

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 584**

51 Int. Cl.:

A61K 35/745 (2015.01)
A61K 35/747 (2015.01)
A23K 10/18 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A23K 50/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2007 PCT/IB2007/001186**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2007 WO07085970**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007 E 07734501 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 1981516**

54 Título: **Uso de microorganismos probióticos para el tratamiento y prevención de obesidad y trastornos relacionados**

30 Prioridad:

27.01.2006 US 762491 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.12.2018

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**RAUTONEN, NINA;
PUTAALA, HELI;
OUWEHAND, ARTHUR;
TIIHONEN, KIRSTI;
KORCZYNSKA, MARTA, ZDZISLAWA y
NOORDMAN, WOUTER HERMAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 693 584 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 microorganismos probióticos para el tratamiento y prevención de obesidad y trastornos relacionados

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a la saciedad del apetito.

10 En una realización la presente invención se refiere al uso de al menos una cepa de un microorganismo, preferentemente una bacteria ácido láctica, preferentemente una bacteria probiótica, tal como *Lactobacillus* spp. (por ejemplo, *L. acidophilus* y/o *L. salivarius*) y/o *Bifidobacterium* spp. (tal como *B. lactis*), para preparar un soporte administrado a seres humanos o animales para modular la señalización de la saciedad, preferentemente para inducir la saciedad.

15 Además la presente invención se refiere adicionalmente a al menos una cepa de un microorganismo, preferentemente una bacteria ácido láctica, preferentemente una bacteria probiótica, tal como *Lactobacillus* spp. (por ejemplo *L. acidophilus* y/o *L. salivarius*) y/o *Bifidobacterium* spp. (tal como *B. lactis*), para uso en el tratamiento o reducción o gestión de la obesidad y/o para uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la obesidad.

20 Antecedentes técnicos

La dieta y la pérdida de peso por razones estéticas (cosméticas) son practicadas por personas de todo el mundo. Los científicos, desarrolladores de medicamentos y desarrolladores de alimentos han introducido en la última década una variedad de supresores del apetito y/o medicamentos para perder peso y/o gamas de alimentos "saludables" para ayudar a las personas que hacen dieta en su difícil situación de perder peso.

La dieta no se limita a los seres humanos, sino que incluye a otros animales, con planes de dieta para mascotas siendo comunes.

30 Desde una perspectiva evolutiva, los animales (incluidos seres humanos) se han adaptado a atiborrarse de comida y almacenar energía en caso de hambruna. Desafortunadamente, sin embargo, aunque esto fue útil en momentos en los que la comida escaseaba, ahora en momentos en los que es posible comer constantemente, esto puede llevar al sobrepeso y, en algunos casos, a la obesidad.

35 La obesidad se ha convertido en un importante problema de salud pública. Las patologías causadas o exacerbadas por la obesidad incluyen hipertensión, diabetes mellitus, apnea del sueño, hipoventilación relacionada con la obesidad, problemas de espalda y articulaciones, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de hígado graso no alcohólico y enfermedad por reflujo gastroesofágico.

40 El índice de masa corporal (IMC) (calculado como peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros) es la medida más comúnmente aceptada para el sobrepeso y/o la obesidad. Un IMC superior a 25 se considera sobrepeso, mientras que la obesidad se define como un IMC de 30 o más, con un IMC de 35 o más considerado como comorbilidad grave y un IMC de 40 o más considerado obesidad mórbida.

45 La obestatina es una hormona peptídica que se produce en las células que revisten el estómago y el intestino delgado de varios mamíferos, incluidos los seres humanos; reduce drásticamente el apetito en ratones y se espera que haga lo mismo en seres humanos.

50 De manera sorprendente, la obestatina está codificada por el mismo gen que también codifica la grelina, una hormona peptídica que aumenta el apetito. Tanto la grelina como la obestatina se obtienen a partir de una prohormona producida por el mismo gen y se dividen por procesamiento postraduccional. La finalidad de este mecanismo sigue sin estar clara, sin embargo, explica los hallazgos anteriores, en particular que la eliminación del gen de la grelina de ratones no redujo de forma significativa su apetito.

55 La obestatina se ha considerado para su uso como un fármaco contra la obesidad, sin embargo, se debería administrar como un aerosol nasal o mediante inyección, ya que el péptido es destruido por los jugos gástricos.

60 En la actualidad hay pocos tratamientos para la obesidad. De los dos fármacos aprobados para uso en Estados Unidos, el Xenical™ de Roche (que bloquea la digestión de la grasa) es relativamente eficaz para estimular la pérdida de peso, pero tiene algunos efectos secundarios desagradables. El otro fármaco aprobado para uso en Estados Unidos es Meridia™ de los Laboratorios Abbot, que supuestamente no se ha demostrado que sea particularmente eficaz (Schaffer A. www.slate.com/id/2117332, 26 de abril de 2005).

65 Un fármaco experimental en la actualidad en ensayos es Rimonabant™ (un antagonista del receptor de cannabinoides) que supuestamente detienen los antojos en seres humanos, reduciendo de este modo los apetitos de los pacientes obesos.

Por lo tanto, existe una necesidad de una herramienta eficaz para reducir el peso, prevenir el aumento de peso, facilitar la pérdida de peso y/o tratar la obesidad.

5 Entre los microorganismos, en particular entre las bacterias, algunos tienen una influencia positiva en el sistema inmunológico en particular las bacterias ácido lácticas y las bifidobacterias, y se describen como bacterias o cepas "probióticas".

10 Generalmente, por bacteria o cepa probiótica se hace referencia a un microorganismo no patógeno que, cuando se ingiere, ejerce un efecto beneficioso sobre la salud o la fisiología del hospedador. Estas cepas probióticas generalmente tienen la capacidad de sobrevivir al paso a través de la parte superior del tracto digestivo. No son patogénicas, no son tóxicas y ejercen su efecto beneficioso sobre la salud por un lado a través de las interacciones ecológicas con la flora residente en el tracto digestivo, y por otro lado a través de su capacidad para influir en el sistema inmunológico de manera positiva a través del "GALT" (tejido linfoide asociado al intestino). Dependiendo de la definición de probióticos, estas bacterias, cuando se administran en un número suficiente, tienen la capacidad de avanzar vivas a través del intestino, sin embargo, no atraviesan la barrera intestinal y, por lo tanto, sus efectos principales se inducen en el lumen y/o la pared del tracto gastrointestinal. A continuación forman parte de la flora residente durante el periodo de administración. Esta colonización (o colonización transitoria) permite que las bacterias probióticas ejerzan un efecto beneficioso, tal la represión de microorganismos potencialmente patógenos presentes en la flora e interacciones con el sistema inmunológico del intestino.

20 Las cepas probióticas usadas más comúnmente, en particular en productos lácteos, son principalmente bacterias y levaduras de los siguientes géneros: *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Saccharomyces spp.*

25 Entre los efectos probióticos registrados por estas bacterias, se pueden mencionar por ejemplo la mejora de la tolerancia a la lactosa, potenciación de la función inmunitaria, prevención o tratamiento de infecciones gastrointestinales y urogenitales y reducción del riesgo de cáncer. Algunas bacterias probióticas se usan en la técnica anterior para el tratamiento o prevención de obesidad y trastornos relacionados. Por ejemplo, el documento WO02/38165 desvela el uso de una cepa de *Lactobacillus plantarum* 299 para reducir el riesgo de factores implicados en el síndrome metabólico. La publicación internacional WO2004/014403 enseña el uso de *Lactobacillus reuteri* PRD202 y *Lactobacillus fermentum* NM316 para disminuir el peso corporal y para la prevención y tratamiento de obesidad y diabetes mellitus. El documento US2005/186189 se refiere al uso de *Lactobacillus rhamnosus* GM-020 para el tratamiento de obesidad y complicaciones de la misma.

35 Aspectos del sumario

40 Un hallazgo trascendental de la presente invención es que los microorganismos, en particular las bacterias ácido lácticas y/o microorganismos probióticos y/o bacterias ácido lácticas probióticas, y/o un metabolito de los mismos de acuerdo con la presente invención inducen saciedad, en particular saciedad postprandial, en un sujeto.

45 En particular, un hallazgo trascendental de la presente invención es que las bacterias ácido lácticas (tales como *Lactobacillus acidophilus*, por ejemplo la cepa PTA-4797; *Lactobacillus salivarius*; y/o *Bifidobacterium lactis*) y/o un metabolito de las mismas induce saciedad, en particular saciedad postprandial, en un sujeto.

50 En un aspecto la presente invención proporciona el uso de una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en la fabricación de un soporte para administración a un sujeto para el tratamiento y/o prevención de obesidad y/o para la prevención de una enfermedad causada por obesidad; en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo. En otro aspecto la presente invención proporciona una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo para uso en un método para tratar y/o prevenir la obesidad y/o para la prevención de una enfermedad causada por obesidad en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método no terapéutico para reducir el exceso de peso en un sujeto no obeso que comprende la administración de una cantidad eficaz de una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo, en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en la fabricación de un soporte para administración a un sujeto para el tratamiento y/o prevención de obesidad y/o para la prevención de una enfermedad causada por obesidad; en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo.

65 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo para uso en un método para tratar y/o prevenir la obesidad y/o prevenir una enfermedad causada por la

obesidad en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método no terapéutico para reducir el exceso de peso en un sujeto no obeso que comprende la administración de una cantidad eficaz de una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo, en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo.

10 Aspectos detallados

Los aspectos detallados de la presente invención se detallan a continuación. en parte de algunos de los aspectos detallados se discuten en secciones separadas. Esto se hace para facilitar la referencia y no es limitante en modo alguno.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo para administración a un sujeto para modular la señalización de la saciedad (por ejemplo, en el intestino).

20 En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en la fabricación de un soporte para administración a un sujeto para modular la señalización de la saciedad (por ejemplo, en el intestino).

25 La expresión "modular la señalización de la saciedad" como se usa en el presente documento hace referencia a variar la amplitud y/o frecuencia de la señalización neuronal y/o endocrina asociada con la saciedad.

En algunas realizaciones, "modular la señalización de la saciedad" se refiere a variar la amplitud y/o frecuencia de marcadores de saciedad.

30 El término "saciedad" como se usa en el presente documento se refiere al estado de estar saciado o con exceso de apetito, es decir, plenitud más allá del deseo de estar totalmente satisfecho.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en la fabricación de un soporte para administración a un sujeto para inducir la saciedad.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de obesidad, y/o una enfermedad o trastorno relacionados con la obesidad.

40 Además en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para modular la señalización de la saciedad (por ejemplo, en el intestino) en un sujeto, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para inducir la saciedad en un sujeto, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo.

50 En el presente documento se desvela un método para tratar y/o prevenir el exceso de peso, incluyendo obesidad, y/o una enfermedad o trastorno causados por el exceso de peso, incluyendo una enfermedad relacionada con la obesidad en un sujeto, de todo que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método cosmético para reducir el exceso de peso en un sujeto no obeso, método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo.

60 En otro aspecto la presente invención proporciona un uso cosmético de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en la fabricación de un soporte para administración a un sujeto no obeso para inducir la saciedad.

En el presente documento se enseña un método para seleccionar un microorganismo y/o un metabolito del mismo para administración a un sujeto para inducir la saciedad y/o tratar el exceso de peso, incluyendo la obesidad, en el que el método comprende las etapas de:

65 a) poner un microorganismo y/o un metabolito del mismo en contacto con al menos una célula epitelial,

b) detectar la expresión de un marcador de saciedad (tal como proteína tirosina tirosina (PYY)) en al menos una célula epitelial.

5 En el presente documento se desvela un método para seleccionar un microorganismo y/o un metabolito del mismo para preparar un soporte para administración a un sujeto para inducir la saciedad y/o tratar el exceso de peso, incluyendo la obesidad, en el que el método comprende las etapas de:

10 a) poner un microorganismo y/o un metabolito del mismo en contacto con al menos una célula epitelial,
b) detectar la expresión de un marcador de saciedad (tal como proteína tirosina tirosina (PYY)) en al menos una célula epitelial.

15 La célula o células epiteliales usadas durante las etapas a) o b) provienen preferentemente de la línea de células Caco-2. se trata de una línea de células de cáncer de colon. También pueden ser células aisladas y purificadas de biopsias de elementos de operaciones en seres humanos. Las células Caco-2 están disponibles al público en un número de catálogos de líneas celulares, tal como a partir de la ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) con un número HTB-37, por ejemplo.

20 La etapa a) se realiza preferentemente usando de 1 a 100 células de microorganismo por una célula epitelial que se va a someter a ensayo con al menos una célula epitelial.

El periodo de contacto, durante la etapa a), puede variar de 0 horas a 24 horas, y es preferentemente de aproximadamente 3 horas o al menos 3 horas.

25 Generalmente, la puesta en contacto con las células de acuerdo con la etapa a) se realiza bajo temperatura estándar, atmósferas modificadas y condiciones de esterilidad bien conocidas para una persona con experiencia en la materia, en particular en condiciones de cultivo de células epiteliales *in vitro*.

30 La etapa b) del proceso de selección de acuerdo con la invención se realiza preferentemente detectando la expresión, y opcionalmente su nivel, del ARN mensajero del marcador de saciedad (tal como PYY), por ejemplo mediante PCR entre otros mediante PCR cuantitativa o mediante inmunohistoquímica o mediante radioinmunoensayo. Para la detección de ARNm y su medición se pueden usar otras técnicas bien conocidas por una persona con experiencia en la materia.

35 Para algunos aspectos, el microorganismo de acuerdo con la presente invención puede ser viable.

40 Para algunos aspectos, el microorganismo de acuerdo con la presente invención puede estar muerto o no ser viable. Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que los metabolitos, por ejemplo los metabolitos solubles, asociados con, por ejemplo producidos por, el microorganismo puede estar causando el efecto ventajoso del microorganismo. Para algunos aspectos, no es necesario por lo tanto que las células del microorganismo estén en contacto directo con las células diana.

45 Para algunos aspectos, se cree que uno o más metabolitos asociados con, por ejemplo producidos por, el microorganismo pueden ser adecuados para conseguir los efectos beneficiosos que se enseñan en el presente documento. En tales casos, puede no ser necesario incluir los propios microorganismos.

50 La expresión "metabolito del mismo" como se usa en el presente documento se refiere a un extracto bruto de un medio de cultivo en el que un microorganismo de acuerdo con la presente invención se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo. De forma adecuada, para algunos aspectos, el metabolito puede ser uno o más compuestos aislados y/o purificados a partir del medio de cultivo y/o el microorganismo.

En algunos aspectos de forma adecuada el metabolito puede ser un metabolito soluble.

En algunos aspectos el metabolito puede ser un metabolito soluble en agua.

55 En algunos aspectos el metabolito puede ser un metabolito soluble en lípido. De forma adecuada, el metabolito puede ser un metabolito que está presente en la fase sobrenadante aislada a partir de un cultivo del microorganismo usando la metodología tal como se enseña en el documento de patente US 5.578.302 y/o de acuerdo con los ejemplos que se enseñan en el presente documento.

