamente 5,0 a 8,0 mg/l.

Los niveles de CPR y hsCRP pueden medirse como se describe en el presente documento o por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los niveles de CRP y hsCRP pueden medirse como se describe en Pearson TA et al. Citado anteriormente, y los niveles se miden preferentemente de esta manera.

Como se describe en el presente documento, la inflamación de grado bajo a nivel celular está ligada a las enfermedades inflamatorias.

La IL-6 se acepta ampliamente como un marcador proinflamatorio fundamental y crucial (Lu XT et al. 2013. *J Cardiovasc Pharmacol.* Julio de 2013; 62(1):6-12). Es el factor celular más importante que regula la síntesis de hsCRP en los hepatocitos. La IL-6 se produce en una diversidad de tejidos, incluyendo los leucocitos activados, los adipocitos y las células endoteliales. Los valores de referencia de IL-6 son normalmente de menos de 3,3 ng/ml en el suero sanguíneo de personas clínicamente sanas (valor de referencia endémico).

En un ejemplo particular, el grupo de sujetos objetivo tiene un nivel de IL-6 de más de aproximadamente 3,3 ng/ml. Específicamente, el grupo de sujetos objetivo puede tener un nivel de IL-6 de aproximadamente 3,3 a 10,0 ng/ml, de aproximadamente 4,0 a 8,0 ng/ml o de aproximadamente 5,0 a 7,0 ng/ml.

Los niveles de IL-6 pueden medirse como se describe en el presente documento o por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los niveles de IL-6 pueden medirse como se describe en (Nordan, R. P. et al. 2001. *Current Protocols in Immunology.* 17: 6.6.1-6.6.5).

La IL-10 es bien aceptada como marcador antiinflamatorio (Tsai TT et al. 2013, *J Biomed Sci.* 25 de Junio de 2013; 20:40). Algunos autores han revisado la asociación entre la inflamación sistémica normal-alta (de grado bajo) y la diabetes de tipo 2, incluyendo un mayor riesgo de desarrollo de ECV (Pitsavos et al., *Rev Diabet Stud.* 2007; 4(2):98-104) y (Festa y Haffner. *Circulation.* 2005; 17; 111 (19):2414-5).

Los niveles de IL-10 pueden medirse como se describe en el presente documento o por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, los niveles de IL-10 pueden medirse como se describe en Tsai TT *et al.* citado anteriormente.

Enfermedades inflamatorias

Debido al mecanismo subyacente por el cual el *Lactobacillus fermentum* ME-3 altera el perfil de marcadores pro- y antiinflamatorios, los presentes inventores han descubierto que la cepa bacteriana probiótica es útil para prevenir, aliviar los síntomas, tratar y/o proporcionar un tratamiento adyuvante, para una enfermedad inflamatoria y, en particular, afecciones relacionadas con el síndrome metabólico. En particular, la presente divulgación puede utilizarse para prevenir, aliviar los síntomas, tratar y/o ser un tratamiento adyuvante para una enfermedad inflamatoria, en la que dicha enfermedad o trastorno inflamatorio es una ECV, una enfermedad neurodegenerativa, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, el cáncer, el ictus, un trastorno metabólico, un síndrome metabólico, la prediabetes o la diabetes de tipo 2.

La inflamación y la glucosilación de hemoglobina no específica (Hb) son uno de los factores de riesgo más importantes de las enfermedades inflamatorias, la diabetes de tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares. La glucosilación de Hb anormal está ligada a la fisiología del envejecimiento y, en especial, a la fisiopatología de la diabetes de tipo 2. Por tanto, la inflamación de grado bajo permanente (o normal-alta) (por ejemplo, un nivel de CRP de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 10,0 mg/l) y la glucosilación avanzada de la hemoglobina (por ejemplo, la glucosilación por encima de 40 mmol/mol o del 5,9 %) pueden ambas potenciar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Algunos autores han revisado la asociación entre la inflamación sistémica alta-normal (de grado bajo) y la diabetes de tipo 2, incluyendo un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular (ECV) (Pitsavos et al., *Rev Diabet Stud.* 2007; 4(2):98-104, Festa y Haffner. *Circulation.* 2005; 17; 111(19):2414-5).

Por tanto, mediante la identificación de que el *Lactobacillus fermentum* ME-3 tenía un profundo efecto supresor sobre los marcadores proinflamatorios mediante la disminución del nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c y la disminución o la prevención de la inflamación de grado bajo a nivel celular, los inventores han identificado una población de sujetos objetivo en riesgo de desarrollar ECV y diabetes de tipo 2 que se beneficiarían del *Lactobacillus fermentum* ME-3.

Los niveles elevados de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP), así como IL-6 (interleucina-6) y TNF- α (factor de necrosis tumoral α) también se han aceptado como marcadores fuertes relacionadas con el riesgo de ECV, principalmente en sujetos con diabetes de tipo 2 pero también en personas no diabéticas. Por tanto, los presentes inventores se centraron en la hsCRP como marcador de la IGB subclínica crónica relacionada con la ECV. La Asociación Estadounidense del Corazón y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades recomiendan la siguiente interpretación de los resultados de la hsCRP: < 1 mg/l – riesgo bajo; 1-3 mg/l - riesgo promedio; > 3 mg/l - riesgo alto (Pearson TA et al. citado anteriormente). La inflamación de grado bajo (normal-alta) a nivel celular puede producirse en individuos aparentemente sanos, poniéndolos en mayor riesgo de enfermedad cardiovascular y enfermedad neurodegenerativa durante el envejecimiento y/o glucosilación de Hb avanzada (Rifai y Ridker *Clin Chem.* 2003;49(4): 666-9).

