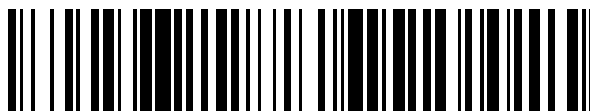


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 740**

51 Int. Cl.:

A23L 33/135	(2006.01)
A23L 2/52	(2006.01)
A61K 35/74	(2015.01)
A61P 3/04	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01)
A23K 10/16	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2012 PCT/NL2012/050592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13032328**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2012 E 12758652 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2753187**

54 Título: **Método para prevenir y/o tratar la resistencia a la insulina**

30 Prioridad:

30.08.2011 US 201161528931 P
30.08.2011 NL 2007319

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.03.2019

73 Titular/es:

CAELUS PHARMACEUTICALS B.V. (50.0%)
50, Rondweg
3474 KG Zegveld, NL y
ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM (50.0%)

72 Inventor/es:

NIEUWDORP, MAX y
DE VOS, WILLEM MEINDERT

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 705 740 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

Método para prevenir y/o tratar la resistencia a la insulina

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención está en el campo de la medicina. La invención está dirigida a bacterias de los taxones *Eubacterium hallii et rel. y/o Alcaligenes faecalis et rel.* que se usan opcionalmente en una composición farmacéutica, de alimentos o de piensos, para usar como un medicamento, en particular para prevenir y/o tratar la resistencia a la insulina y/o las complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina, como el síndrome metabólico, la dislipidemia y la diabetes mellitus tipo 2.

Antecedentes de la invención

15 [0002] La obesidad es principalmente una consecuencia de los hábitos nutricionales y físicos perjudiciales con un contexto genético desfavorable. Es un factor de riesgo importante para el desarrollo de afecciones médicas comunes como el síndrome metabólico, la diabetes mellitus tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares. Como órgano metabólicamente activo, el intestino humano contiene una densa y diversa comunidad de microorganismos, dominada por más de mil especies bacterianas diferentes. Existe una creciente evidencia del papel de la microbiota intestinal en el metabolismo del huésped.

25 [0003] Los filos que representan la gran mayoría de la microbiota intestinal incluyen los Bacteroidetes, Proteobacterias y Verrucomicrobia Gram negativos, así como los Firmicutes y Actinobacteria Gram positivos. Anteriormente se demostró que la microbiota intestinal contribuye al desarrollo de la obesidad inducida por la dieta en ratones. La microbiota colónica en ratones obesos parecía estar caracterizada por una menor diversidad microbiana y un enriquecimiento en usuarios de carbohidratos y de lípidos. Supuestamente, el acetato de ácidos grasos de cadena corta, el propionato y el butirato producidos por bacterias intestinales específicas podrían servir como una señal que influye directamente en la sensibilidad de la insulina hepática y periférica del huésped. Por otro lado, investigaciones recientes demostraron que una menor diversidad microbiana intestinal en ratones estaba asociada con la inflamación crónica inducida por endotoxemia y el desarrollo posterior de resistencia a la insulina.

35 [0004] El documento W02008/076696 se refiere a un método y composiciones para regular el balance de energía en un sujeto, y describe que el balance de energía de un sujeto puede modularse alterando la población de microbiota intestinal del sujeto.

40 [0005] En los seres humanos, la microbiota colónica alterada se ha correlacionado con la obesidad, pero no existe consenso sobre los grupos bacterianos específicos de especies y la evidencia de un papel causal. Como existen fenotipos metabólicos sanos y obesos poco saludables basados en la ausencia o presencia de resistencia a la insulina, los informes publicados sobre las asociaciones entre la composición de la microbiota intestinal y la obesidad humana parecen estar comprometidos por la heterogeneidad en el fenotipo obeso, diversos factores de confusión (por ejemplo, la dieta, el uso de medicamentos) y métodos en desarrollo para analizar la microbiota intestinal. Esto es particularmente cierto para la microbiota del intestino delgado que es relativamente inaccesible pero está expuesta a una superficie grande. Se ha encontrado que la diversidad microbiana del intestino delgado es más pequeña que la del colon y está notablemente enriquecida en bacterias que pertenecen a Lactobacillales y Veillonella spp. (Booijnck y col. 2010 Env Microbiol 12: 3213-27). Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de encontrar otros medicamentos adecuados para tratar y/o prevenir la resistencia a la insulina y/o la diabetes mellitus tipo 2, preferiblemente medicamentos que puedan incorporarse fácilmente en el estilo de vida del paciente, por ejemplo en forma de composiciones alimenticias para el consumo diario.