60 En un aspecto el metabolito se puede obtener (preferentemente obtener) mediante cultivo de *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, *Bifidobacterium lactis* 420, *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33 en un medio de cultivo hasta que la DO del cultivo a $\lambda 600$ alcanza al menos 0,6, preferentemente de 0,6 a 1,5; eliminación de las bacterias mediante centrifugación y/o filtración (tal como, por ejemplo, centrifugación a 25 °C, 5 min, 3000 g y/o filtración estéril) para dar como resultado un filtrado que comprende dicho metabolito(s).

65

De forma adecuada, el metabolito(s) se puede obtener (preferentemente obtener) usando un medio de cultivo de MRS ya sea con azúcar al 1,0 % o sin azúcar. De forma adecuada, el metabolito(s) se puede obtener (preferentemente obtener) por cultivo de las bacterias a 37 °C. De forma adecuada, el metabolito(s) se puede obtener (preferentemente obtener) por cultivo de las bacterias por vía anaeróbica.

5 En ensayos *in vitro* el metabolito en forma del filtrado se puede mezclar opcionalmente con células de cultivo tisular en un medio de cultivo tisular. Preferentemente, el filtrado que contiene el metabolito(s) se mezcla con el medio de cultivo celular de modo que la mezcla de filtrado/medio de cultivo tisular mixture comprende al menos un 10 % en v/v de filtrado y como máximo un 90 % en v/v de medio de cultivo tisular.

10 Cuando el metabolito(s) se carga sobre un soporte, la proporción de mezcla de filtrado/soporte es preferentemente 1:10 o superior.

15 De forma adecuada, el microorganismo de acuerdo con la presente invención se puede cocultivar con una o mas células diana permitiendo de ese modo la transferencia de fracciones solubles.

De forma adecuada, el microorganismo puede no estar en contacto de célula a célula con la célula(s) diana.

20 De forma adecuada, el microorganismo de acuerdo con la presente invención o el metabolito del mismo puede estar en forma de una suspensión bacteriana, antes o después de su congelación, en la forma de concentrados, Ya sea en forma seca, liofilizada o congelada. Sea cual sea la forma usada, la cepa se puede congelar.

25 De forma adecuada, el microorganismo y/o metabolito del mismo de acuerdo con la presente invención puede contener diferentes aditivos. De forma adecuada los aditivos se pueden añadir durante su secado y/o durante su liofilización.

30 El microorganismo usado de acuerdo con la presente invención, (tal como una cepa de *Lactobacillus* spp.; por ejemplo una cepa de *Lactobacillus acidophilus* y/o *L. salivarius* y/o una cepa de *Bifidobacterium*, por ejemplo *B. lactis*), puede comprender de 10^6 a 10^{12} CFU de bacterias/g de soporte, y más particularmente de 10^8 a 10^{12} CFU de bacterias/g de soporte, preferentemente de 10^9 a 10^{12} CFU/g para la forma liofilizada.

35 De forma adecuada el microorganismo usado de acuerdo con la presente invención, (tal como una cepa de *Lactobacillus* spp.; por ejemplo una cepa de *Lactobacillus acidophilus* y/o *L. salivarius* y/o una cepa de *Bifidobacterium*, por ejemplo *B. lactis*), se puede administrar alguna dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis. Con el término "por dosis" se hace referencia a que esta cantidad de microorganismo se proporciona a un sujeto ya sea al día o por ingesta, preferentemente al día. Por ejemplo, si el microorganismo se va a administrar en un soporte alimentario (por ejemplo en un yogur) - entonces el yogur contendrá preferentemente de aproximadamente 10^8 a 10^{12} CFU del microorganismo. Como alternativa, sin embargo, esta cantidad de microorganismo se puede separar en múltiples administraciones cada una consistiendo en una cantidad más pequeña de carga microbiana - siempre y cuando la cantidad total de microorganismo recibida por un sujeto encuentro momento específico (por ejemplo cada periodo de 24 h) sea de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo, preferentemente de 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo.

45 De acuerdo con la presente invención una cantidad eficaz de al menos una cepa de un microorganismo puede ser al menos 10^6 CFU de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/dosis.

50 En un ejemplo, preferentemente el microorganismo usado de acuerdo con la presente invención, (tal como una cepa de *Lactobacillus* spp.; por ejemplo una cepa de *Lactobacillus acidophilus* y/o *L. salivarius* y/o una cepa de *Bifidobacterium*, por ejemplo *B. lactis*) se puede administrar alguna dosificación de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día. Por lo tanto, la cantidad eficaz en esta realización puede ser de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día, preferentemente de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{12} CFU de microorganismo/día.

60 CFU se refiere a "unidades formadoras de colonias". Por gramo de soporte se hace referencia preferentemente al producto alimentario o al soporte farmacéuticamente aceptable.

65 De forma ventajosa, la presente invención es una herramienta eficaz para reducir el aumento de peso y/o facilitar la pérdida de peso y/o tratar o prevenir la obesidad y/o tratar o aliviar trastornos o enfermedades relacionadas con o causadas por la obesidad o que se convierten en sobrepeso.

Sin desear quedar ligado por la teoría, el microorganismo y/o metabolito del mismo puede mediar en la pérdida de peso y/o dar como resultado saciedad aumentando la señalización de la saciedad en el intestino.

5 Sin desear quedar ligado por la teoría el microorganismo y/o metabolito puede mediar en la pérdida de peso y/o dar como resultado saciedad mediante su efecto en una hormona intestinal y/o en uno o más receptores encontrados en el intestino.

Alguno de los reguladores periféricos del apetito, incluyendo hormonas intestinales, se discuten en Stanley *et al.*, *Physiol. Review* 85: 1131-1158 2005.

10 Sin desear quedar ligado por la teoría el microorganismo y/o metabolito del mismo puede mediar en la pérdida de peso y/o dar como resultado o saciedad mediante su efecto en un marcador de saciedad (tal como la hormona intestinal Péptido Tirosina Tirosina (PYY) por ejemplo).

15 Saciedad

El término "saciedad" como se usa en el presente documento se refiere al estado de estar saciado o con exceso de apetito, es decir, plenitud más allá del deseo de estar totalmente satisfecho.

20 De forma adecuada, la presente invención puede ser para aumentar la saciedad.

Preferentemente la presente invenciones para inducir y/o aumentar la saciedad postprandial.

25 La persona con experiencia en la materia podría comprender que la saciedad y la saciedad postprandial se puede medir en un número de formas.

Por ejemplo, sin desea quedar ligado por la teoría existe una relación entre el nivel de marcador(s) de saciedad (tal como la hormona intestinal PYY ya sea en la sangre o en el intestino) y el nivel de saciedad.

30 Por lo tanto, la saciedad y/o la saciedad postprandial se puede medir determinando el nivel de uno o más marcadores de saciedad (por ejemplo PYY ya sea en la sangre del sujeto y/o en el intestino del sujeto). De forma adecuada las muestras se pueden tomar a intervalos antes de y a intervalos después de que el sujeto consuma una comunidad específica. Por ejemplo, el aumento de los niveles de expresión de PYY y/o aumento de los niveles de PYY puede indicar saciedad. Las personas con experiencia habitual en la materia conocen las relaciones entre otros marcadores de saciedad y la saciedad.

35 Además, o como alternativa, la saciedad y/o saciedad postprandial se puede medir en estudios con animales midiendo la ingesta de alimento por parte del animal y/o el intervalo de tiempo entre la alimentación del animal y/o el peso del animal. Una reducción de la ingesta de alimento y/o peso del animal indica saciedad. Además, o como una alternativa, un aumento en el intervalo de tiempo entre la alimentación del animal indica saciedad.

40 Además, o como alternativa, un sujeto puede medir de forma subjetiva la saciedad y/o saciedad postprandial mediante el uso de un cuestionario en el que a los sujetos se les hacen las siguientes preguntas: "¿cuánta hambre tiene?", "¿está muy lleno?", "¿cuánto puede comer?" y "¿cuál es su deseo de comer?". Su percepción se puede clasificar de 0 (el valor más bajo) a 10 (el valor más elevado) en una escala analógica visual de 100 mm (tal como se enseña en Stock *et al.*, *J. of Clinical Endocrinology and Metabolism*, publicado en primer lugar el 18 de enero de 45 2005 como doi:10.1210/jc.2004.1251). Al sujeto se le pide preferentemente que complete el cuestionario a intervalos antes y a intervalos después de que el sujeto consuma una comida específica.

En algunos aspectos la saciedad puede hacer referencia a uno o más de los siguientes:

- 50 a) saciedad postprandial;
b) una reducción del hambre antes de las comidas;
c) un fortalecimiento de la saciedad dentro de la comida para reducir el tamaño de la comida; y/o
d) un aumento del estado de saciedad entre comidas, que puede evitar los aumentos compensatorios en el número de comidas y/o puede reducir el picoteo entre comidas.

55 En algunos aspectos la saciedad se puede medir como uno o más de los siguientes:

- 60 i) una reducción de la ingesta de alimentos por el sujeto en comparación con un sujeto de ensayo comparativo y/o en comparación con el tratamiento previo del sujeto;
ii) una reducción del peso corporal del sujeto en comparación con el tratamiento previo del sujeto;
iii) una reducción de la adiposidad en comparación con un sujeto de ensayo comparativo y/o en comparación con el tratamiento previo del sujeto.

Marcador de saciedad

La expresión "marcador de saciedad" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto(s) y/o hormona u hormonas intestinales implicadas en la regulación del apetito y/o ingesta de alimentos.

5 Los marcadores de saciedad incluyen, pero no se limitan a, polipéptido pancreático (PYY), colecistoquinina (CCK), péptido 1 similar al Glucagón (GLP-1), insulina, leptina, grelina, orexinas, neuropéptido Y hipotalámico orexigénico (NPY), ácido acético, amilina, y oxintomodulina.

10 En una realización, el marcador de saciedad es preferentemente una hormona intestinal.

En una realización el marcador de saciedad puede ser uno o más de PYY, CCK, GLP-1, insulina, leptina, grelina, orexinas, neuropéptido Y hipotalámico orexigénico (NPY), amilina o oxintomodulina.

15 De forma adecuada, el marcador de saciedad se puede seleccionar entre uno cualquiera aún más de los siguientes: PYY, CCK, GLP-1 e insulina.

20 Sin desear quedar ligado por la teoría el microorganismo y/o metabolito del mismo de la presente invención puede inducir la saciedad aumentando los niveles en plasma de uno cualquiera o más de: PYY, CCK, GLP-1 e insulina. El aumento se compara con un control equivalente, pero al que no se le administraron el microorganismo y/o metabolito del mismo.

25 En una realización, el microorganismo y/o metabolito del mismo de la presente invención puede inducir saciedad aumentando los niveles de uno cualquiera o más de los siguientes marcadores de saciedad en el intestino: PYY, CCK, GLP-1 e insulina. El aumento se compara con un control al que no se le ha administrado el microorganismo y/o metabolito del mismo.

30 Sin desear quedar ligado por la teoría el microorganismo y/o metabolito del mismo de la presente invención puede inducir saciedad aumentando el nivel de leptina en sangre periférica y/o mediante disminución del nivel de leptina en el cerebro. El aumento se compara con un control al que no se le ha administrado el microorganismo y/o metabolito del mismo.

35 En una realización, el microorganismo y/o metabolito del mismo de la presente invención puede aumentar el nivel de PYY. El aumento se compara con un control al que no se le ha administrado el microorganismo y/o metabolito del mismo.

40 En una realización alternativa o adicional, el microorganismo y/o metabolito del mismo de la presente invención puede aumentar el nivel de CCK. El aumento se compara con un control al que no se le ha administrado el microorganismo y/o metabolito del mismo.

45 En otra realización, el microorganismo y/o metabolito del mismo de la presente invención puede inducir saciedad disminuyendo el nivel de una o más hormonas intestinales en el intestino y/o en el plasma tal como una cualquiera o más de las siguientes: grelina y orexinas. La disminución se compara con un control al que no se le ha administrado el microorganismo y/o metabolito del mismo.

50 En otra realización, el marcador de saciedad puede ser ácido acético. En esta realización, el microorganismo y/o metabolito del mismo de la presente invención puede inducir saciedad aumentando el nivel de ácido acético en la sangre. El aumento se compara con un control al que no se le ha administrado el microorganismo y/o metabolito del mismo.

Soporte

55 El soporte usado durante el uso de acuerdo con la presente invención es preferentemente un soporte farmacéuticamente aceptable o un producto alimentario. A continuación se proporciona información adicional con respecto tanto a alimentos como a agentes farmacéuticos.

60 Un soporte farmacéuticamente aceptable puede ser por ejemplo un soporte en forma de comprimidos formados mediante compresión, comprimidos, cápsulas, pomadas, supositorios o soluciones que se pueden beber. A continuación se proporcionan otras formas adecuadas.

65 Preferentemente, el soporte usado durante el uso de acuerdo con la invención es un producto alimentario tal como un suplemento alimentario, una bebida o un polvo a base de leche. Preferentemente es un producto lácteo de origen animal o vegetal. Como se indica a continuación adicionalmente, en el presente documento el término "alimento" se usa en su sentido más amplio - y cubre alimento para seres humanos así como alimento para animales (es decir, una alimentación).

5 La expresión "producto lácteo" como se usa en el presente documento pretende hacer referencia a la inclusión de un medio que comprende leche de origen animal y/o vegetal. Como leche de origen animal se puede mencionar la leche de vaca, de oveja, de cabra o de búfalo. Como leche de origen vegetal en el presente documento se puede mencionar cualquier sustancia fermentable de origen vegetal que se pueda usar de acuerdo con la invención, en particular con origen en sojas, arroz cereales.

Aún más preferentemente del soporte usado de acuerdo con la invención es una leche fermentada o leche humanizada.

10 **Sobrepeso/obesidad**

El índice de masa corporal (IMC) (calculado como peso en kilogramos dividido entre el cuadrado de la altura en metros) es la medición más comúnmente aceptada para sobrepeso y/o obesidad.

15 Un IMC que supera 25 se considera sobrepeso.

La obesidad se define como un IMC de 30 o más, con un IMC de 35 más siendo considerado una comorbidez grave y un IMC de 40 o más se considera obesidad mórbida.

20 El término "obesidad" como se usa en el presente documento incluye obesidad, obesidad por comorbidez y obesidad mórbida. Por lo tanto, el término "obesidad" como se usa en el presente documento se puede definir que hace referencia a un sujeto que tiene un IMC mayor o igual a 30.

25 En algunos aspectos de forma adecuada un sujeto obeso puede tener un IMC mayor o igual a 30, de forma adecuada 35, de forma adecuada 40.

30 La expresión "exceso de peso" como se usa en el presente documento hace referencia al exceso de peso del sujeto. La expresión "exceso de peso" como se usa en el presente documento hace referencia a que se considera que el sujeto tiene sobrepeso. El término "sobrepeso" como se usa en el presente documento hace referencia a que el sujeto tiene un IMC que supera 25.

El exceso de peso y/o obesidad se pueden medir usando el IMC. Por lo tanto una reducción del exceso de peso y/o obesidad se puede medir usando el IMC.

35 Una reducción en el exceso de peso y/o obesidad también (o como alternativa) se puede medir simplemente midiendo el peso del sujeto con respecto a un control y/o antes y después de la administración de los microorganismos y/o metabolito del mismo de acuerdo con la presente invención.