Por tanto, los presentes inventores han descubierto que una población objetivo particular para el tratamiento profiláctico y/o el tratamiento adyuvante profiláctico (por ejemplo, como componente adyuvante con *Lactobacillus fermentum* ME-3) son sujetos que parecen estar sanos o están actualmente asintomáticos para una enfermedad inflamatoria y/o afecciones relacionadas con el síndrome metabólico. En un caso particular, la población objetivo es asintomática para una ECV, una enfermedad neurodegenerativa, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, el cáncer, el ictus, un trastorno metabólico, el síndrome metabólico o la diabetes de tipo 2. En una realización adicional, la población objetivo puede ser asintomática para una ECV, la diabetes de tipo 2 o la prediabetes. Por "asintomático" se entiende que el sujeto no proporciona ningún indicio (por ejemplo, indicio externo) de la existencia de la enfermedad particular tal como una enfermedad inflamatoria y/o afecciones relacionadas con el síndrome metabólico. En particular, el sujeto puede no proporcionar ningún indicio de la existencia de una ECV, una enfermedad neurodegenerativa, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, el cáncer, el ictus, un trastorno metabólico, el síndrome metabólico o la diabetes de tipo 2. En una realización adicional, el sujeto puede no proporcionar ningún indicio de la existencia de las enfermedades cardiovasculares y/o la diabetes de tipo 2. Sin embargo, el sujeto puede estar en riesgo de desarrollar una enfermedad o enfermedades inflamatorias y/o afecciones relacionadas con el síndrome metabólico en el futuro o puede estar en cualquier etapa del desarrollo o tener la enfermedad o enfermedades inflamatorias y/o afecciones relacionadas con el síndrome metabólico pero aún no mostrar ningún síntoma detectable, obvio y/o abierto, es decir, puede ser prediabético (siendo éste el estado en el que se cumplen algunos, pero no todos los criterios de diagnóstico para la diabetes, pero que es en sí mismo asintomático). Un sujeto con prediabetes está en riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2. La progresión hacia la

diabetes mellitus a partir de la prediabetes es de aproximadamente el 25 % a lo largo de tres a cinco años (Nathan et al. (2007) *Diabetes Care* 30 (3): 753-9).

En algún caso, el sujeto puede estar padeciendo una enfermedad inflamatoria, pero ser asintomático para una segunda o más enfermedades inflamatorias. En otro caso, el sujeto puede estar padeciendo más de una, por ejemplo 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más, enfermedades inflamatorias y, sin embargo, todavía ser asintomático para una o más, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más, enfermedades inflamatorias adicionales. En un ejemplo específico, el sujeto puede ser asintomático para una ECV y/o la diabetes de tipo 2, pero puede estar padeciendo el síndrome metabólico. En un ejemplo alternativo, el sujeto puede estar padeciendo cáncer, pero todavía ser asintomático para una o más de una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurodegenerativa, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, el ictus, un trastorno metabólico, el síndrome metabólico y/o la diabetes de tipo 2.

En un caso, el sujeto asintomático tiene un nivel de CRP de < 20 mg/l. Específicamente, el sujeto asintomático puede tener un nivel de CRP de aproximadamente 3,0 a 10,0 mg/l, de aproximadamente 4,0 a 9,0 mg/l o de aproximadamente 5,0 a 8,0 mg/l.

En algún caso, el sujeto asintomático tiene un nivel de hemoglobina glucosilada que es mayor o igual a aproximadamente 40 mmol/mol. Específicamente, el sujeto asintomático puede tener un nivel de hemoglobina glucosilada mayor o igual a aproximadamente 48, 50, 53, 55, 60 o 65 mmol/mol.

En algún caso, el sujeto asintomático tiene un nivel de IL-6 de más de aproximadamente 3,3 ng/ml. Específicamente, el sujeto asintomático puede tener un nivel de IL-6 de aproximadamente 3,3 a 10,0 ng/ml, aproximadamente 4,0 a 8,0 ng/ml o aproximadamente 5,0 a 7,0 ng/ml.

En algún caso, el sujeto asintomático tiene un nivel de adiponectina de menos de aproximadamente 10-20 ng/ml. Específicamente, el sujeto asintomático puede tener un nivel de adiponectina de menos de aproximadamente 20 ng/ml, 15 ng/ml, 10 ng/ml, 8 ng/ml, 5 ng/ml o incluso inferior.

La presente divulgación es particularmente útil en el tratamiento de sujetos con síndrome metabólico y, en particular, como adyuvante (por ejemplo, como componente adyuvante), en el tratamiento de sujetos con síndrome metabólico, que pueden considerarse como asintomáticos para la diabetes de tipo 2 y las ECV pero en riesgo de desarrollar estas, y posiblemente otras, enfermedades inflamatorias (es decir, sujetos prediabéticos).

El tratamiento, la prevención, el tratamiento adyuvante y/o el alivio de los síntomas del síndrome metabólico de acuerdo con la invención puede prevenir el desarrollo de enfermedades inflamatorias tales como las ECV y la diabetes de tipo 2. El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de anomalías metabólicas (Juturu y Gormley 2005 *Current Nutrition & Food Science*, 1(1), 1-11; Herder, et al. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92. 12 (2007): 4569-4574, Kadowaki, Takashi, et al. *Journal of Clinical Investigation* 116.7 (2006): 1784-1792, Oliveira, A., et al. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 21.5 (2011): 347-354), tales como la obesidad abdominal, la dislipidemia aterogénica, la tensión arterial elevada, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la prediabetes, la diabetes de tipo 2 y, por tanto, en última instancia, puede conducir a enfermedades cardiovasculares.

El síndrome metabólico puede describirse, por tanto, como un ejemplo de una enfermedad inflamatoria como se define en sentido amplio en el presente documento. Los trastornos relacionados con el síndrome metabólico incluyen trastornos o enfermedades que se encuentran en pacientes o sujetos con síndrome metabólico y/o que pueden surgir como consecuencia directa o indirecta del síndrome metabólico. Son ejemplos específicos la prediabetes, la diabetes de tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares.

Por tanto, los presentes inventores han descubierto que una población objetivo particular para el tratamiento profiláctico con composiciones que contienen *Lactobacillus fermentum* ME-3 también son sujetos que parecen estar clínicamente sanos o están actualmente clínicamente sanos para el síndrome metabólico y para afecciones relacionadas con el síndrome metabólico.

Así como los marcadores proinflamatorios mencionados anteriormente, se ha señalado que la adiponectina desempeña un papel importante en el desarrollo de la diabetes de tipo 2 y se asocia a acontecimientos patológicos mediante la sensibilización de la insulina y la mejora del metabolismo lipídico. Se ha notificado que los niveles bajos de adiponectina se asocian estrechamente a la hiperinsulinemia, la diabetes de tipo 2, la obesidad, el síndrome metabólico, la aterosclerosis y la dislipidemia (Kadowaki et al. *Endocr Rev.* 2005; 26(3):439-51). Varios estudios epidemiológicos indican que la adiponectina alta parece ser protectora frente al desarrollo de la diabetes de tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis (Knobler et al. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154(1): 87-92, Spranger et al. *Lancet.* 2003; 361(9353): 226-8). Además, se ha notificado que la adiponectina tiene un efecto antiinflamatorio y que su concentración se asocia negativamente al grado de marcadores inflamatorios, tales como hsCRP, IL-6 y TNF- α (Puglisi & Fernandez *J Nutr.* 2008 Dec; 138(12): 2293-6. Revisión). Por tanto, la presente invención es particularmente eficaz en la prevención, el alivio de los síntomas, el tratamiento y/o el tratamiento adyuvante de la diabetes de tipo 2, ya que los presentes inventores han demostrado que el *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede reducir simultáneamente el nivel de marcadores tales como hsCRP, IL-6, HbA1c, así como la

resistencia a la insulina (TG/HDL-Col) y aumentar el nivel de adiponectina e IL-10.