40 Sin desear quedar ligado por la teoría, también puede haber una relación entre los marcadores inflamatorios en suero o sangre (tales como proteína C reactiva y/o interleuquina 6 y/o TNF-RII por ejemplo) y obesidad. Además, También puede haber una correlación entre los marcadores inflamatorios en suero o sangre y el IMC. Por lo tanto, en una realización, los marcadores inflamatorios en sangre se pueden medir para determinar la obesidad y/o una reducción de la obesidad en un sujeto.

45 **Trastornos/enfermedades relacionados con o causados por un exceso de peso y/u obesidad**

50 Las afecciones de la salud (es decir, trastornos y/o enfermedades) causados o exacerbados por la obesidad incluyen hipertensión, diabetes mellitus, por ejemplo diabetes de tipo 2, apnea del sueño, hipoventilación relacionada con la obesidad, problemas de espalda y articulaciones, enfermedad cardiovascular, enfermedad del hígado graso no alcohólico enfermedad de reflujo gastroesofágico.

Sujeto

55 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, hace referencia a un animal. Preferentemente con el sujeto es un mamífero, incluyendo por ejemplo ganado (incluyendo vacuno, caballos, cerdos, pollos y ovejas), y seres humanos. En algunos aspectos of de la presente invención el animal es un animal de compañía (incluyendo mascotas), tales como un perro o un gato por ejemplo. En algunos aspectos de la presente invención, en un sujeto de forma adecuada puede ser un ser humano.

60 **Medicamento**

65 El término "medicamento" como se usa en el presente documento incluye medicamentos para uso tanto humano como animal y en medicina veterinaria. Además, el término "medicamento" como se usa en el presente documento hace referencia a cualquier sustancia que proporcione un efecto terapéutico y/o beneficioso. El término "medicamento" como se usa en el presente documento no está necesariamente limitado a sustancias que necesitan Aprobación de Marketing, pero pueden incluir sustancias que se pueden usar en cosmética, nutracéutica, alimento

(incluyendo comidas y bebidas por ejemplo), cultivos probióticos, y remedios naturales. Además, el término "medicamento" como se usa en el presente documento incluye un producto diseñado para su incorporación en alimentos para animales, por ejemplo alimentos para ganado y/o alimentos para mascotas.

5 Tratamiento

Se debe observar que en el presente documento todas las referencias a tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

10 Forma sustancialmente pura y/o forma aislada

Para algunos aspectos el microorganismo y/o metabolito de acuerdo con la presente invención puede estar en una forma sustancialmente pura o puede estar en una forma aislada.

15 La expresión "forma sustancialmente pura" se usa para indicar que el microorganismo y/o metabolito de acuerdo con la presente invención está presente a un nivel elevado. Cuando el microorganismo y/o metabolito está en una forma sustancialmente pura, el microorganismo y/o metabolitos es de forma deseable el componente predominante presente en una composición. Preferentemente está presente a un nivel de más de un 30 %, de más de un 50 %, de más de un 75 %, de más de un 90 %, o incluso de más de un 95 %, siendo dicho nivel determinado en peso seco /
20 una base de peso seco con respecto a la composición total en consideración.

A niveles muy elevados (por ejemplo, a niveles de más de un 90 %, de más de un 95 % o de más de un 99 %) se puede contemplar que el componente de está "aislado". Las sustancias biológicamente activas de la presente invención (incluyendo polipéptidos, moléculas de ácido nucleico, carbohidratos identificados/identificables mediante
25 identificación sistemática, lípidos identificados/identificables mediante identificación sistemática, restos identificados/identificables mediante identificación sistemática, etc.) se pueden proporcionar en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia se podría asociar de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, puede estar sustancialmente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

30 Se pueden proporcionar en una forma que este sustancialmente libre de otros componentes celulares (por ejemplo, de membranas celulares, de citoplasma, etc.). Cuando una composición está esencialmente libre de un contaminante dado con el contaminante estará a un nivel bajo (por ejemplo, a un nivel inferior a un 10 %, inferior a un 5 % o inferior a un 1 % basándose en el peso seco/base de peso seco que se ha establecido anteriormente).

35 Microorganismo

Los microorganismos viables adecuados para su uso en la presente invención incluyen bacterias. Preferentemente, los microorganismos viables para su uso en la presente invención son bacterias viables.

40 La expresión "microorganismo viable" hace referencia a un microorganismo que es metabólicamente activo.

El microorganismo puede ser un microorganismo de origen natural o puede ser un microorganismo transformado. El microorganismo también puede ser una combinación de microorganismos adecuados.

45 El microorganismo de acuerdo con la presente invención es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33. Preferentemente el microorganismo que se va a usar de acuerdo con la presente invención es un microorganismo que generalmente está reconocido como seguro y, que preferentemente está aprobado como GRAS.

50 Preferentemente, el microorganismo usado de acuerdo con la presente invención es uno que es adecuado para consumo por seres humanos y/o animales.

55 De forma adecuada, el microorganismo puede ser una cepa de la especie *B. lactis* seleccionada entre *B. lactis* 420 o *B. lactis* HN019.

60 Para algunas realizaciones el microorganismo puede ser una mezcla de más de un microorganismo probiótico (preferentemente más de una bacteria probiótica); una mezcla de más de más bacterias ácido lácticas; o una mezcla de uno o más microorganismos probióticos (preferentemente bacterias probióticas) y una o más bacterias ácido lácticas. Preferentemente, la mezcla puede comprender una o más cepas de *Lactobacillus* spp, y/o *Bifidobacterium* spp.

65 En una realización preferentemente el microorganismo es al menos una cepa de *Lactobacillus* spp seleccionada entre *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797 y *Lactobacillus salivarius* 33. El *Lactobacillus acidophilus* de acuerdo con la presente invención es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797. Esta cepa de *Lactobacillus acidophilus* Ha sido registrada por Rhodia Chimie, 26, quai Alphonse Le Gallo, 92 512 BOULOGNE-BILLANCOURT Cedex Francia, de

acuerdo con el Tratado de Budapest en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), en la que se registra con el número de registro PTA-4797.

5 La cepa de *Lactobacillus acidophilus* para uso de acuerdo con la presente invención puede estar en forma de una mezcla con otras bacterias ácido lácticas. Las bacterias ácido lácticas que probablemente van a ser adecuadas De acuerdo con la invención incluyen cualquier bacteria ácido láctica usada normalmente en las industrias agrícolas, alimentarias o farmacéuticas.

10 De forma ventajosa, cuando el producto es un producto alimentario, el microorganismo viable y/o metabolitos solubles producidos por dicho microorganismo deberían permanecer eficaces durante el periodo normal de "caducidad" o fecha de "expiración" durante la cual el producto alimentario es ofrecido para su venta por el minorista. Preferentemente con el tiempo eficaz no debería extenderse más allá de tales fechas hasta el final del periodo normal de frescura cuando el deterioro del alimento se hace evidente. Los periodos de tiempo deseados y la vida útil normal variarán de producto alimentario a producto alimentario y las personas con experiencia habitual en la materia reconocerán que los tiempos de vida útil variarán dependiendo del tipo de producto alimentario, el tamaño del producto alimentario, temperaturas de almacenamiento, condiciones de procesamiento, material de envasado y equipo de envasado.

20 Ensayo de exposición basado en células caco-2

La línea de células de carcinoma colorrectal humano, Caco-2, se mantiene a 37 °C y con CO₂ al 5 % en MEM Modificado Con Dulbecco (Biochrom AG) suplementado con suero bovino fetal al 20 % (FBS, Gibco) glutamina estable 2 mM (Biochrom AG) y 1 X de aminoácidos no esenciales (Biochrom AG)) 20 Uml⁻¹ de penicilina (Gibco), 20 µgml⁻¹ de estreptomina (Gibco) y 0,5 µgml⁻¹ de anfotericina (Gibco). Cuando se subcultivan, las células se lavan con 1x PBS (Gibco) y se desprenden con Tryple Select (Gibco).

30 Para determinar los efectos de diversos microorganismos y/o metabolito del mismo en la hormona intestinal, tal como PYY, 6,6 x 10⁵/cm² de células Caco-2 se siembran y se diferencian en secciones de cultivo celular de Transpocillo revestido con colágeno (Corning) de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita *et al.*, 2001, J. Pharm. Sci. 91 (3): 669-679). Después de la siembra en inserciones de Transpocillo las células Caco-2 se mantienen durante 48 h en medio que consiste en MEM modificado con Dulbecco (Biochrom AG), suero bovino fetal al 10 % (FBS, Gibco), glutamina estable 2 mM (Biochrom AG), y 1 X de aminoácidos no esenciales pero no antibióticos. Después de 48 h el medio se cambia con medio Enterostim (BD Biosciences) suplementado con diluyente de suero MITO+ (BD Biosciences) añadido al medio de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. Las células se usan en experimentos el cuarto día después de la siembra en inserciones de Transpocillo o después de que la resistencia eléctrica transepitelial haya aumentado a un nivel que indica la diferenciación celular. En todos los experimentos no se usaron ni antibióticos ni suero. Los metabolitos y/o diversos microorganismos se añaden el lado apical de la inserción.

40 Después de 24 horas de exposición, el medio se descarta, las células dentro de las inserciones se someten a lisis y el ARN se extrae usando el Kit RNeasy Mini de Qiagen (Alemania). El ADN se digiere usando la misma DNasa sin Rnasa del fabricante. La transcripción inversa se realiza usando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El patrón de expresión hormonal (por ejemplo, PYY) se determina mediante PCR de TaqMan cuantitativa en tiempo real (es decir, un método de cuantificación relativa - véase Holland *et al.*, 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA Aug 15; 88 (16): 7276-80; y Livak Y Schmittgen, 2001 Methods Dec; 25 (4): 402-8) usando los ajustes por defecto en un instrumento de Detección de Secuencias ABI Prism 7000 (Applied Biosystems)) o mediante un método de cuantificación absoluta tal como PCR De TaqMan (Applied Biosystems) con el Analizador Genético ABI Prism 7000 usando un conjunto de oligonucleótidos y un oligonucleótido patrón que reconoce la hormona (por ejemplo, PYY de *Homo sapiens*) de forma específica.

50 La suspensión microbiana para su uso en el ensayo que se ha mencionado anteriormente se puede preparar mediante cultivo del microorganismo en un medio adecuado. El cultivo se puede centrifugar para formar un sedimento celular que posteriormente se puede suspender en un medio adecuado, por ejemplo, DMEM.

55 La suspensión de metabolitos para su uso en el ensayo que se ha mencionado anteriormente se puede preparar mediante cultivo del microorganismo en un medio de cultivo adecuado. El cultivo se puede centrifugar y/o el caldo de cultivo se puede filtrar (de forma adecuada se puede filtrar mediante esterilización) para proporcionar suspensión del metabolito.

60 Los microorganismos que causan una modificación en el nivel de expresión hormonal (por ejemplo, un aumento de PYY) en comparación con un control sin tratar, pueden ser microorganismos de acuerdo con la presente invención y/o que se pueden usar de acuerdo con la presente invención.

65 Una persona con experiencia podría ser capaz fácilmente de identificar sistemáticamente microorganismos probióticos y no probióticos usando el "ensayo de exposición basado en células Caco-2" para identificar microorganismos específicos, además de los que se enseñan de forma específica en el presente documento, capaces de producir el efecto que se reivindica.

Combinación con otros componentes

5 El microorganismo y/o metabolito del mismo para su uso en la presente invención se puede usar en combinación con otros componentes. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a combinaciones. El microorganismo y/o metabolito del mismo se puede denominar en el presente documento "la composición de la presente invención".

10 La combinación de la presente invención comprende la composición de la presente invención y otro componente que es adecuado para consumo animal o humano y es capaz de proporcionar un beneficio médico o fisiológico al consumidor.

15 Otros componentes de la combinación es de la presente invención incluyen polidextrosa, tal como Litesse®, y/o una maltodextrina y/o lactitol. Estos otros componentes se pueden añadir opcionalmente a la composición para ayudar en el proceso de secado y para ayudar en la supervivencia de los microorganismos.

20 Los ejemplos adicionales de otros componentes adecuados incluyen uno o más de: agentes espesantes, agentes gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores cristalinos, edulcorantes (incluyendo concordantes artificiales), modificadores de reología, estabilizantes, antioxidantes, colorantes con enzimas, portadores, vehículos, excipientes, diluyentes, agentes lubricantes, agentes saborizantes, material colorante, agentes de suspensión, agentes disgregantes, aglutinantes de granulación, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes se pueden preparar mediante uso de técnicas químicas y/o enzimáticas. El microorganismo y/o metabolito del mismo se puede encapsular. El microorganismo y/o metabolito del mismo para uso en la presente invención se puede usar en combinación con uno o más lípidos.

25 Por ejemplo, el microorganismo y/o metabolito del mismo para uso en la presente invención se puede usar en combinación con una o más micelas lipídicas. La micela lipídica puede ser una micela lipídica simple o una micela lipídica compleja.

La micela lipídica puede ser un agregado de moléculas orientadas de sustancias anfipáticas.

30 Las micelas lipídicas pueden ser un agregado, de dimensiones coloidales, de moléculas orientadas de sustancias anfipáticas que existen en equilibrio en solución con la especie química a partir de la que se forman. Las micelas generalmente tienen carga eléctrica. En solución acuosa las moléculas individuales del agregado micelar se orientan con sus grupos polares apuntando hacia el medio acuoso y su resto hidrófobo dirigido al centro de la micela.

35 Las micelas lipídicas pueden comprender un lípido y/o un aceite.

Por lo tanto en un ejemplo la presente invención proporciona el uso de una combinación de al menos una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo y una micela lipídica para modular la señalización de la saciedad y/o para uso para tratar y/o para uso para prevenir la obesidad y/o una enfermedad causada por la obesidad.

40 Como se usa en el presente documento la expresión "agente espesante o gelificante" se refiere a un producto que evita la separación disminuyendo o evitando el movimiento de las partículas, ya sea gotitas de líquidos inmiscibles, Aire o sólidos insolubles. El espesamiento se produce cuando las moléculas hidratadas individuales producen un aumento de la viscosidad, disminuyendo la separación. La gelificación se produce cuando las moléculas hidratadas se unen para formar una red tridimensional que atrapa las partículas, inmovilizándolas de ese modo.

45 El término "estabilizante" como se usa en el presente documento se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que mantiene un producto (por ejemplo, un producto alimentario) sin cambios en el tiempo.

50 El término "emulsionante" como se usa en el presente documento se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de producto alimentario) que evita la separación de emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presenta en forma de gotita, contenida dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite en agua, en el que la gotita o fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua en aceite, en la que el agua llega a la fase dispersa y la fase continua es aceite. Las espumas, que son gas en líquido, y suspensiones, que son sólido en un líquido, también se pueden estabilizar a través del uso de emulsionantes. La aireación se puede producir en un sistema de tres fases en las que el aire queda atrapado por aceite líquido y a continuación se estabiliza mediante cristales de grasa aglomerados estabilizados con una emulsionante. Los emulsionantes tienen un grupo polar con una afinidad hacia el agua (hidrófilo) y un grupo no polar que es atraído al aceite (lipófilo). Se absorben en las superficies de contacto de las dos sustancias, proporcionando una película interfacial que actúa para estabilizar la emulsión. Las propiedades hidrófilas/lipófilas de los emulsionantes se ven influidas por la estructura de la molécula. Estas propiedades se identifican mediante el valor del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). Los valores de HLB bajos indican tendencias lipófilas más elevadas que se usan para estabilizar las emulsiones de agua en aceite. Los valores de HLB elevados se asignan a agentes emulsionantes hidrófilos, usados generalmente en emulsiones de aceite en agua. Estos valores se obtienen a partir de sistemas sencillos. Dado que a menudo los alimentos contienen otros ingredientes que influyen en las propiedades de la emulsificación, los valores de HLB pueden no siempre ser una directriz de viable para selección de emulsionantes.

Como se usa en el presente documento el término "aglutinante" se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimentario) que une el producto en conjunto a través de una reacción física o química. Durante la "gelificación" por ejemplo, el agua se absorbe, proporcionando un efecto de unión. Sin embargo, los aglutinantes pueden absorber otros líquidos, tales como aceites, manteniéndolos dentro del producto. En el contexto de la presente invención los aglutinantes se podrían usar generalmente en productos sólidos o de bajo contenido de humedad por ejemplo productos de panadería: pastas, donuts, pan y otros.

La expresión "modificador cristalino" como se usa en el presente documento se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimentario) que influye en la cristalización de cualquiera de la grasa o el agua. La estabilización de los cristales de hielo es importante por dos razones. La primera está relacionada directamente con la estabilidad del producto a partir de un punto de vista de separación. Cuantos más ciclos de congelación/descongelación experimenta un producto, los cristales de hielo o se hacen más grandes. Estos cristales grandes pueden descomponer la estructura del producto, ya sea de forma natural, como es el caso de las paredes celulares, o por el caso en el que se crea por "elación". Dado que el agua ya no se mantiene en su sitio, el producto puede presentar sinéresis, o separación, después de la descongelación. En segundo lugar, en el caso de un producto que se consume congelado, estos cristales grandes dan como resultado una sensación arenosa en la boca, no deseable.

"Excipientes" o "vehículos" se refieren a materiales adecuados para la administración del compuesto incluyen cualquiera de tales materiales conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante, o similar, que no es tóxico y que no interactúa con cualquier otro componente de la composición de una manera perjudicial.

Los ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, aceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de petroetral, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona, y similares.

Los ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico, glicina, almidón, del azúcar de leche y polietilenglicoles de alto peso molecular.

Los ejemplos de agentes disgregantes incluyen uno o más de: almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos.

Los ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y goma arábiga.

Los ejemplos de agentes lubricantes incluyen uno o más de: estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Los ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol glicerina, y combinaciones de los mismos.

Los otros componentes se pueden usar de forma simultánea (por ejemplo, cuando se añaden en una mezcla en conjunto o cuando se administran mediante diferentes vías) o de forma secuencial (por ejemplo, se pueden administrar mediante diferentes rutas).

Preferentemente, cuando la composición de la presente invención se mezcla con cualquier otro componente, Los microorganismos permanecen viables.

Como se usa en el presente documento la expresión "componente adecuado para consumo animal o humano" se refiere un compuesto que se añadió se puede añadir a la composición de la presente invención como un suplemento que puede tener un beneficio nutricional, un sustituto de fibra o puede tener un efecto generalmente beneficioso para el consumidor. Los ingredientes se pueden usar en una amplia variedad de productos que necesitan gelificación, texturización, estabilización, suspensión, formación de película y estructuración, detección de jugosidad, sin añadir viscosidad innecesaria. Preferentemente, los ingredientes serán capaces de mejorar el periodo de almacenamiento y estabilidad del cultivo viable.

Los componentes pueden ser prebióticos tales como alginato, xantano, pectina, goma de algarrobo (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), polidextrosa (es decir, Litesse®), lactitol, lactosacarosa, oligosacáridos de soja, palatinosa, isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos.

La cantidad óptima de la composición que se va a usar en la combinación de la presente invención dependerá del producto que se va a tratar y/o el método de puesta en contacto el producto con la composición y/o el uso pretendido

5 para la misma. La cantidad de microorganismos viable usado en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para ser eficaz y para permanecer suficientemente eficaz para mejorar el aroma, sabor, suavidad, consistencia, textura, cuerpo, sensación en boca, viscosidad, estructura y/o propiedades organolépticas, beneficios nutricionales y/o de salud de productos alimentarios que contienen dicha composición. Este periodo de tiempo para eficacia se debería prolongar hasta al menos el momento de la utilización del producto.

Concentrados

10 Las composiciones para uso en la presente invención pueden estar en forma de concentrados. Generalmente, estos concentrados comprenden una concentración sustancialmente elevada de un microorganismo viable y/o un metabolito del mismo. El microorganismo y/o metabolito del mismo en el presente documento se puede denominar "la composición de la presente invención" o "composiciones".

15 Los polvos, gránulos y composiciones líquidas en forma de concentrados se pueden diluir con agua o se pueden volver a suspender en agua u otros diluyentes adecuados, por ejemplo, un medio de crecimiento apropiado como leche o aceites minerales o vegetales, para dar composiciones listas para usar.

20 Las combinaciones de la presente invención en forma de concentrados se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

En un aspecto de la presente invención, el producto se pone en contacto con una composición en una forma concentrada. Preferentemente, el producto se pone en contacto con una composición secada por pulverización y/o resuspendida.

25 Las composiciones de la presente invención se pueden secar por pulverización o se pueden liofilizar con métodos conocidos en la técnica.

30 Los procesos habituales para hacer partículas usando un proceso de secado por pulverización implican un material sólido que se disuelve en un disolvente apropiado (por ejemplo, un cultivo de un microorganismo en un medio de fermentación). Como alternativa, el material se puede suspender o se puede emulsionar en un no disolvente para formar una suspensión o emulsión. En esta etapa se pueden añadir opcionalmente otros ingredientes (como se ha discutido anteriormente) o componentes tales como agentes antimicrobianos, agentes estabilizantes, colorantes y agentes que ayudan con el proceso de secado.

35 A continuación la solución se atomiza para formar una fina niebla de gotitas. Las gotitas entran inmediatamente en una cámara de secado en la que entran en contacto con un gas de secado. El disolvente se evapora de las gotitas en el gas de secado para solidificar las gotitas, formando de ese modo partículas. A continuación las partículas se separan del gas de secado y se recogen.

40 Productos

45 En la presente invención se puede usar cualquier producto que se pueda beneficiar de la composición. Estos incluyen, pero no se limitan a, conservas de frutas y productos lácteos y productos obtenidos a partir de productos lácteos, cosméticos y productos farmacéuticos. En el presente documento el microorganismo y/o metabolito del mismo se puede denominar "la composición de la presente invención" o "la composición".

50 A modo de ejemplo, la composición de la presente invención se puede usar como un ingrediente para refrescos, un zumo de fruta o una bebida que comprende proteína de suero de leche, infusiones de salud, bebidas de cacao y bebidas de bacterias ácido lácticas, yogur y yogur para beber, queso, helado, helados de hielo y postres, confitería, pasteles de bizcocho y mezclas de pasteles, bocadillos, comidas y bebidas equilibradas, rellenos de frutas, glaseados, rellenos de chocolate, rellenos con sabor a carta de queso, relleno de pasteles con sabor a frutas, pasteles y glaseado, cremas de relleno de panadería instantánea, rellenos para galletas, relleno de panadería listo para usar, relleno de calorías reducidas, bebida nutricional para adultos, bebida de soja/zumo acidificada, bebida de chocolate aséptica/mezclada, mezclas de barras, polvos de bebida, leche de soja/pura y de chocolate enriquecida con calcio, bebida de café enriquecida con calcio.

60 La composición se puede usar adicionalmente como un ingrediente en productos alimentarios tales como salsa de queso americana, agente antiaglomerante para queso rallado y desmenuzado, salsa de chips, queso crema, crema agria sin grasa con cobertura abatida mezclada seca, crema batida láctea congelada/descongelada, puntas batidas estables congeladas/descongeladas, queso Cheddar natural bajo en grasa y ligero, yogur bajo en grasa estilo suizo, postres congelados aireados, helado en envase duro, etiqueta ecológica, economía mejorada y tolerancia de helado con envase duro, helado con bajo contenido de grasa: servicio suave, salsa barbacoa, salsa para mojar de queso, aderezo de queso Cottage, salsa Alfredo mezcla seca, salsa de queso mezcla, salsa de tomate mezcla seca y otros.

Para ciertos aspectos, la presente invención se puede usar preferentemente en relación con la producción de yogur, tal como de vida de yogur fermentado, yogur, yogur para beber, queso, crema fermentada, postres a base de leche y otros.

5 De forma adecuada, la composición se puede usar tradicionalmente como un ingrediente en una o más de las aplicaciones de queso, aplicaciones de carne o aplicaciones que comprenden cultivos protectores.

10 La presente invención también proporciona un método para preparar un alimento o un ingrediente alimentario, el método comprendiendo la mezcla de la composición de acuerdo con la presente invención con otro ingrediente alimentario.

15 De forma ventajosa, la presente invención se refiere a productos que se han puesto en contacto con la composición de la presente invención (y opcionalmente con otros componentes/ingredientes), en la que la composición se usa en una cantidad que puede mejorar los beneficios del producto para la nutrición y/o para la salud.

20 Como se usa en este documento, la expresión "que se pone en contacto" se refiere a la aplicación directa o indirecta de la composición de la presente invención al producto. Los ejemplos de los métodos de aplicación que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, tratamiento del producto en un material que comprende la composición, aplicación directa mezclando la composición con el producto, pulverización de la composición sobre la superficie del producto o inmersión del producto en una preparación de la composición.

25 Cuando el producto de la invención es un producto alimentario, la composición de la presente invención se mezcla preferentemente con el producto. Como alternativa, la composición se puede incluir en la emulsión o ingredientes sin procesar de un producto alimentario. En una alternativa adicional, la composición se puede aplicar como condimento, glaseado, mezcla de colorante y similares.

30 Para algunas aplicaciones, es importante hacer que la composición esté disponible en o sobre la superficie de un producto en el que se va a influir/tratar. Esto permite que la composición proporcione una o más de las siguientes características favorables: beneficios de para la nutrición y/o para la salud.

Las composiciones de la presente invención se pueden aplicar para entremezclar, revestir y/o impregnar un producto con una cantidad controlada de un microorganismo viable.

35 Alimento

La composición de la presente invención se puede usar como - o en la preparación de - un alimento. En el presente documento, el término "alimento" se usa en un sentido amplio - y abarca alimento tanto para seres humanos como alimento para animales (es decir, un pienso). En un aspecto preferente, la comida es para consumo humano.

40 El alimento puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

45 Cuando se usa como - o en la preparación de - un alimento - tal como alimento funcional - la composición de la presente invención se puede usar en conjunto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente activo.

50 Preferentemente, la composición se usa para fermentar la leche o leche reforzada con sacarosa o medio láctico con sacarosa y/o maltosa, en la que el medio resultante que contiene todos los componentes de la composición - es decir, dicho microorganismo de acuerdo con la presente invención - se puede añadir como un ingrediente a leche de yogur en concentraciones adecuadas - tal como por ejemplo en concentraciones en el producto final que ofrecen una dosis diaria de 10^6 - 10^{10} cfu. El microorganismo de acuerdo con la presente invención se puede usar antes o después de la fermentación del yogur.

55 Para algunos aspectos los microorganismos de acuerdo con la presente invención se usan como - o en la preparación de - piensos para animales, tales como ganado para animales, en particular piensos para aves de corral (tales como pollos) o alimentos para mascotas.

60 Ingrediente alimentario

La composición de la presente invención se puede usar como ingrediente alimentario y/o ingrediente alimenticio.

65 Como se usa en el presente documento, la expresión "ingrediente alimentario" o "ingrediente alimenticio" incluye una formulación que se puede añadir a alimentos funcionales o alimentos comestibles como un suplemento nutricional.

El ingrediente alimentario puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Suplementos alimenticios

5

La composición de la presente invención puede ser - o se puede añadir a, suplementos alimenticios.

Alimentos funcionales

10

La composición de la presente invención puede ser - o se puede añadir a, a alimentos funcionales.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "alimento funcional" se refiere a alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional, sino que también es capaz de proporcionar un efecto beneficioso adicional al consumidor.

15

En consecuencia, los alimentos funcionales son alimentos habituales que tienen componentes o ingredientes (tales como los que se describen en el presente documento) incorporados en ellos que imparten al alimento un efecto funcional específico - por ejemplo, beneficio médico o fisiológico - aparte de un efecto puramente nutricional.

20

Aunque no existe una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes interesadas con interés en este área están de acuerdo en que son alimentos comercializados que tienen efectos específicos para la salud más allá de los efectos nutricionales básicos.

25

Algunos alimentos funcionales son nutracéuticos. En el presente documento, el término "nutracéutico" se refiere a un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional y/o una satisfacción de sabor, sino que también es capaz de proporcionar un efecto terapéutico (u otro beneficio) al consumidor. Los nutracéuticos cruzan las líneas divisorias tradicionales entre alimentos y medicina.

30

Las encuestas han sugerido que los consumidores ponen el mayor énfasis en las demandas de alimentos funcionales relacionados con enfermedades del corazón. La prevención del cáncer es otro aspecto de la nutrición que interesa mucho a los consumidores, pero curiosamente esta es el área en la que los consumidores sienten que pueden ejercer el menor control. De hecho, según la Organización Mundial de la Salud, al menos un 35 % de los casos de cáncer están relacionados con la dieta. Además, las demandas relacionadas con efectos de osteoporosis, salud intestinal y obesidad también son factores fundamentales que probablemente pueden incitar a la compra de alimentos funcionales y fomentar el desarrollo del mercado.

35

Probiótico

40

Para algunas aplicaciones, se cree que los microorganismos viables de ácido láctico en la composición de la presente invención pueden ejercer un efecto de cultivo probiótico. Dentro del alcance de la presente invención también está añadir a la composición de la presente invención otros probióticos y/o prebióticos.

En el presente documento, un prebiótico es:

"un ingrediente alimentario no digerible que afecta de manera beneficiosa al hospedador al estimular de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias beneficiosas".

50

La expresión "cultivo probiótico", como se usa en el presente documento, define microorganismos vivos (incluidas bacterias o levaduras, por ejemplo) que, cuando se ingieren o se aplican de forma local en cantidad suficiente, afecta de manera beneficiosa al organismo hospedador, es decir, le confiere uno o más beneficios para la salud demostrables en el organismo hospedador. Los probióticos pueden mejorar el equilibrio microbiano en una o más superficies de mucosa. Por ejemplo, la superficie de mucosa puede ser el intestino, el tracto urinario, el tracto respiratorio o la piel. El término "probiótico", como se usa en el presente documento, también abarca microorganismos vivos que pueden estimular las ramas beneficiosas del sistema inmunológico y al mismo disminuye las reacciones inflamatorias en una superficie de la mucosa, por ejemplo, el intestino.

55

Aunque no hay límites inferiores o superiores para la ingesta de probióticos, se ha sugerido que al menos 10^6 - 10^{12} , preferentemente al menos 10^6 - 10^{10} , preferentemente 10^8 - 10^9 , cfu como una dosis diaria será eficaz para conseguir los efectos beneficiosos para la salud en un organismo hospedador, tal como un ser humano.