Los niveles de adiponectina generalmente son más bajos en los sujetos diabéticos de tipo 2 que en los sujetos no diabéticos Nayak, et al. *Arch Physiol Biochem.* 2009; 115(1): 28-33. Adicionalmente, los estudios de cultivos celulares anteriores han demostrado que la adiponectina puede suprimir la síntesis de CRP y la secreción desde células endoteliales aórticas y hepatocitos. Por otro lado, la CRP también puede suprimir la expresión de adiponectina y la secreción desde los adipocitos (Devaraj et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1368-1374). La interacción de estos dos marcadores de enfermedades inflamatorias, por tanto, hace al *Lactobacillus fermentum* ME-3 particularmente eficaz en la prevención, el alivio de los síntomas, el tratamiento y/o el uso como adyuvante en el tratamiento de las enfermedades enumeradas en el presente documento, ya que el *Lactobacillus fermentum* ME-3 altera simultáneamente el nivel de marcadores tales como la hsCRP y la IL-6 y aumenta el nivel de adiponectina.

Ahora se cree que la inflamación de grado bajo (alta-normal) crónica a nivel celular es una causa importante de muchos trastornos relacionados con la edad, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes de tipo 2 y la fragilidad en el anciano. La aterosclerosis puede ser un impulsor importante de otros trastornos relacionados con la edad, ya que el endotelio vascular dañado activa procesos inflamatorios mediante la regulación positiva de citocinas como la IL-6 y la hsCRP. La inflamación sistémica crónica, entonces, altera muchos otros sistemas de órganos conduciendo a otros trastornos relacionados con la edad. Se han notificado aumentos de nivel bajo de la hsCRP en diversas afecciones y patologías que se cree que se asocian a la inflamación y, en el caso de las ECV, se ha notificado que la hsCRP predice los resultados cardiovasculares independientemente de otros marcadores de riesgo convencionales (Verma et al. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc Med.* 2005; 2(1): 29-36, Ridker PM. *Circulation.* 2003; 28; 107(3):363-9).

La presente invención, por tanto, también abarca prevenir, aliviar los síntomas, tratar y/o proporcionar tratamiento adyuvante para la enfermedad de Alzheimer, el cáncer y la aterosclerosis.

Los inventores también han descubierto que el *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede usarse como tratamiento adyuvante, por ejemplo, como componente en un tratamiento complejo, para pacientes que han sufrido un ictus. En un caso, el *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede usarse como tratamiento adyuvante durante el periodo de hospitalización para pacientes que se recuperan de un ictus. Cuando un paciente ha padecido un ictus, si hay indicios de un alto nivel de inflamación, es decir, que cualquier marcador inflamatorio esté por encima del nivel de corte desvelado en el presente documento, entonces pueden administrarse antibióticos a ese paciente. Como se describe en el Ejemplo 2 en el presente documento, una composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 fue capaz de reducir significativamente el nivel de hsCRP en sujetos que habían padecido un ictus y, por tanto, de reducir la necesidad de administración de antibióticos a pacientes con ictus. Esto tiene el beneficio de reducir la aparición de los efectos secundarios de los antibióticos en pacientes con ictus durante los periodos de recuperación. Por tanto, además de para tratar la inflamación observada en pacientes con ictus, las composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 también pueden usarse como tratamientos adyuvantes para pacientes que han sufrido un ictus.

La presente divulgación abarca, por tanto, aliviar los síntomas (en particular los síntomas inflamatorios) y/o proporcionar tratamiento adyuvante para el ictus.

De este modo, existen aplicaciones particularmente importantes para *Lactobacillus fermentum* ME-3 como profiláctico. La administración de *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede retrasar o evitar la aparición de enfermedades inflamatorias (preferentemente el síndrome metabólico y/o trastornos relacionados con el síndrome metabólico). Esto es particularmente relevante para sujetos que son asintomáticos pero que podrían estar en riesgo de desarrollar dichas enfermedades y trastornos. Se han definido ejemplos de dichos grupos de pacientes anteriormente.

Composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3

En el contexto de la presente invención, el *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede administrarse en cualquier formulación adecuada, tal como un producto alimentario, un complemento alimentario o una composición farmacéutica. Se desvelan formulaciones para composiciones probióticas en el documento WO 2010/069920, el documento WO 2002/005829 y el documento EP 1 699 474.

Los productos alimentarios adecuados incluyen un alimento médico o producto alimentario funcional. En una realización, el producto alimentario, alimento médico o alimento funcional es un producto lácteo tal como leche, yogur, queso, kéfir o un producto lácteo fermentado a base de leche o a base de suero de leche. También son adecuados productos a base de chocolate, como se describen en el Ejemplo 5, como productos alimentarios que contienen y administran *Lactobacillus fermentum* ME-3.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas que pueden usarse en la invención incluyen composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 encapsulado, por ejemplo, en forma liofilizada, *Lactobacillus fermentum* ME-3 formulado en una forma recubierta o en forma de un comprimido o cápsula, o *Lactobacillus fermentum* ME-3

formulado en una forma de polvo. Los comprimidos y cápsulas adecuados incluyen cápsulas de gelatina dura o vegetales, comprimidos con o sin recubrimiento entérico (por ejemplo, los que se disuelven en condiciones neutras) y comprimidos masticables (Saxelin M., *Clin Infect Dis.* (2008) 46 (Suplemento 2): S76-S79.)

- 5 Además de *Lactobacillus fermentum* ME-3, las composiciones pueden contener cualquier vehículo o vehículos y/o excipientes aceptables. Estos incluyen, pero no se limitan a vehículos tales como fibras dietéticas, hidratos de carbono y microcelulosa, y vehículos farmacéuticamente aceptables, incluyendo líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. También pueden estar presentes en las composiciones utilizadas en la presente invención sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes del pH y similares.
- 10 Un análisis minucioso de los vehículos adecuados está disponible en la bibliografía y en Philip P. Gerbino. 2005. *Remington: The Science and Practice in Pharmacy*. 21 Ed. Filadelfia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, ISBN:0-7817-4673-6.