60

Además del efecto probiótico que puede tener el microorganismo de acuerdo con la presente invención, dentro del alcance de la presente invención también está proporcionar prebióticos como otros compuestos que se pueden incluir en una combinación junto con la composición. En el presente documento el microorganismo de acuerdo con la presente invención y/o un metabolito del mismo se puede denominar "la composición". El componente prebiótico de la combinación que comprende la composición de la presente invención se caracteriza por una fermentación lenta en el intestino grueso. Los prebióticos de ese tipo pueden ejercer un efecto positivo sobre la flora intestinal, de

65

forma específica en el lado izquierdo del colon, un área del intestino que es especialmente propensa a trastornos, en particular cáncer intestinal y colitis ulcerosa.

5 Los prebióticos generalmente son carbohidratos no digeribles (oligo- o polisacáridos) o un alcohol de azúcar que no se degrada ni se absorbe en el tracto digestivo superior. Los prebióticos conocidos usados en productos comerciales y útiles de acuerdo con la presente invención incluyen inulina (fructo-oligosacárido o FOS) y transgalacto-oligosacáridos (GOS o TOS). Otros prebióticos adecuados incluyen oligosacárido palatinosa, oligosacárido de soja, gentiooligosacárido, xilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactitol, maltitol, polidextrosa (es decir, Litesse®) o similares.

10 En una realización la presente invención se refiere a la combinación de un microorganismo y/o metabolito del mismo de acuerdo con la presente invención con un prebiótico.

15 El prebiótico para uso en esta combinación puede ser uno o más de los siguientes: inulina (fructo-oligosacárido, o FOS) y transgalacto-oligosacáridos (GOS o TOS). Otros prebióticos adecuados incluyen oligosacárido palatinosa, oligosacárido de soja, gentiooligosacárido, xilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactitol, maltitol, polidextrosa (es decir, Litesse®), o lactitol.

20 El prebiótico se puede administrar de forma simultánea con (por ejemplo, en mezcla junto con o se puede administrar de forma simultánea mediante la misma o diferentes vías) o de forma secuencial (por ejemplo, con la misma o diferentes vías) el microorganismo de acuerdo con la presente invención y/o un metabolito del mismo.

25 La presente invención contempla el uso de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en combinación con un prebiótico en la fabricación de un medicamento para uso en la inducción de saciedad y/o para tratar o prevenir el exceso de peso u obesidad.

Simbióticos

30 A presente invención también contempla el uso tanto de pre- como de probióticos como ingredientes en combinación. Con la composición de la presente invención que cuando se combinan se convierten en sinbióticos. En el presente documento el microorganismo de acuerdo con la presente invención y/o un metabolito del mismo se puede denominar " la composición". La finalidad de esto es combinar los efectos de nuevas bacterias beneficiosas y la estimulación de las bacterias beneficiosas del propio organismo. Existe un potencial elevado en el desarrollo y en el consumo de mezclas de ese tipo, ya que algunas de estas pueden mostrar un buen efecto nutricional sinérgico potente y/o efectos para la salud.

35 Por lo tanto la composición de la presente invención se puede diseñar de forma específica para que contenga diferentes componentes que pueden proporcionar un efecto sinbiótico al consumidor.

40 Producto farmacéutico

La composición de la presente invención se puede usar como - o en la preparación de - un producto farmacéutico. En el presente documento, la expresión "producto farmacéutico" se usa en un amplio sentido – y cubre productos farmacéuticos para seres humanos así como productos farmacéuticos para animales (es decir, aplicaciones en veterinaria). En un aspecto preferente, el producto farmacéutico es para uso humano y/o para ganadería.

El producto farmacéutico puede ser para fines terapéuticos - que pueden ser de naturaleza curativa o paliativa o preventiva. El fruto farmacéutico puede ser incluso para fines de diagnóstico.

50 Cuando se usa como - o en la preparación de - un producto farmacéutico, la composición de la presente invención se puede usar en conjunto con uno o más de: un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, un ingrediente farmacéuticamente activo.

55 El producto farmacéutico se puede presentar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Ingrediente farmacéutico

60 Los microorganismos de la presente invención se pueden usar con ingredientes farmacéuticos. En el presente documento, la composición puede ser el único componente activo o puede ser al menos uno de un número (es decir, 2 o más) de componentes activos.

65 El ingrediente farmacéutico puede estar en forma de una solución o con un sólido – dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Formas

El microorganismo de la presente invención y/o un metabolito del mismo se puede usar en cualquier forma adecuada - ya sea cuando está solo o cuando está presente en una composición con otros componentes o ingredientes. En el presente documento el microorganismo de la presente invención y/o un metabolito del mismo se puede denominar "la composición". Del mismo modo, las combinaciones que comprenden la composición de la presente invención y otros componentes y/o ingredientes (es decir, ingredientes - tales como ingredientes alimentarios, ingredientes alimentarios funcionales o ingredientes farmacéuticos) se pueden usar en cualquier forma adecuada.

El microorganismo de la presente invención se puede usar en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de las mismas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, polvos finos, gránulos y polvos que se pueden humectar, secar por pulverización o liofilizar. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, soluciones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas, suspensiones y emulsiones.

Los ejemplos adecuados de formas incluyen uno o más de: comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se usa en forma de comprimido - tal como para su uso como un ingrediente funcional - los comprimidos también pueden contener uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina; agentes disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), almidón glicolato sódico, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos; aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga; se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Los ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para su uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de petroetral, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Los excipientes preferentes para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular.

Para suspensiones acuosa y/o elixires, la composición de la presente invención se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o saborizantes, material colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilenglicol glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las formas también pueden incluir cápsulas de gelatina; cápsulas de fibra, comprimidos de fibra, etc.; o incluso bebidas de fibra.

Los ejemplos adicionales de formas están en la forma de una crema por ejemplo. Para algunos aspectos el microorganismo y/o un metabolito del mismo se puede incluir en cremas farmacéuticas y/o cosméticas tales como cremas solares y/o cremas para después del sol por ejemplo.

En un aspecto, la composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar en un aerosol, por ejemplo a modo de una pulverización nasal, por ejemplo para administración al tracto respiratorio.

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación, solamente a modo de ejemplo, en la que se puede hacer referencia a las siguientes figuras:

La Figura 1 muestra el patrón de expresión genética del Péptido YY (PYY) en células Caco-2 tratadas con *L. acidophilus*. Los datos normalizaron con respecto a la cantidad de ARN. El índice de diferencia se calculó al igual que en Livak y Schmittgen, 2001;

La Figura 2 muestra el efecto de medio de cultivo acondicionado con *L. acidophilus* en la expresión de PYY en células Caco-2;

La Figura 3 muestra la expresión genética de PYY después de exposición a diferentes microorganismos que tienen propiedades probióticas;

La Figura 4 muestra el efecto de células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus*; micelas lipídicas simples y una combinación de las mismas en la expresión de PYY en células Caco-2 diferenciadas;

La Figura 5 muestra los efectos de metabolitos de *L. acidophilus*; micelas lipídicas complejas y una combinación de los mismos en la expresión de PYY en células Caco-2 diferenciadas; y

La Figura muestra el efecto de sobrenadante sin células NCFM de *L. acidophilus* y bacterias en la expresión de PYY;

y

La Figura 7 muestra el efecto de *L. curvatus* 853 en la expresión de PYY.

Ejemplo 1

Analizar el patrón de expresión genética del péptido YY (PYY) en células Caco-2 tratadas con *L. acidophilus*.

Método:

La línea de células de carcinoma de colon humano, Caco-2, se cultivó en inserciones de cultivo celular semiporoso y se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de diferenciación de 5 días usando medios de diferenciación (DM) formados por medio Entero-STIM suplementado con diluyente de suero MITO+ y que no contenía antibióticos. La diferenciación se monitorizó usando mediciones de TER y medición de actividad de fosfatasa alcalina.

Las bacterias *Lactobacillus acidophilus* (cepa PTA-4797) se cultivaron en caldo de cultivo de MRS suplementado con glucosa al 1 % (peso/vol) hasta que la DO600 alcanzó 0,6-0,7. El tratamiento de *L. acidophilus* se añadió en el lado apical de la inserción del cultivo celular y se incubó durante 24 horas. el ARN se aisló de las células de acuerdo con el protocolo que se proporciona en el kit RNeasy mini (Qiagen), y el ADNc se sintetizó usando transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). El patrón de expresión genéticas en monitorizó usando el Verde SYBR (Applied Biosystems) con el Analizador Genético ABI Prism 7000 con cebadores específicos para el péptido YY de *Homo sapiens*. El cebador directo fue: 5' GGA GGC CTC AGC TTG ACC 3' y el cebador inverso: 5'TGC GCA CGA ACA CCA TAG 3'. El ciclo del umbral obtenido (Ct), que es el ciclo de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia cruza un valor de umbral de fondo, se transformó en valor de expresión relativo usando el método de Livak *et al.* (2001).

Como un control, las células Caco-2 crecieron del mismo modo en inserciones de cultivo celular sin tratamiento con *L. acidophilus*.

Resultados:

Los resultados de la actividad de fosfatasa alcalina así como las mediciones de TER indican que las células se diferenciaron bien (los datos no se muestran).

EL análisis de expresión genética muestra la expresión del péptido YY (PYY) marcador de saciedad. La expresión del péptido YY (PYY) aumentó con un 255 % cuando se compara con el control cuando las células CaCo-2 se trataron con *L. acidophilus* ($p < 0,05$, ANOVA) (Figura 1).

El *L. acidophilus* - tratamiento de células Caco-2 aumentó la expresión de un marcador de saciedad, el péptido YY. El resultado indica que el consumo de *Lactobacillus acidophilus* pueda aumentar la saciedad postprandial mediante el aumento de la señalización de saciedad en el intestino.

Ejemplo 2

Experimento *in vitro* que imita al alimento con glucosa

Experimento con células Caco-2 diferenciadas. Efecto de caldo de cultivo acondicionado con *L. acidophilus* en células tratadas con diversas cantidades de glucosa

Las células Caco-2 se cultivaron en inserciones de cultivo celular semiporoso y se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de diferenciación de 5 días usando medios de diferenciación (DM) formados por medio Entero-STIM suplementado con diluyente de suero MITO+ y que no contenía antibióticos. La diferenciación se monitorizó usando mediciones de TER y medición de actividad de fosfatasa alcalina. El cuarto día del experimento, el medio se cambió por un medio que no contenía glucosa en ambos lados de la inserción y las células se privaron de glucosa durante 24 h.

Los tratamientos de las células Caco2 consistieron en células de control, que se trataron en el lado apical con medio que contenía glucosa 0,5 mM, y 5 mM, y células de ensayo, que se trataron en el lado apical con medio que contenía glucosa 0,5 mM, y 5 mM con adición simultánea de tratamiento con *L. acidophilus*. Además, control se

incluyeron células Caco2 sin ninguna adición medio que contuviera glucosa en el lado apical. En todos los pocillos se añadió glucosa 5 mM en el lado basal. Las células se incubaron durante 24 h a 37 °C, CO₂ al 5 %.

5 Las bacterias *L. acidophilus* se cultivaron en caldo de cultivo de MRS que no contenía azúcar hasta que la DO600 alcanzó 0,6-0,7. Las células se centrifugaron y el caldo de cultivo se filtró con esterilización y se usó en los medios de ensayo.

10 El ARN se aisló de las células Caco2 de acuerdo con el protocolo proporcionado por el kit RNeasy mini (Qiagen), y el ADNc se sintetizó usando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). El patrón de expresión genética de PYY se monitorizó usando la química de sonda TaqMan (Applied Biosystems) con el Analizador Genético ABI Prism 7000 usando un conjunto de oligonucleótidos que reconocían el PYY de *Homo sapiens* de forma específica.

15 Los oligonucleótidos incluían: cebador directo: 5' GGA GGC CTC AGC TTG ACC 3', cebador inverso: 5'TGC GCA CGA ACA CCA TAG 3', y una sonda: sonda Universal Probelibrary N.º 10 (Roche). El ciclo del umbral obtenido (Ct), que es el ciclo de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia cruza un valor de umbral de fondo, se transformó en valor cuantitativo absoluto usando una curva patrón a partir de oligonucleótidos sintéticos cuantificados que representaban la secuencia antisentido de la transcripción diana que muestra la relación lineal log inversa entre el número de copias y el ciclo de PCR (Nurmi *et al.*, 2005 Nutrition and Cancer 51 (1): 83-92.) La secuencia de este oligonucleótido convencional es: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG CGA TAG CTT GTG AAG CAG ACG AGC AGG
20 AGG TGG AAG GCG AGG GAA GTC CCA AGG GCT GCA CTG CCG CAG GTC AAG CTG AGG CCT CC 3'.

Resultados

25 Los resultados de la actividad de fosfatasa alcalina así como las mediciones de TER indican que las células estaban bien diferenciadas (los datos nos muestran).

Los resultados se muestran en la Figura 2.

30 La adición de caldo de cultivo de *L. acidophilus* aumento o la expresión de PYY en 1,3 veces en las muestras que contenían glucosa 0,5 mM (p < 0,05, ANOVA) y 2 veces en las muestras que contenían grupos 5 mM (p < 0,05) en comparación con el control respectivo con una cantidad de glucosa similar). El cocultivo de *L. acidophilus* junto con células Caco2 aumentó la expresión de PYY en 1,7 veces en las muestras que contenían glucosa 0,5 mM, and y en 2 veces en las muestras que contenían glucosa 5 mM en comparación con las respectivas células de control con valores similares de glucosa.

35 Ejemplo 3

Experimentos *in vitro* con otros probióticos

40 Las células Caco-2 se cultivaron en inserciones de cultivo celular semiporoso y se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de diferenciación de 5 días usando medios de diferenciación (DM) formados por medio Entero-STIM suplementado con diluyente de suero MITO+ y que no contenía antibióticos. La diferenciación se monitorizó usando mediciones de TER y medición de actividad de fosfatasa alcalina.

45 Los tratamientos de las células Caco2 consistieron en células de control, que se trataron con medio de cultivo de Caco-2, y células de ensayo, que se trataron con caldo de cultivo prebiótico en medio de cultivo de Caco-2. Además, se incluyeron las células Caco2 de control con adición de caldo de cultivo de MRS diluido en medio de cultivo de Caco-2. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

50 Las bacterias pro bióticas se cultivaron en caldo de cultivo de MRS suplementado con un 1 % (peso/vol) de glucosa hasta que la DO600 alcanzó 0,6-0,7. Las células se centrifugaron y el caldo de cultivo se filtró con esterilización y se usó en el medio de ensayo. Las cepas probióticas sometidas a ensayo incluyeron las siguientes cepas comercializadas: *B. lactis* 420 (de Danisco), *B. lactis* HN019 (Nombre comercial Howaru™ Bifido - Danisco A/S) y *L. salivarius* Ls-33 (de Danisco).