- 15 El *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede administrarse antes de, simultáneamente con o posteriormente a otro compuesto activo, por ejemplo, como tratamiento adyuvante. Dichos compuestos activos incluyen un probiótico adicional, un prebiótico, una o más vitaminas, monocalina K, medicamentos utilizados normalmente para tratar una enfermedad inflamatoria, por ejemplo, una ECV, una enfermedad neurodegenerativa, la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, el cáncer, el ictus, un trastorno metabólico, el síndrome metabólico, la prediabetes o la diabetes de tipo 2 y/o un agente o agentes antiinflamatorios adicionales. El otro compuesto activo también puede ser una
- 20 estatina. Los ejemplos de otros probióticos incluyen cepas, por ejemplo, de *Pediococcus*, otro *Lactobacillus*, una bifidobacteria.

- Los medicamentos utilizados para tratar trastornos inflamatorios incluyen, pero no se limitan a: agentes trombolíticos como la aspirina y el activador tisular del plasminógeno (ATP); agentes utilizados para tratar la diabetes de tipo 2
- 25 tales como la metformina, la sitagliptina, la saxagliptina, la repaglinida, la nateglinida, la exenatida y la liraglutida; agentes utilizados para tratar la aterosclerosis, tales como beta-bloqueantes, inhibidores de la ECA, antagonistas del calcio, estatinas y fibratos; y agentes utilizados para tratar la enfermedad de Alzheimer tales como inhibidores de la colinesterasa y antagonistas del receptor de NMDA como clorhidrato de donepezilo, rivastigmina, galantamina y memantina.

- 30 Los agentes antiinflamatorios adecuados incluyen, pero no se limitan a: corticoesteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) tales como derivados del ácido propiónico (por ejemplo, ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, fluprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pranoprofeno y suprofeno), aspirina y derivados de la aspirina e inhibidores de la COX.

- 35 La composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede comprender adicionalmente una o más vitaminas y/o monocalina K. En particular, la composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 utilizada en la presente invención puede comprender además o administrarse antes de, simultáneamente con o posteriormente a la composición descrita anteriormente y en *EFSA Journal* 2011; 9(7): 2304.

- 40 Una dosis eficaz de *Lactobacillus fermentum* ME-3 en el contexto de la presente invención es de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{11} UFC por día, por ejemplo de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} UFC por día, preferentemente aproximadamente 6×10^9 UFC. Esta dosis puede administrarse como una sola dosis diaria o como varias dosis divididas. Por ejemplo, la dosis puede administrarse como 2-6 dosis divididas, por ejemplo, 2-6, 2-4, 3-4 dosis por día o 2, 3, 4, 5 o 6 dosis por día. Una forma de dosificación individual puede contener de
- 45 aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} UFC, por ejemplo, aproximadamente 10^7 - 10^9 UFC, preferentemente aproximadamente 3×10^9 UFC. En una forma de dosificación particular, un kéfir comprende aproximadamente 2×10^8 UFC/g y se administra a aproximadamente 100-2000 ml por día, por ejemplo, aproximadamente 100-1000, aproximadamente 200-600 ml o aproximadamente 300-400 ml por día. En una forma de dosificación específica
- 50 adicional, una cápsula individual contiene aproximadamente 3×10^9 UFC o aproximadamente 10^9 UFC de *Lactobacillus fermentum* ME-3 liofilizado y pueden administrarse 1-10, por ejemplo, 2-8, 3-6, 4-5 o 2, 3, 4, 5 o 6 cápsulas por día. Puede haber presentes otros componentes. Por ejemplo, una dosis diaria preferida (2 cápsulas) comprende:

Ingrediente	Cantidad
Levadura de arroz rojo	666 mg (10 mg de monacolina K)
<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	60 mg (6 mil millones de UFC)
Ubiquinol (Kaneka QH TM)	30 mg
L-cisteína	30 mg
Vitamina E	10 mg (85 % de la dosis diaria recomendada)
Vitamina B1	0,66 mg (60 % de la dosis diaria recomendada)
Vitamina B6	1 mg (72 % de la dosis diaria recomendada)
Vitamina B9	100 mg (50 % de la dosis diaria recomendada)

Ingrediente	Cantidad
de Vitamina B12	1,5 mg (60 % de la dosis diaria recomendada)

Esto está disponible en el mercado como Reg'Activ Cholesterol (<http://www.regactiv.com/en/produits/product-1>).

Generalidades

La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm$ el 10 %.

El término "sujeto" se refiere a un individuo asintomático o clínicamente sano.

El término "paciente" se refiere a un individuo sintomático.

La expresión "tratamiento adyuvante" o "componente adyuvante" en el contexto de la invención significa que la composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 se usa junto con otros medicamentos y tratamientos para el mismo trastorno, por ejemplo, un trastorno inflamatorio y preferentemente un trastorno relacionado con el síndrome metabólico. El término incluye el uso de *Lactobacillus fermentum* ME-3 como componente medicamentoso adyuvante adicional junto con los tratamientos y medicamentos normales y habituales para la afección inflamatoria. La composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 puede usarse sola o como "tratamiento adyuvante" o "componente adyuvante" en cualquiera de los métodos y usos que se especifican en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El gráfico de dispersión de la relación de valores de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) y hemoglobina glucosilada (HbA1c) - $R = 0,71$, $p < 0,01$, entre los valores basales y de punto final.

Figura 2. *Lactobacillus fermentum* ME-3 en diferentes chocolates, UFC/g.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se controló el efecto del *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico sobre los marcadores de inflamación de grado bajo hsCRP, HbA1c, IL-6, adiponectina y los marcadores de glucosilación no específicos.

Se reclutaron veintitrés voluntarios clínicamente sanos (16 mujeres, 7 varones, edad 40-65 años) en un estudio clínico sin enmascaramiento. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: una infección aguda en curso; diabetes; historia de alergia alimentaria o enfermedad gastrointestinal; uso de cualquier agente antimicrobiano dentro del mes anterior o uso de cualquier medicación simultánea habitual incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos, estatinas o anticoncepción hormonal; embarazo o lactancia; abuso de alcohol; uso de drogas; dietas especiales; fumar. Durante la intervención y durante las dos semanas anteriores, se les pidió a los participantes que evitaran las vitaminas o los complementos minerales, los cambios en los hábitos dietéticos habituales y la actividad física diaria y el uso de alimentos a base de probióticos u otros kéfires/yogures. Desafortunadamente, debido a motivos personales, 4 participantes (todos hombres) no completaron el ensayo.