55 El ARN se aisló de las células Caco2 de acuerdo con el protocolo proporcionado por el kit RNeasy mini (Qiagen), y el ADNc se sintetizó usando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen). El patrón de expresión genética de PYY se monitorizó usando la química de sonda TaqMan (Applied Biosystems) con el Analizador Genético ABI Prism 7000 usando un conjunto de oligonucleótidos que reconocían el PYY de *Homo sapiens* de forma específica.

60 Los oligonucleótidos incluían: cebador directo: 5' GGA GGC CTC AGC TTG ACC 3', cebador inverso: 5'TGC GCA CGA ACA CCA TAG 3', y una sonda: sonda Universal Probelibrary N.º 10 (Roche). El ciclo del umbral obtenido (Ct), que es el ciclo de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia cruza un valor de umbral de fondo, se transformó en un valor cuantitativo absoluto usando una curva patrón a partir de oligonucleótidos sintéticos cuantificados que representaban la secuencia antisentido de la transcripción diana que muestra la relación lineal log inversa entre el número de copias y el ciclo de PCR (Nurmi *et al.*, 2005 Nutrition and Cancer 51 (1): 83-92.). La secuencia de este
65

oligonucleótido convencional es: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG CGA TAG CTT GTG AAG CAG ACG AGC AGG AGG TGG AAG GCG AGG GAA GTC CCA AGG GCT GCA CTG CCG CAG GTC AAG CTG AGG CCT CC 3'.

Resultados:

5

Los resultados se muestran en la Figura 3.

La adición de *B. lactis* 420 y *B. Lactis* HN019 aumentó la expresión de PYY en un 76 % y un 68 %, respectivamente, en comparación con el control. El tratamiento de *L. salivarius* 33 aumentó la expresión de PYY en un 67 % en comparación con el control. Por lo tanto, otras materias distintas a *L. acidophilus* pueden tener el mismo efecto inductor de saciedad.

10

Ejemplo 4

15 Medida de la señalización de la saciedad en sangre en ratas

En este estudio como un modelo humano se usaron ratas aunque existen algunas diferencias fisiológicas. A diferencia del estómago humano, la parte proximal del estómago de la está casi libre de jugo gástrico lo que permite que las bacterias sobrevivan y fielmente en el alimento en ese lugar. Esto puede producir diferencias en la saciedad entre el ser humano y la rata. Por lo tanto del plasma de rata obtenido usando el protocolo que sigue a continuación se analizará para señales neuroendocrinológicas que surgen del estómago (grelina, leptina), intestino (CCK, GLP-1, PYY, orexinas) o metabolitos en circulación sanguínea (ácido acético, glucosa) y sus respuestas hormonales (insulina).

20

El tracto gastrointestinal es rico en células endocrinas y neuronales que sintetizan y secretan péptidos que aumentan la saciedad, colecistoquinina (CCK) y péptido YY (PYY), como respuesta a los estímulos intraluminales asociados con la ingestión de una comida. La CCK inhibe la ingesta de comida rápidamente, y la duración de la inhibición es relativamente breve. También se sabe que los ácidos grasos de cadena corta producidos por microbios del intestino inducen saciedad induciendo la hormona intestinal PYY. Los probióticos también pueden producir la disminución del apetito estimulando los péptidos grelina y orexina. La concentración en plasma de los mencionados anteriormente aumenta antes de la comida y disminuyen rápidamente después de la comida.

25

30

En consecuencia, la atención se centrará en los niveles en plasma de péptidos que aumentan la saciedad CCK y PYY y también péptidos que estimulan el apetito grelina u orexina como un indicador del control de la ingesta de alimento corto plazo después del suplemento con probióticos. Además, la concentración en plasma de ácido acético se analizará para observar el nivel de productos de fermentación en plasma.

35

Las ratas Wistar macho (HsdRddHan:WIST) con un peso de 248 g (STDEV 12,1 g) en el momento del inicio de los experimentos se alojaron a 21 °C en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h con acceso libre a agua corriente a voluntad. Durante el periodo de aclimatación (14 días) los ciclos normales se invirtieron y las ratas fueron entrenadas para consumir todo su alimento (20 g/día,) dentro de las 5 h desde el inicio del ciclo de oscuridad a las 8 AM. La Dieta Formulab 5008 usada fue una dieta con alto contenido de proteína, y alto contenido de energía y contenía carbohidratos digeribles 49,5 5 y fibra. Las ratas se colocaron de forma aleatoria en dos grupos de tratamiento de 20 animales cada uno, y un grupo de 5 ratas. El último grupo se anestesió a las 8 AM antes de recibir el alimento para proporcionar muestras de sangre en ayunas. Los grupos restantes fueron: Bifido 420 (10^{10}), NCFM (10^{10}), NCFM(10^{10}) + lactitol (2 g), lactitol (2 g) solo y grupo de control. El Lactitol se incluyó ya que se sabe que aumenta la concentración de PYY en circulación por vía postprandial. Todos los objetos de ensayo se administraron mediante alimentación con tubo en un volumen de 2,5 ml de agua estéril/animal. al grupo de control se le administró agua estéril sin ningún suplemento, en las mismas condiciones. A los animales se les proporcionó alimento convencional después de la dosificación. Cada grupo de ensayo se dividió en cinco subgrupos y cada subgrupo a su vez se anestesió para tomar muestras de sangre a las 1, 5, 10 y 24 h después del inicio del ciclo de oscuridad. Las ratas se anestesiaron con dióxido de carbono para tomar muestras de sangre mediante punción cardiaca.

40

45

50

Las concentraciones de PYY se analizarán a partir del plasma de acuerdo con Gee y Johnson (2005). Otras hormonas que se pueden analizar incluyen: GLP-1 con radioinmunoensayo (RIA) de acuerdo con Deacon *et al.*, (2002) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282: E873-E879, grelina con RIA, CCK de acuerdo con Paloheimo y Rehfeld (1995), orexina de acuerdo con Heinonen *et al.*, (2005), y ácido acético mediante HPLC. Todas las muestras de sangre se extraerán mediante punción cardiaca en tubos de EDTA. Las muestras se centrifugaron a 1.600 x g a 4 °C durante 15 minutos. La fracción de plasma se eliminará y se transferirá a tubos recién preparados y se almacenará a -70 °C hasta su análisis.

55

60

Ensayos para monitorizar la ingesta de alimento en una comida

Se usan ratas Wistar macho como se ha descrito anteriormente. En cada grupo se usan diez ratas (grupos de ratas de control y alimentadas con dieta de ensayo).

65

La ratas primero tienen diez días de aclimatación al ensayo, tras lo cual el ensayo comienza y tiene una duración de diez días. Las ratas se dividen en cinco grupos, un grupo de control y cuatro grupos de ensayo. En todos los grupos, la ratas se alimentan a voluntad con dieta de control. El grupo de control recibe solución salina mediante una sonda una vez al día y los grupos de ensayo reciben *L. acidophilus* en una cantidad de 10^8 y 10^{10} con sonda una vez al día. Las ratas se alimentan preferentemente durante el ciclo de oscuridad.

La ingesta de alimentos y el aumento de peso se monitorizan después de cada ciclo de oscuridad en cada rata.

Las investigaciones preliminares sugieren que la adición de microorganismos, y en particular de cepas probióticas, en el alimento de las ratas disminuye la ingesta de alimentos por estas ratas.

Ensayo clínico: estudio de señalización de la saciedad postprandial en seres humanos

Un estudio piloto se pudo realizar con 15-20 voluntarios (sujetos humanos). Los sujetos son sus propios controles (dos ensayos separados con cualquiera de bebida de control o bebida de ensayo).

Los sujetos son preferentemente un número igual de hombres y mujeres sanos de edad media (índice de masa corporal IMC de aproximadamente 25).

Los sujetos se someten a una noche de ayuno.

A partir de ese momento, se les administra una bebida de ensayo (que comprende una o más de las cepas de interés que se desvelan en la presente memoria descriptiva), y bebida de control (si las cepas de interés).

A continuación, se toman muestras de sangre venosa a las 0, 2 y 5 horas.

Los sujetos tienen que rellenar un cuestionario, para hacer referencia a las sensaciones de hambre y saciedad que han tenido después de haber tomado la bebida de ensayo o de control.

En paralelo, las concentraciones de PYY se miden a partir del plasma (Peninsula Laboratories, San Carlos, CA, USA).

Ejemplo 5

Experimento con células Caco-2 diferenciadas. Efecto de caldo de cultivo acondicionado de *L. acidophilus* en células tratadas con lípidos

Este experimento se realiza para imitar un alimento con ácidos grasos:

El experimento se realizó con células Caco-2 que se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) JPharm Sci 91, 669-79). Las células se diferenciaron hasta que la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) era de aproximadamente $200 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$. Las micelas lipídicas complejas se prepararon de acuerdo con (Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F., Rousset, M., Chambaz, J. y Demignot, S. (2005) J. Cell Physiol 202, 767-776) con o sin 10 % metabolitos de NCFM de *L. acidophilus*. Las células Caco-2 se trataron con las micelas lipídicas durante 3 horas tras lo cual la expresión de PYY se midió a partir de las células.

Materiales y Métodos

Las células Caco-2 (HTB-37, Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC) se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo basal que consistía en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (DMEM, Invitrogen Carlsbad, CA, US) suplementado con FBS al 20 % (Invitrogen), glutamina estable 2 mM (Invitrogen), 1 x de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 20 U/ml de penicilina (Invitrogen), 20 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen), y 0,5 µg/ml de anfotericina (Invitrogen).

Las células Caco-2 se usaron en el pase 26 y se sembraron como $6,6 \times 10^5$ células/cm² en inserciones de cultivo celular de 12 pocillos (BIOCOAT HTS, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) y se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) JPharm Sci 91, 669-79). En resumen, después de la siembra, las células se incubaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo de células basales sin antibióticos, tras lo cual el medio se aspiró y se sustituyó con medio de diferenciación (Entero-STIM, BD Biosciences), suplementado con diluyente de suero MITO+ (BD Biosciences) 250 µl/250 ml de medio. Al 4º día de cultivo, el medio se sustituyó, y al 5º día se realizó el experimento con micelas lipídicas.

Las células NCFM de *L. acidophilus* (de Danisco Cultures, París, Francia) se cultivaron a 37 °C por vía anaeróbica en caldo de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) suplementado con glucosa al 1,0 % hasta que la DO600 alcanzó 0,6-0,7. La densidad de las células bacterianas se determinó con citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, US) como se ha descrito anteriormente (Apajalahti, J. H., Kettunen, H., Kettunen, A.,

Holben, W. E., Nurminen, P. H., Rautonen, N. y Mutanen, M. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68, 4986-4995). Los sobrenadantes sin células se recogieron mediante centrifugación (25 °C, 5 min, 3000 g) y el sobrenadante se retiró. El sobrenadante sin células NCFM de *L. acidophilus* (denominados posteriormente como metabolitos de NCFM de *L. acidophilus*) así como el control de MRS se diluyeron a un 10 % (v/v) en medio de diferenciación y las micelas lipídicas complejas se prepararon en los medios resultantes (véase a continuación).

Las micelas lipídicas complejas se prepararon en taurocolato 24 mM (Sigma, St Louis, MO, USA) en medio de diferenciación. La composición de las micelas complejas usada fue: ácido oleico 0,6 mM - taurocolato 2 mM - 0,2-mono-oleilglicerol 2 mM - colesterol 0,05 mM - fosfatidilcolina 0,2 mM. Un mililitro de micelas se preparó mezclando ácido oleico (6 µl de solución de reserva 100 mM) con otros lípidos (2 µl) en un tubo de vidrio estéril. Los lípidos se secaron en atmósfera de gas nitrógeno a temperatura ambiente y el residuo se disolvió en 83 µl de taurocolato 24 mM en medio de diferenciación y el volumen se llevó hasta 1 ml ya fuera con medio de diferenciación desnudo, con medio de diferenciación que consiste en un 10 % (v/v) MRS, o con medio de diferenciación que consiste en un 10 % (v/v) metabolitos de NCFM de *L. acidophilus*.

Las micelas lipídicas se aplicaron al quinto día de la diferenciación de Caco-2 en el lado apical de las células, y se dejó que reaccionaran con las células durante 3 horas. Como controles 10 % (v/v) MRS y se usaron micelas lipídicas complejas sin metabolitos de NCFM de *L. acidophilus*. Se prepararon en medio de diferenciación.

Después de los tratamientos los medios de cultivo celular se aspiraron en las células se sometieron a lisis con 150 µl of RA1 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) suplementado con β-mercaptoetanol al 1 % (Sigma). El ARN de los lisados celulares se recogió con el kit de aislamiento de ARN Nucleospin 96 de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Macherey-Nagel). La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó con cebadores aleatorios usando Superscript III de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Invitrogen). El patrón de expresión de PYY en las muestras se analizó usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando oligonucleótidos que detectan de forma específica PYY de *Homo sapiens*. Los oligonucleótidos incluían: cebador directo: 5' GGA GGC CTC AGC TTG ACC 3'; cebador inverso: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG 3'; y la sonda: sonda Universal ProbeLibrary N.º 10 (Roche). El ciclo del umbral obtenido (Ct), que es el ciclo de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia cruza un valor de umbral de fondo, se transformó en valor cuantitativo absoluto usando una curva patrón a partir de oligonucleótidos sintéticos cuantificados que representaban la secuencia antisentido de la transcripción diana que muestra la relación lineal log inversa entre el número de copias y el ciclo de PCR (Nurmi, J. T., Puolakkainen, P. A. y Rautonen, N. E. (2005) Nutr Cancer 51, 83-92). La secuencia de este oligonucleótido convencional es: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG CGA TAG CTT GTG AAG CAG ACG AGC AGG AGG TGG AAG GCG AGG GAA GTC CCA AGG GCT GCA CTG CCG CAG GTC AAG CTG AGG CCT CC 3'.

El análisis estadístico se realizó con ensayo de t de Student.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 5.

La expresión del péptido YY marcador de saciedad (PYY) aumentó cuando las células Caco-2 se trataron con metabolitos de NCFM de *L. acidophilus* solos o combinados con las micelas lipídicas complejas.

En el experimento con micelas lipídicas complejas (formadas por ácido oleico 0,6 mM, 2-mono-oleilglicerol 2 mM, colesterol 0,2 mM y L-α-fosfatidilcolina 0,05 mM), el caldo de cultivo de MRS combinado con la mezcla de micelas lipídicas complejas no inducía la expresión de PYY cuando se comparó con el tratamiento con micelas lipídicas complejas solo. Los metabolitos de NCFM de *L. acidophilus* aumentaron la expresión de PYY en comparación con los controles ($p < 0,05$ cuando se comparan con micelas lipídicas complejas solo, y $p = 0,05$ cuando se comparan con un 10 % de MRS solo). Cuando las micelas lipídicas complejas se combinaron con los metabolitos de NCFM de *L. acidophilus* al 10 % aumentó adicionalmente la expresión de PYY ($p < 0,05$ cuando se compara con cualquiera del tratamiento con micelas lipídicas complejas, o con el tratamiento con MRS al 10 %).