Todos los participantes firmaron su consentimiento informado por escrito y tenían la opción de retirarse del estudio en cualquier momento. El Comité de Revisión de la Ética (ERC, del inglés *Ethics Review Committee*) en Investigación Humana de la Universidad de Tartu aprobó el protocolo del estudio (protocolo N.º 211/T-1). Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

El kéfir que contenía el probiótico *Lactobacillus fermentum* ME-3 fue producido por AS Tere (Tallin, Estonia). El recuento de células viables de *Lactobacillus fermentum* ME-3 en el kéfir fue estable en todos los lotes adquiridos (recuentos de células viables de 2×10^8 UFC/g de kéfir). Las cápsulas de probiótico recubiertas de gelatina utilizadas en el Ejemplo 2 contenían 10^9 UFC de *Lactobacillus fermentum* ME-3 por cápsula, además de 250 mg de sacarosa y microcelulosa.

Después de un periodo de introducción de dos semanas (periodo de reposo farmacológico), se obtuvo sangre en ayunas convencional basal (de la vena antecubital). Las muestras se mantuvieron a -80°C hasta su análisis.

Después los participantes recibieron 200 ml de kéfir que contenía *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico (2×10^9 UFC/g de kéfir) a diario durante cuatro semanas. Después de eso se obtuvo sangre en ayunas convencional (de la vena antecubital). Se sometieron a ensayo índices sanguíneos habituales: hemoglobina glucosilada (HbA1c) usando un analizador automatizado Hitachi 912 certificado en el laboratorio clínico del centro (Roche Diagnostics LDL-Col y HDL-Col). La hsCRP se determinó mediante un ensayo inmunoturbidimétrico potenciado por partículas de látex (Roche Diagnostics GmPh, Alemania) con el analizador automático Hitachi 912 [1]. El nivel plasmático de IL-6 se midió mediante un ELISA usando un kit disponible en el mercado (Inmunoensayo de IL-6 Humana, número del catálogo D6050, R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EE.UU.) y el nivel plasmático de adiponectina se midió mediante un ELISA usando un kit disponible en el mercado (Adiponectina Total Humana/Acrp30, número del catálogo DRP300, SRO300 PDRP300, R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EE.UU.).

El nivel de marcadores inflamatorios hsCRP e IL-6 disminuyó después de 4 semanas de consumo de kéfir que contenía el *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico, así como el nivel de HbA1c. Durante el mismo periodo, los niveles de adiponectina aumentaron. Por tanto, el consumo de *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico alivia el riesgo de enfermedades inflamatorias como las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, la aterosclerosis, los trastornos metabólicos, las afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular) y diabetes de tipo 2.

Estadísticas

Se realizaron cálculos usando paquetes de software estadístico disponibles en el mercado (Statistics para Windows, Stat Soft Inc. y Graph Pad PRISM Versión 2.0) y el software R, versión 1.6.0 para Windows (www.r-project.org). Todos los valores se proporcionan como media y desviación típica (media $\pm$ DT). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se determinaron mediante el uso del ensayo t de Student. En todos los análisis, los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Las correlaciones entre las variables se examinaron mediante análisis de regresión lineal (software R, versión 2.0.1 para Windows).

Tabla 1. Marcadores inflamatorios y de glucosilación no específica en la semana 0 y después del consumo de 200 g de kéfir enriquecido con *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico/por día durante 4 semanas.

	Voluntarios sanos n = 19	
	Semana 0	Semana 4
hsCRP mg/l	3,14 $\pm$ 2,68	2,11 $\pm$ 1,56 $p < 0,04$
IL-6 pg/ml	2,73 $\pm$ 1,31	2,46 $\pm$ 1,06 $p < 0,02$
% de HbA1c	5,96 $\pm$ 0,33	5,86 $\pm$ 0,27 $p < 0,03$
Adiponectina (ng/ml)	8,62 $\pm$ 3,94	9,10 $\pm$ 3,85 $p < 0,03$

La hsCRP disminuyó, así como la HbA1c, y tuvieron una correlación estadísticamente significativa entre sí en la semana 0, $r = 0,48$, $p = 0,037$, así como en la semana 4 $r = 0,54$, $p = 0,018$ (el coeficiente de correlación de Spearman).

El grado de respuesta de los sujetos fue muy bueno. En el caso de la hsCRP es del 58 %, en el caso de la IL-10 - 68 %, el grado de respuesta de la HbA1c es del 26 % y la adiponectina es más del 70 %.

El consumo de *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico bajó de forma estadísticamente significativa el nivel de hsCRP, así como el nivel de IL-6. Al mismo tiempo, el nivel de azúcar en sangre a largo plazo (como HbA1c) disminuyó estando en buena correlación con los valores disminuidos de hsCRP ($R = 0,71$, $p < 0,01$).

Esto demuestra muy claramente el círculo vicioso entre la inflamación normal-alta (de bajo nivel) a nivel celular y los valores altos-normales de HbA1c. Esta fuerte correlación entre los marcadores inflamatorios (hsCRP y IL-6) y los marcadores de glucosilación no específica (HbA1c), cuando uno de ellos aumenta por cualquier razón el otro también aumenta. Las personas, especialmente los ancianos, que tienen ya sea un aumento de la inflamación a nivel celular o una glucosilación avanzada, pueden tener, por tanto, un mayor riesgo de desarrollar diabetes de tipo 2, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. Adicionalmente, las personas que tienen cualquiera de entre un aumento de la inflamación a nivel celular o un nivel no fisiológico de glucosilación, tienen un mayor riesgo de afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular).

De ello se deduce que los productos alimentarios enriquecidos con *Lactobacillus fermentum* ME-3, los complementos alimentarios o las composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 pueden usarse para aliviar y prevenir la inflamación de grado bajo (normal-alta) a nivel celular porque los niveles de marcadores

inflamatorios hsCRP e IL-6 disminuyen y los niveles de marcador antiinflamatorio adiponectina aumentan después del consumo de un producto alimentario, complemento alimentario o composición de este tipo.

- 5 También se deduce que puede usarse un producto alimentario, complemento alimentario o medicamento enriquecido con *Lactobacillus fermentum* ME-3 para aliviar y prevenir el nivel elevado de azúcar en sangre a largo plazo mediante la disminución del nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c a nivel celular.

- 10 De ello se deduce adicionalmente que los productos alimentarios enriquecidos con *Lactobacillus fermentum* ME-3, los complementos alimentarios o las composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 pueden usarse para aliviar y prevenir y tratar afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular).

Ejemplo 2

- 15 21 pacientes (80,4 ± 9,9 años, 9 hombres/12 mujeres) que habían tenido un ictus cerebral 8-22 (12 ± 6,6) días antes. Los sujetos del estudio clínico con ocultación doble y aleatorizado, se distribuyeron al azar en 2 grupos y se les asignó consumir dos veces al día 3 cápsulas (109 UFC por cápsula) de Lf ME-3 liofilizado (grupo LfME-3, 10 sujetos o 3 cápsulas (que contenían sacarosa 250 mg y microcelulosa, grupo de control, 11 sujetos) durante 3 semanas. La capacidad funcional (Medida de la Independencia Funcional - MCF y Escala Escandinava de Ictus - EEI) y los
- 20 índices clínicos de los pacientes con ictus se evaluaron antes y después del periodo de tratamiento de 3 semanas. Se creía que el uso de usCRP para la elevación de las condiciones se asociaba a la inflamación, en individuos por lo demás sanos.

- 25 De acuerdo con los valores de referencia internacionales, el valor de corte aceptado para la CRP es de 20 mg/l (Van den Bruel A et al. (2011) *BMJ*. 8 De junio de 2011; 342). En el grupo de *Lactobacillus fermentum* ME-3 el 45 % de los pacientes con ictus estuvieron por encima del valor de corte para la CRP antes de consumir el *Lactobacillus fermentum* ME-3. Después del consumo, solo el 9 % (un paciente de 11) todavía tenía un nivel de CRP por encima del valor de corte.

30 Ejemplo 3

- Los inventores también realizaron un ensayo clínico controlado con placebo, con doble ocultación, aleatorizado (El Comité de Revisión de la Ética (ERC) en Investigación Humana de la Universidad de Tartu aprobó el protocolo del estudio (ref: 210/T-3) para comparar un grupo de kéfir placebo sin ME-3 (más de 55 personas) y un grupo de kéfir
- 35 con ME-3 (más de 55 personas) (artículo en preparación). Los datos de 8 semanas frente a los datos de 4 semanas demostraron que el consumo de kéfir enriquecido con *Lactobacillus fermentum* ME-3, no el kéfir placebo, disminuyó significativamente el nivel de HbA1c ($p = 0,015$). Además, a las 8 semanas solamente el kéfir con ME-3 disminuyó significativamente el nivel de IL-6 ($p < 0,01$), la relación de TG/HDL-Col (un marcador para la resistencia a la insulina, $p = 0,02$), así como el nivel de OxLDL y aumentó significativamente el nivel de adiponectina ($p < 0,003$). Por
- 40 tanto, estos datos en conjunto muestran que las composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 ayudan a evitar el riesgo, alivian los síntomas y tratan afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular). Los datos de 8 semanas frente a los datos de 4 semanas demostraron que el consumo de kéfir enriquecido con *Lactobacillus fermentum* ME-3, no el kéfir placebo, disminuyó significativamente el nivel de HbA1c ($p = 0,015$).

45 Ejemplo 4

- Se reclutaron veinticinco voluntarios asintomáticos (16 mujeres y 9 hombres) en un estudio clínico sin enmascaramiento. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: una infección aguda en curso; diabetes; historia
- 50 de alergia alimentaria o enfermedad gastrointestinal; uso de cualquier agente antimicrobiano dentro del mes anterior o uso de cualquier medicación simultánea habitual incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos, estatinas o anticoncepción hormonal; embarazo o lactancia; abuso de alcohol; uso de drogas; dieta especial. Durante la intervención y durante las dos semanas anteriores, se les pidió a los participantes que evitaran las vitaminas o los complementos minerales, los cambios en los hábitos dietéticos habituales y la actividad física diaria y el uso de
- 55 alimentos a base de probióticos u otros kéfires/yogures. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado y tenían la opción de retirarse del estudio en cualquier momento. El Comité de Revisión de la Ética (ERC) en Investigación Humana de la Universidad de Tartu aprobó el protocolo del estudio (protocolo 229/T-18). Este estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial.

- 60 Las cápsulas contenían *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico y la dosis diaria (2 cápsulas) se muestra a continuación.

Una dosis diaria preferida (2 cápsulas) comprende:

Ingrediente	Cantidad
Levadura de arroz rojo	666 mg (10 mg de monacolina K)
<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	60 mg (6 mil millones de UFC)
Ubiquinol (Kaneka QH™)	30 mg
L-cisteína	30 mg
Vitamina E	10 mg (85 % de la dosis diaria recomendada)
Vitamina B1	0,66 mg (60 % de la dosis diaria recomendada)
Vitamina B6	1 mg (72 % de la dosis diaria recomendada)
Vitamina B9	100 mg (50 % de la dosis diaria recomendada)
Vitamina B12	1,5 mg (60 % de la dosis diaria recomendada)

Esto está disponible en el mercado como Reg'Activ Cholesterol (<http://www.regactiv.com/en/produits/product-1>).

- 5 Después de un periodo de introducción de dos semanas, se obtuvieron muestras de sangre en ayunas convencional basal (de la vena antecubital). Las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis. Después los participantes recibieron 2 cápsulas/por día durante cuatro semanas. Después de eso se obtuvo sangre en ayunas convencional. Se sometieron a ensayo índices sanguíneos habituales: HbA1c usando un analizador automatizado Hitachi 912 certificado en el laboratorio clínico del centro (Roche Diagnostics LDL-Col y HDL-Col). La hsCRP se determinó
10 mediante un ensayo inmunturbidimétrico potenciado por partículas de látex (Roche Diagnostics GmPh, Alemania) con el analizador automático Hitachi 912 (Pihl et al., 2003). Los niveles plasmáticos de IL-6 se midieron mediante un ELISA usando un kit disponible en el mercado (Inmunoensayo de IL-6 Humana, número del catálogo D6050, R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EE.UU.); los niveles plasmáticos de IL-10 se midieron mediante un ELISA usando un kit disponible en el mercado (Inmunoensayo de IL-10 Humana, número del catálogo D1000B, R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EE.UU.) y los niveles plasmáticos de adiponectina se midieron mediante un ELISA usando un kit
15 disponible en el mercado (Adiponectina Total Humana/Acrp30, número del catálogo DRP300, SRO300 PDRP300, R&D Systems Inc.®, Minneapolis, EE.UU.).