Ejemplo 6

Efecto de células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* en células Caco-2 diferenciadas tratadas con lípidos

El experimento se realizó con células Caco-2 que se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) J Pharm Sci 91, 669-79). Las células se diferenciaron hasta que la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) era de aproximadamente $200 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$. Las micelas lipídicas complejas se prepararon de acuerdo con (Chateau, D., Pauquai, T., Delers, F., Rousset, M., Chambaz, J. y Demignot, S. (2005) J. Cell Physiol 202, 767-776), con o sin células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* en una proporción de 50 células bacterianas con respecto a una célula Caco-2. Las células Caco-2 se trataron con las micelas lipídicas durante 3 horas tras lo cual la expresión de PYY se midió a partir de las células.

Materiales y Métodos

Las células Caco-2 (HTB-37, Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC) se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo basal que consistía en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (DMEM, Invitrogen Carlsbad, CA, US) suplementado con FBS al 20 % (Invitrogen), glutamina estable 2 mM (Invitrogen), 1 x de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 20 U/ml de penicilina (Invitrogen), 20 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen), y 0,5 µg/ml de anfotericina (Invitrogen).

Las células Caco-2 se usaron en el pase 26 y se sembraron como $6,6 \times 10^5$ células/cm² en inserciones de cultivo celular de 12 pocillos (BIOCOAT HTS, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) y se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) JPharm Sci 91, 669-79). En resumen, después de la siembra, las células se incubaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo de células basales sin antibióticos, tras lo cual el medio se aspiró y se substituyó con medio de diferenciación (Entero-STIM, BD Biosciences), suplementado con diluyente de suero MITO+ (BD Biosciences) 250 µl/250 ml de medio. Al 4º día de cultivo, el medio se substituyó, y al 5º día se realizó el experimento con micelas lipídicas.

Las células NCFM de *L. acidophilus* (de Danisco Cultures, París, Francia) se cultivaron a 37 °C por vía anaeróbica en caldo de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) suplementado con un 1,0 % (peso/volumen) de glucosa hasta que la DO600 alcanzó 0,6-0,7. La densidad de las células bacterianas se determinó con citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, US) como se ha descrito anteriormente (Apajalahti, J. H., Kettunen, H., Kettunen, A., Holben, W. E., Nurminen, P. H., Rautonen, N. y Mutanen, M. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68, 4986-4995). Las células bacterianas se recogieron mediante centrifugación (25 °C, 5 min, 3000 g) y el sobrenadante se retiró. Las células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* se lavaron una vez con medio de diferenciación y las micelas lipídicas simples se prepararon con las bacterias (véase a continuación).

Las micelas lipídicas simples se prepararon en taurocolato 24 mM (Sigma, St Louis, MO, USA) en medio de diferenciación. La composición de las micelas simples fue: ácido oleico 0,6 mM - taurocolato 2 mM. Un mililitro de micelas se preparó a partir de ácido oleico (6 µl de solución de reserva 100 mM) en un tubo de vidrio estéril. El ácido oleico se secó en atmósfera de gas nitrógeno a temperatura ambiente y el residuo se disolvió en 83 µl de taurocolato 24 mM en medio de diferenciación y el volumen se llevó hasta 1 ml ya sea con medio de diferenciación desnudo, con medio de diferenciación que consiste en un 10 % (v/v) de MRS, o con medio de diferenciación que consiste en un células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* en una proporción de 50 células bacterianas con respecto a una célula Caco-2.

Las micelas lipídicas se aplicaron al quinto día de la diferenciación de Caco-2 en el lado apical de las células, y se dejó que reaccionaran con las células durante 3 horas. Como controles se usó un 10 % (v/v) de medio MRS y micelas lipídicas simples sin células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus*. Se prepararon en medio de diferenciación.

Después de los tratamientos los medios de cultivo celular se aspiraron en las células se sometieron a lisis con 150 µl de RA1 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) suplementado con β-mercaptoetanol al 1 % (Sigma). El ARN de los lisados celulares se recogió con el kit de aislamiento de ARN Nucleospin 96 de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Macherey-Nagel). La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó con cebadores aleatorios usando Superscript III de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Invitrogen). El patrón de expresión de PYY en las muestras se analizó usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando oligonucleótidos que detectan de forma específica PYY de *Homo sapiens*. Los oligonucleótidos incluían: cebador directo: 5' GGA GGC CTC AGC TTG ACC 3'; cebador inverso: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG 3'; y la sonda: sonda Universal ProbeLibrary N.º 10 (Roche). El ciclo del umbral obtenido (Ct), que es el ciclo de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia cruza un valor de umbral de fondo, se transformó en valor cuantitativo absoluto usando una curva patrón a partir de oligonucleótidos sintéticos cuantificados que representaban la secuencia antisentido de la transcripción diana que muestra la relación lineal log inversa entre el número de copias y el ciclo de PCR (Nurmi, J. T., Puolakkainen, P. A. y Rautonen, N. E. (2005) Nutr Cancer 51, 83-92).

La secuencia de este oligonucleótido convencional es: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG CGA TAG CTT GTG AAG CAG ACG AGC AGG TGG AAG GCG AGG GAA GTC CCA AGG GCT GCA CTG CCG CAG GTC AAG CTG AGG CCT CC 3'.

El análisis estadístico se realizó con ensayo de t de Student.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 4.

La expresión del péptido YY marcador de saciedad (PYY) aumentó cuando las células Caco-2 se trataron con células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* solo o combinado con las micelas lipídicas simples.

5 En el experimento con micelas lipídicas simples formadas por ácido oleico 0,6 mM en taurocolato 2 mM, el caldo de cultivo de MRS combinado con la mezcla de micelas lipídicas simples no indujo la expresión de PYY cuando se comparó con el tratamiento con micelas lipídicas solo. Las células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* aumentaron la expresión de PYY en comparación con los controles ($p < 0,05$ cuando se comparan con micelas lipídicas solo, y cuando se comparan con un 10 % de MRS solo). Cuando las micelas lipídicas se combinaron con las células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* en una proporción de 50 células bacterianas con respecto a una
10 célula Caco-2 la expresión de PYY se indujo del mismo modo aún que la alta variación provocó una disminución de la significancia estadística ($p = 0,08$ cuando se compara con el tratamiento con micelas lipídicas complejas).

Ejemplo 7

15 Efecto de *L. acidophilus* NCFM en la expresión de PYY (Series de tiempo)

Esbozo del ensayo

20 El experimento se realizó con células Caco-2 que se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) JPharm Sci 91, 669-79). Las células se diferenciaron hasta que la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) era de aproximadamente $200 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$. Las células se trataron con células bacterianas (50 microbios: Una célula Caco-2) o con un 0,1 % (v/v), un 1 % (v/v), y un 10 % (v/v) de sobrenadante sin células diluido en medio de cultivo de células Caco-2. Las muestras para estudios de expresión de PYY se recogieron en dos puntos temporales 3 h y 24 h
25 después de administrar las sustancias de ensayo.

Materiales y Métodos

30 Las células Caco-2 (HTB-37, Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC) se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo basal que consistía en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (DMEM, Invitrogen Carlsbad, CA, US) suplementado con FBS al 20 % (Invitrogen), glutamina estable 2 mM (Invitrogen), 1 x de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 20 U/ml de penicilina (Invitrogen), 20 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen), y 0,5 µg/ml de anfotericina (Invitrogen).

35 Las células Caco-2 se usaron en el pase 58 y se sembraron como $6,6 \times 10^5$ células/cm² en inserciones de cultivo celular de 12 pocillos (BIOCOAT HTS, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) y se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) J Pharm Sci 91, 669-79). En resumen, después de la siembra, las células se incubaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo de células basales sin antibióticos, tras lo
40 cual el medio se aspiró y se sustituyó con medio de diferenciación (Entero-STIM [BD Biosciences] suplementado con diluyente de suero MITO+ [BD Biosciences], 250 µl/250 ml de medio.) Al 4º día de cultivo, el medio se sustituyó, y al 5º día se realizó el experimento con bacterias así como con sobrenadante sin células.

45 La cepa NCFM de *L. acidophilus* (Danisco Cultures, París, Francia) se cultivó recién preparada en condiciones anaeróbicas a 37 °C en caldo de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) suplementado con glucosa al 1,0 % (p/v) hasta que la DO600 alcanzó 1,0-1,5. El sobrenadante sin células se recogió mediante centrifugación (25 °C, 5 min, 3000 g) y se retiró, y se diluyó a un 0,1 % (v/v), un 1 % (v/v) y un 10 % (v/v) en medio de diferenciación, y se filtró a través de unidades de filtró de jeringa estériles de 0,2 µm (Sartorius, Goettingen, Alemania). La densidad de las células bacterianas se calculó basándose en el valor de la DO, y se lavaron una vez con EnteroStim y se volvieron a
50 suspender en EnteroStim en una proporción de 50 células bacterianas con respecto a una célula Caco-2. Las sustancias de ensayo se aplicaron sobre el lado apical de las células Caco-2.

Después de los tratamientos los medios de cultivo celular se aspiraron en las células se sometieron a lisis con 150 µl de RA1 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) suplementado con β-mercaptoetanol al 1 % (Sigma). Las muestras para
55 el análisis de expresión de PYY de muestras de NCFM de *L. acidophilus* se tomaron después de 3 h y 24 h de incubación. El ARN de los lisados celulares se recogió con el kit de aislamiento de ARN Nucleospin 96 de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Macherey-Nagel). La síntesis de la primera hebra de ADNC se realizó con cebadores aleatorios usando Superscript III de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Invitrogen). El patrón de expresión de PYY en las muestras se analizó usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando oligonucleótidos que detectan de forma específica PYY de *Homo sapiens*. Los oligonucleótidos incluían: cebador directo: 5' GGA GGC CTC AGC TTG ACC 3'; cebador inverso: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG 3'; y la sonda: sonda Universal ProbeLibrary N.º 10 (Roche). El ciclo del umbral obtenido (Ct), que es el ciclo de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia cruza un
60 valor de umbral de fondo, se transformó en valor cuantitativo absoluto usando una curva patrón a partir de oligonucleótidos sintéticos cuantificados que representaban la secuencia antisentido de la transcripción diana que muestra la relación lineal log inversa entre el número de copias y el ciclo de PCR (Nurmi, J. T., Puolakkainen, P. A. y
65

Rautonen, N. E. (2005) Nutr Cancer 51, 83-92). La secuencia de este oligonucleótido convencional es: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG CGA TAG CTT GTG AAG CAG ACG AGC AGG AGG TGG AAG GCG AGG GAA GTC CCA AGG GCT GCA CTG CCG CAG GTC AAG CTG AGG CCT CC 3'.

5 El análisis estadístico se realizó con ANOVA.

Resultados

10 La Figura 6 muestra el efecto del sobrenadante sin células de NCFM de *L. acidophilus* y bacterias en la expresión de PYY. Se usaron tres diluciones diferentes de sobrenadante sin células de un 0,1 (v/v), un 1 % (v/v), y un 10 % (v/v). Las muestras para el estudio de expresión de PYY se recogieron 3 y 24 horas después de la aplicación de la sustancia de ensayo. * $p < 0,05$ en comparación con el control de Enterostim (medio); LA NCFM bact = bacterias NCFM de *L. acidophilus*.

15 Las células bacterianas de NCFM de *L. acidophilus* aumentaron la expresión de PYY en ambos puntos temporales, 3 h y 24 h después de la aplicación de las bacterias.

El sobrenadante sin células aumentó la expresión de PYY como un 10 % de dilución después de 3 h de incubación.

20 La dosis así como el momento del tratamiento influye en la expresión de PYY. Las células bacterianas, en particular las células bacterianas viables, pueden tener un efecto más sostenible en la expresión de PYY que los metabolitos.

Ejemplo 8

25 Efecto de las células bacterianas de *L. curvatus* 853 en la expresión de PYY

30 El experimento se realizó con células Caco-2 que se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) JPharm Sci 91, 669-79). Las células se diferenciaron hasta que la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) era de aproximadamente $200 \text{ ohm} \times \text{cm}^2$. Las células se trataron con las células bacterianas de *L. curvatus* 853 (50 microbios: Una célula Caco-2. Las muestras para análisis de expresión genética se recogieron después de 4 horas de tratamiento.

Materiales y Métodos

35 Las células Caco-2 (HTB-37, Colección Americana de Cultivos Tipo, ATCC) se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo basal que consistía en Medio de Eagle Modificado con Dulbecco (DMEM, Invitrogen Carlsbad, CA, US) suplementado con FBS al 20 % (Invitrogen), glutamina estable 2 mM (Invitrogen), 1 x de aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 20 U/ml de penicilina (Invitrogen), 20 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen), y 0,5 µg/ml de anfotericina (Invitrogen).

40 Las células Caco-2 se usaron en el pase 58 y se sembraron como $6,6 \times 10^5$ células/cm² en inserciones de cultivo celular de 12 pocillos (BIOCOAT HTS, BD Biosciences, Le Pont de Claix, Francia) y se diferenciaron de acuerdo con un protocolo de 5 días (Yamashita, S., Konishi, K., Yamazaki, Y., Taki, Y., Sakane, T., Sezaki, H. y Furuyama, Y. (2002) J Pharm Sci 91, 669-79). En resumen, después de la siembra, las células se incubaron durante la noche a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % humidificada en medio de cultivo de células basales sin antibióticos, tras lo cual el medio se aspiró y se sustituyó con medio de diferenciación (Entero-STIM [BD Biosciences] suplementado con diluyente de suero MITO+ [BD Biosciences], 250 µl/250 ml de medio.) Al 4º día de cultivo, el medio se sustituyó, y al 5º día se realizó el experimento con células bacterianas.

50 *L. curvatus* 853 se cultivo recién preparado en condiciones anaeróbicas a 37 °C en caldo de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) suplementado con glucosa al 1,0 % hasta que la DO600 alcanzó 1,0-1,5. El sobrenadante sin células se recogió mediante centrifugación (25 °C, 5 min, 3000 g) y se retiró. La densidad de las células bacterianas se calculó basándose en el valor de la DO, y se lavaron una vez con EnteroStim, se diluyeron y se aplicaron sobre el lado apical de las células Caco-2.

60 Después del tratamiento de 4 horas, los medios de cultivo celular se aspiraron en las células se sometieron a lisis con 150 µl de RA1 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) suplementado con β-mercaptoetanol al 1 % (Sigma). El ARN de los lisados celulares se recogió con el kit de aislamiento de ARN Nucleospin 96 de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Macherey-Nagel). La síntesis de la primera hebra de ADNc se realizó con cebadores aleatorios usando Superscript III de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Invitrogen). El patrón de expresión de PYY en las muestras se analizó usando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando oligonucleótidos que detectan de forma específica PYY de *Homo sapiens*. Los oligonucleótidos incluían: cebador directo: 5' GGA GGC CTC AGC TTG ACC 3'; cebador inverso: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG 3'; y la sonda: sonda Universal ProbeLibrary N.º 10 (Roche). El ciclo del umbral obtenido (Ct), que es el ciclo de PCR en el cual la intensidad de fluorescencia cruza un valor de

umbral de fondo, se transformó en valor cuantitativo absoluto usando una curva patrón a partir de oligonucleótidos sintéticos cuantificados que representaban la secuencia antisentido de la transcripción diana que muestra la relación lineal log inversa entre el número de copias y el ciclo de PCR (Nurmi, J. T., Puolakkainen, P. A. y Rautonen, N. E. (2005) *Nutr Cancer* 51, 83-92). La secuencia de este oligonucleótido convencional es: 5' TGC GCA CGA ACA CCA TAG CGA TAG CTT GTG AAG CAG ACG AGC AGG AGG TGG AAG GCG AGG GAA GTC CCA AGG GCT GCA CTG CCG CAG GTC AAG CTG AGG CCT CC 3'.