Estadísticas

- 20 Se realizaron cálculos usando paquetes de software estadístico disponibles en el mercado (Statistics para Windows, Stat Soft Inc. y Graph Pad PRISM Versión 2.0) y el software R, versión 1.6.0 para Windows (www.r-project.org). Todos los valores se proporcionan como media y desviación típica (media $\pm$ DT). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se determinaron mediante el uso del ensayo t de Student. En todos los análisis, los
25 valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Las correlaciones entre las variables se examinaron mediante análisis de regresión lineal (software R, versión 2.0.1 para Windows).

Tabla 2. Marcadores y señal de intolerancia/sensibilidad a la insulina (TG/HDL-Col) a 0 semanas y después del consumo de cápsulas que contenían *Lactobacillus fermentum* ME-3 probiótico, 2 cápsulas/por día, 4 semanas (un
30 ensayo clínico sin enmascaramiento).

	Sujetos clínicamente sanos, n = 25	
	0 semanas	4 semanas
Colesterol (mmol/l)	6,6 $\pm$ 1,0	5,7 $\pm$ 0,8 p < 0,0001
LDL-Col (mmol/l)	4,5 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 0,8 p < 0,00001
HDL-Col (mmol/l)	1,66 $\pm$ 0,33	1,70 $\pm$ 0,35
TG (mmol/l)	1,5 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,3 p < 0,03
TG/HDL-Col	1,0 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,3 p < 0,03
hs CRP (mg/l)	2,31 $\pm$ 1,44	1,88 $\pm$ 0,95 p = 0,035
% de HbA1c	5,68 $\pm$ 0,21	5,51 $\pm$ 0,20 p = 0,043
LDLox U/l	80,58 $\pm$ 16,69	65,77 $\pm$ 12,6 p < 0,0003
IL-6 (pg/ml)	2,2 $\pm$ 0,6	1,9 $\pm$ 0,5 p < 0,05
IL-10 (pg/ml)	6,4 $\pm$ 2,0	7,3 $\pm$ 2,6 p = 0,034

- El nivel de LDL-Col, así como el colesterol total y el LDLox disminuyeron significativamente en el 95 % de todos los participantes y el aumento del HDL-Col mostró una tendencia a aumentar después de 4 semanas de consumo de cápsulas de *Lactobacillus fermentum* ME-3. El nivel de los marcadores inflamatorios hsCRP e IL-6 disminuyó
35 después del consumo de 4 semanas de cápsulas de *Lactobacillus fermentum* ME-3, así como el nivel de Hb glucosilada (HbA1c) y el nivel de interleucina antiinflamatoria IL-10 aumentaron. El grado de respuesta en el caso de la hsCRP y la IL-10 fue de aproximadamente el 60 %, para la IL-6 fue del 70 % y para la HbA1c fue de aproximadamente el 60 %.

La resistencia a la insulina se asocia a una disfunción autónoma. Una disminución atenuada en la frecuencia cardíaca después del ejercicio (o recuperación de la frecuencia cardíaca [RFC]) predice la mortalidad por todas las causas y se cree que refleja la actividad parasimpática reducida. Usando la relación triglicérido/HDL-Col como marcador de resistencia a la insulina (un marcador relacionado con la prediabetes, diabetes) los inventores descubrieron que, después del consumo de las cápsulas, la relación TG/HDL-Col disminuyó significativamente y mostró un grado de respuesta de aproximadamente el 76 %. Por tanto, los datos de los Ejemplos 3 y 4 en conjunto muestran que las composiciones que comprenden *Lactobacillus fermentum* ME-3 ayudan a prevenir el riesgo, a aliviar los síntomas y a tratar las afecciones relacionadas con el síndrome metabólico (prediabetes, diabetes, enfermedad cardiovascular).

Ejemplo 5

Composiciones a base de chocolate de *Lactobacillus fermentum* ME-3

Se investigó la estabilidad de *Lactobacillus fermentum* ME-3 liofilizado en chocolate a 42 °C durante 3 semanas. Los materiales utilizados fueron *Lactobacillus fermentum* ME-3 liofilizado 10^8 UFC/g (producido por Probiotical SpA, Novara, Italia) y chocolates disponibles en el mercado con diferente concentración de cacao. Se fundieron 50 gramos de chocolate que consistía, respectivamente, en un 85 %, un 70 %, un 56 % y un 30 % de cacao, en agua caliente y se mantuvieron a 42 °C usando un termostato. La evaluación de las UFC se hizo en el punto temporal 0 y en la primera, la segunda y la tercera semana. Las muestras de chocolate se pesaron y se añadió la cantidad respectiva de tampón PBS con una relación de 1:9. Se hicieron diluciones a 10^1 - 10^8 y se sembraron en placas con medio deMan, Rogosa y Sharpe (MRS).

Se confirmó la supervivencia a las 3 semanas. La pérdida de recuento de células se mantuvo principalmente por debajo de 1 log (en el chocolate A: 7,4-8,2; B: 7,3-8,3; C: 6,9-7,8; D: 6,4-7,9), excepto en el chocolate D con un 85 % de cacao (véase la figura 2).

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241 para su uso en la prevención o el tratamiento, sola o como un componente adyuvante, de un trastorno relacionado con el síndrome metabólico seleccionado entre prediabetes, enfermedades cardiovasculares y diabetes de tipo 2, en un sujeto que es asintomático para dicho trastorno relacionado con el síndrome metabólico y que tiene un nivel de CRP de 3-10 mg/l.
5
2. Una composición que comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241 para su uso en la prevención o el tratamiento, sola o como un componente adyuvante, de un trastorno relacionado con el síndrome metabólico seleccionado entre prediabetes, enfermedades cardiovasculares y diabetes de tipo 2 mediante:
10
 - a. la disminución del nivel de hemoglobina glucosilada HbA1c;
 - b. la disminución o la prevención de la inflamación de grado bajo a nivel celular; y
 - c. el aumento del nivel de adiponectina,
15
simultáneamente en un sujeto que es asintomático para dicho trastorno relacionado con el síndrome metabólico y que tiene un nivel de CRP de 3-10 mg/l.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la disminución o la ausencia de inflamación a nivel celular se mide usando el marcador proinflamatorio IL-6.
20
4. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicha composición es un producto alimentario, un complemento alimentario o una composición farmacéutica.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el producto alimentario es un producto alimentario médico o un producto alimentario funcional.
25
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en la que el producto alimentario es un producto lácteo tal como leche, yogur, queso, kéfir o un producto lácteo fermentado a base de leche o suero de leche o un producto de chocolate.
30
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicha composición se administra antes de, simultáneamente con o posteriormente a una composición antiinflamatoria, una o más vitaminas y/o monacolina K.
35
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicha composición comprende adicionalmente una o más vitaminas y/o monacolina K.
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicha composición comprende *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241 en una forma encapsulada, en una forma liofilizada, en una forma recubierta, en una cápsula, en un comprimido o en un polvo.
40
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicha composición comprende 10^6 - 10^{11} UFC de *Lactobacillus fermentum* ME-3 cepa DSM 14241.

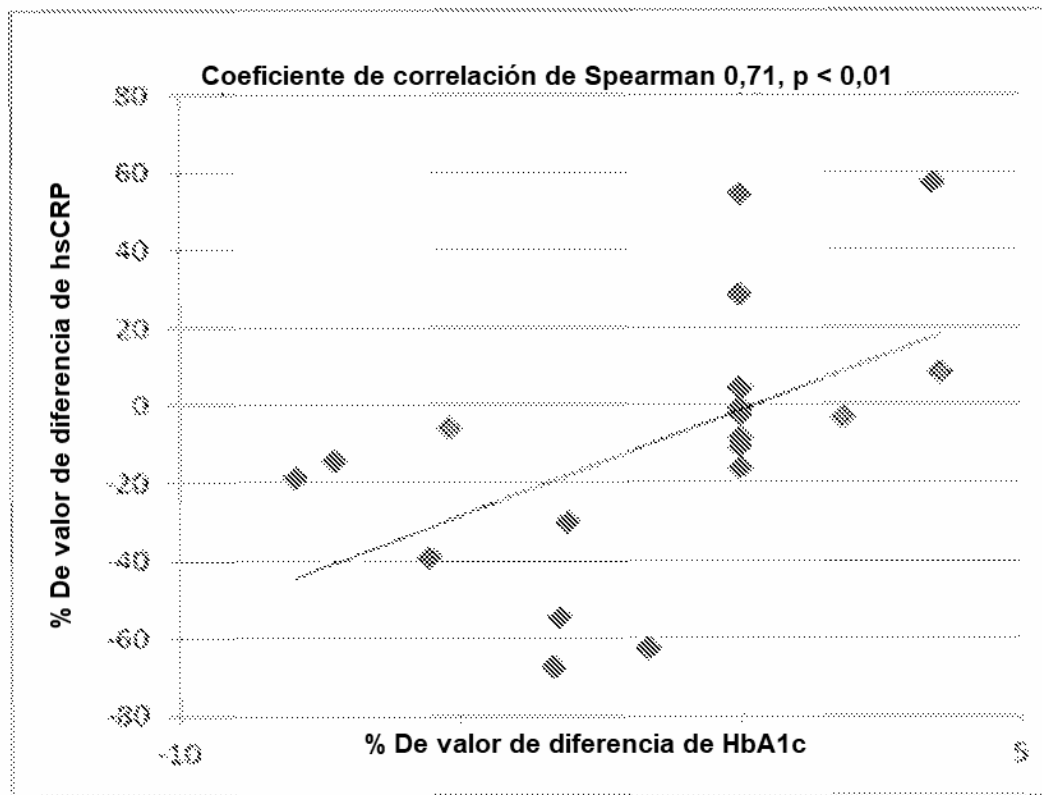


Figura 1

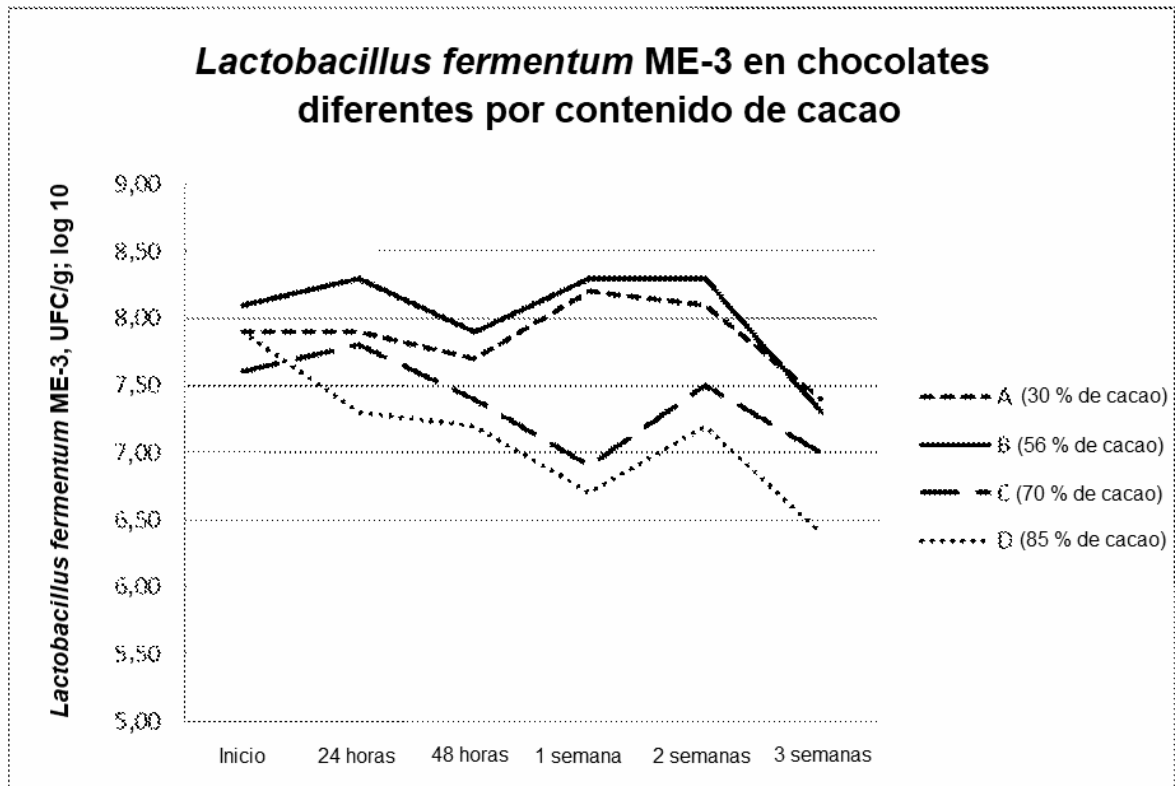


Figura 2