El análisis estadístico se realizó con ANOVA.

10 Resultados

La Figura 7 muestra el efecto de *L. curvatus* 853 en la expresión de PYY. Las muestras para el estudio de expresión de PYY se recogieron 4 horas después de la aplicación de la sustancia de ensayo. * $p < 0,05$ en comparación con el medio solo de control.

15 Las células bacterianas de *L. curvatus* 853 aumentaron la expresión de PYY después de 4 horas de incubación.

Referencias

20 Livak KJ, y Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*, 25 (4): 402-8.

Yamashita S, Konishi K, Yamazaki Y, Taki Y, Sakane T, Sezani H, Furuyama Y (2002) New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. *J Pharm Sci* 91 (3): 669-679.

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo en la fabricación de un soporte para administración a un sujeto para el tratamiento y/o prevención de obesidad y/o para la prevención de una enfermedad causada por obesidad; en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el microorganismo y/o un metabolito del mismo modula uno o más marcadores de saciedad.
- 15 3. Uso de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la modulación se produce de forma postprandial.
- 15 4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el microorganismo y/o un metabolito del mismo modula uno o más de los marcadores de saciedad seleccionados entre el grupo que consiste en: PYY, CCK, Grelina, Leptina, GLP-1, orexinas, neuropéptido Y hipotalámico orexigénico, ácido acético, amilina y oxintomodulina.
- 20 5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el nivel de uno o más de los siguientes marcadores de saciedad aumenta en plasma y/o el intestino: PYY, CCK, GLP-1, leptina (en sangre periférica), insulina y ácido acético.
- 25 6. Uso de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el nivel de uno o más de los siguientes marcadores de saciedad disminuye: grelina, orexinas y leptina (en el cerebro).
- 25 7. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el soporte es un soporte farmacéuticamente aceptable o un producto alimentario.
- 30 8. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el soporte es un medicamento.
- 30 9. Uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en el que el microorganismo es la cepa PTA-4797 de *Lactobacillus acidophilus*.
- 35 10. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el microorganismo y/o un metabolito del mismo se usa en combinación con uno o más lípidos y/o una o más micelas lipídicas.
- 35 11. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el microorganismo y/o metabolito del mismo se usa en combinación con un prebiótico.
- 40 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el prebiótico es uno más de los siguientes: inulina, un transgalacto-oligosacárido, oligosacárido de palantinoso, oligosacárido de soja, gentiooligosacárido, oxilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactitol, maltitol, o polidextrosa.
- 45 13. Una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo para uso en un método para tratar y/o prevenir la obesidad y/o prevenir una enfermedad causada por la obesidad en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo.
- 50 14. Una cepa de un microorganismo o un metabolito del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 13 en el que la cepa se incorpora en un soporte.
- 55 15. Una cepa de un microorganismo o un metabolito del mismo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14 en la que el soporte es un soporte farmacéuticamente aceptable o un producto alimentario.
- 55 16. Una cepa de un microorganismo o un metabolito del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 15 en la que el soporte es un medicamento.
- 60 17. Una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 en la que el microorganismo y/o metabolito del mismo se administra en combinación con un prebiótico.
- 65 18. Una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 17 en la que el prebiótico es uno más de los siguientes: inulina, un transgalacto-oligosacárido, oligosacárido de palantinoso, oligosacárido de soja, gentiooligosacárido, oxilooligómeros, almidón no degradable, lactosacarosa, lactulosa, lactitol, maltitol, o polidextrosa.

19. Un método no terapéutico para reducir el exceso de peso en un sujeto no obeso que comprende la administración de una cantidad eficaz de una cepa de un microorganismo y/o un metabolito del mismo, en el que la cepa es *Lactobacillus acidophilus* PTA-4797, o *Bifidobacterium lactis* 420, o *Bifidobacterium lactis* HN019, o *Lactobacillus salivarius* 33, y en el que el metabolito es un extracto bruto de un medio de cultivo en el que el microorganismo se cultiva o se cultivó y/o del microorganismo.
- 5

FIGURA 1

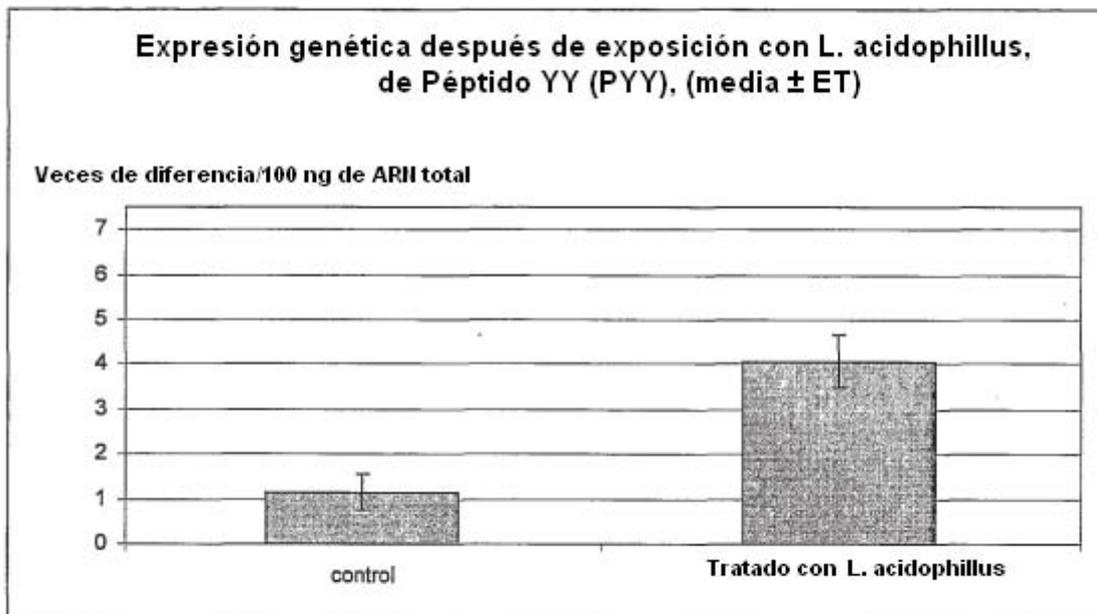


FIGURA 2

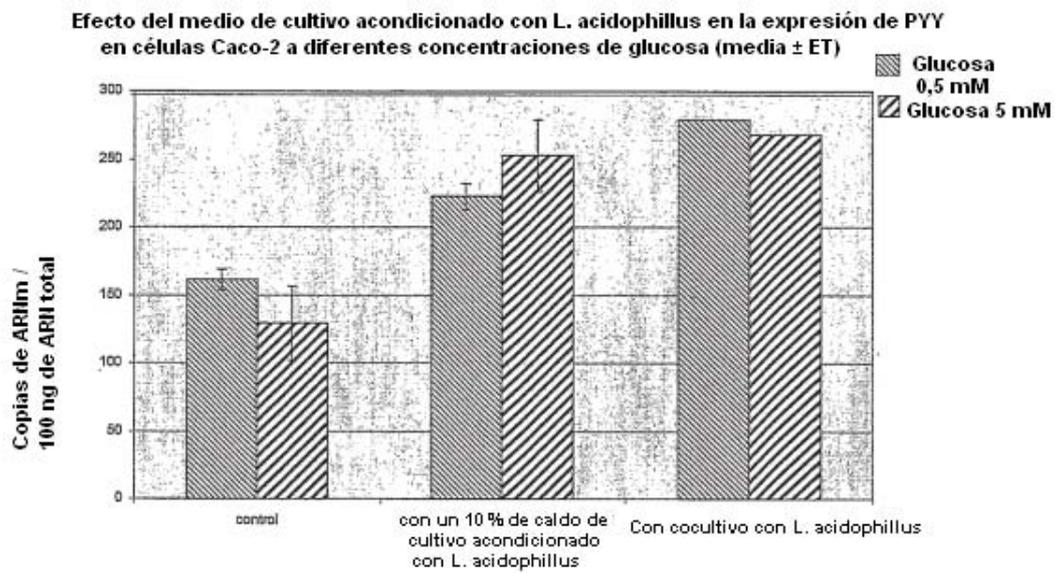


FIGURA 3

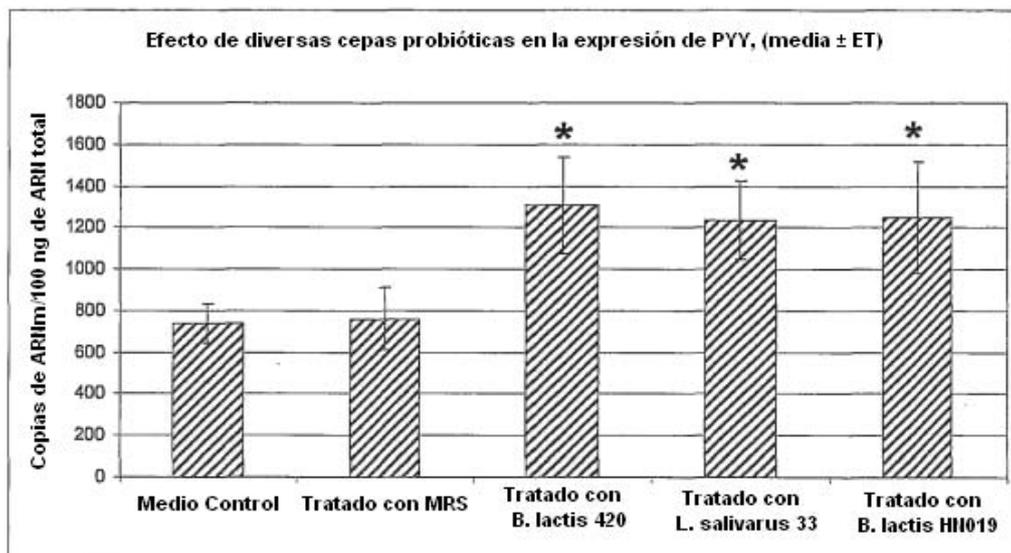


FIGURA 4

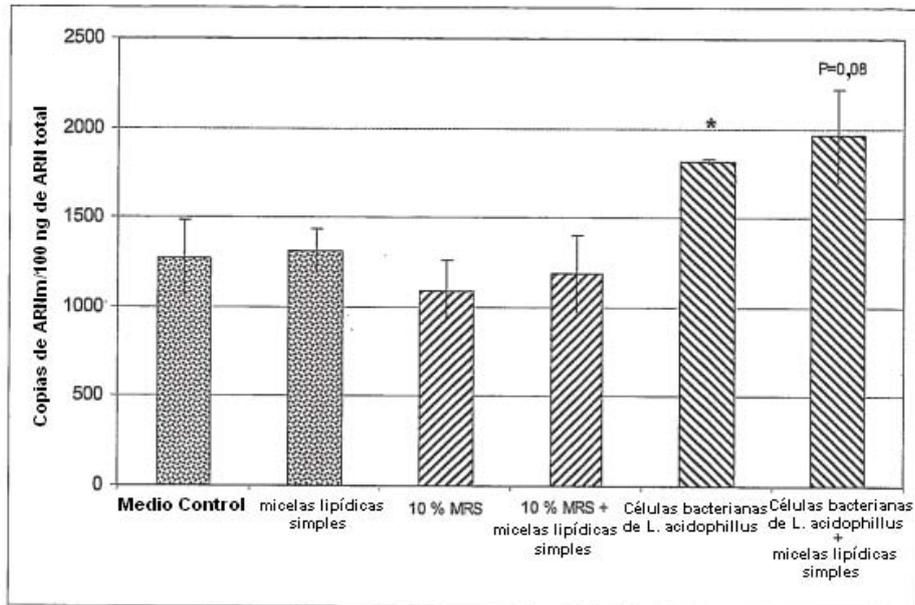


FIGURA 5

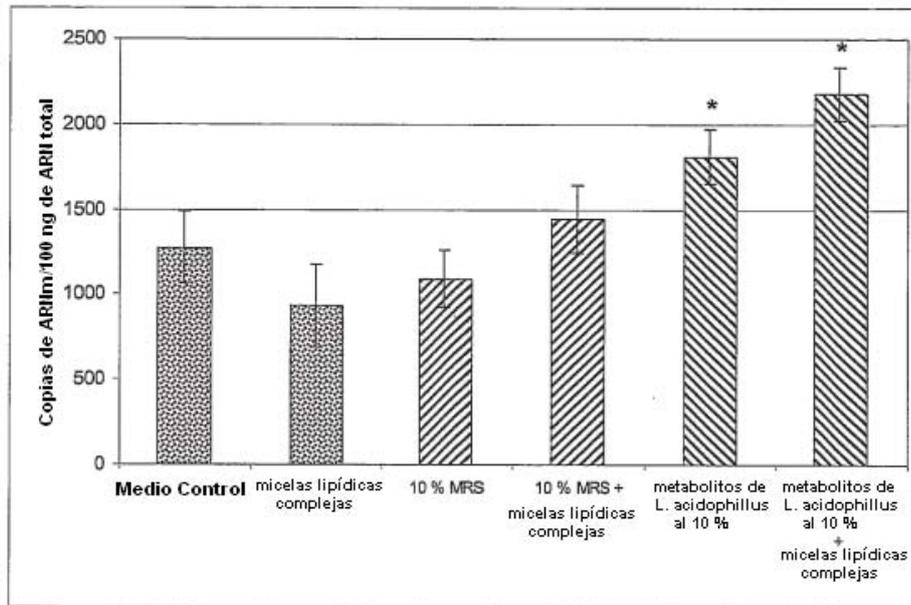


FIGURA 6

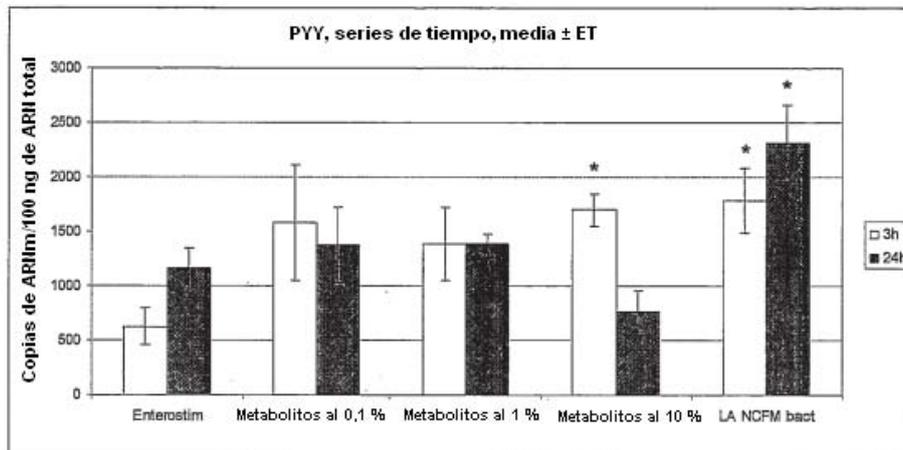


FIGURA 7