50 **Breve descripción de la invención**

[0006] La invención se define por las reivindicaciones.

55 [0007] La presente invención se relaciona con *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, y/o *Alcaligenes faecalis* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr de *Alcaligenes faecalis*, para uso en la prevención y/o tratamiento de la resistencia a la insulina y/o complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina seleccionadas de síndrome metabólico, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas, como en sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndromes de lipodistrofia.

65 [0008] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, alimentaria o de pienso que comprende *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, y/o *Alcaligenes faecalis* o parientes que tienen al menos 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Alcaligenes faecalis*, para su uso en la prevención y/o

tratamiento de la resistencia a la insulina y/o complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina, en donde las complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina se seleccionan de síndrome metabólico, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas, como en sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndromes de lipodistrofia.

5

Definiciones

[0009] Según se usa en el contexto de la presente invención, el término "resistencia a la insulina" tiene su significado común en la técnica. La resistencia a la insulina es una condición fisiológica en la que la hormona natural, la insulina, se vuelve menos efectiva para reducir los niveles de azúcar en la sangre. El aumento resultante en la glucosa en la sangre puede elevar los niveles fuera del rango normal y causar efectos adversos para la salud como el síndrome metabólico, la dislipidemia y, posteriormente, la diabetes mellitus tipo 2. El término "complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina" y "afecciones relacionadas con la resistencia a la insulina", como se usa en este documento, se seleccionan de síndrome metabólico, dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2, así como resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas (por ejemplo, sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndromes de lipodistrofia). El término "*et rel.*" utilizado en la descripción significa "o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S". La adición "*et rel.*" detrás del nombre de grupo de tipo género (nombre de grupo de nivel 2) significa "y parientes" ("*et relatives*" en inglés), que indica a todos los parientes de este grupo filogenético, es decir, aquellos indicados en la Tabla 3 del documento WO 2011/043654 (que se incorpora aquí como referencia), en la columna titulada "nivel 3". Esta información, incluidas las secuencias genéticas indicadas de ARNr 16S, se puede usar para desarrollar cebadores de PCR específicos o sondas LCR para detectar uno o más miembros de estos grupos. En alguna literatura el término "*et rel.*" se sustituye por "de tipo" para indicar el hecho de que el grupo incluye más de una especie relacionada. Sin embargo, esta es una designación bastante ambigua y, por lo tanto, todos los términos con "*et rel.*" se definen claramente en la Tabla 3 del documento WO 2011/043654, que también ha sido publicado por Rajilic-Stojanovic y col. (2007. *Environ. Microbiol.* 9 (9): 2125-2136).

[0010] En el contexto de la invención, un sujeto puede ser un animal o un ser humano. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano. Un "sujeto sano" como se menciona en este documento no sufre de resistencia a la insulina y/o diabetes mellitus, y preferiblemente no sufre de ninguna afección o enfermedad del tracto gastrointestinal, y más preferiblemente no sufre de ninguna afección o enfermedad conocida. Preferiblemente, un "sujeto sano" como se menciona aquí tiene un Índice de Masa Corporal (IMC) del orden de entre 18,5 y 24,9 kg/m².

[0011] Tal como se usa en este documento, el nivel de bacterias de los taxones *Eubacterium halli et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* en una muestra, por ejemplo, una muestra intestinal (por ejemplo, duodenal o fecal), aumenta cuando es significativamente más alta que el nivel de dichas una o más bacterias en una muestra de control, por ejemplo, una muestra de control intestinal (por ejemplo, duodenal o fecal). También se considera aumentado cuando el nivel de bacterias de los taxones *Eubacterium halli et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* en una muestra es de al menos el 5 %, tal como un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % más alto que las bacterias de los taxones *Eubacterium halli et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* en la muestra control. La "muestra de control" como se usa en el presente documento se refiere a una muestra tomada de un sujeto que recibe tratamiento mediante la administración de bacterias de los taxones *Eubacterium halli et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* antes de la administración de bacterias de los taxones *Eubacterium halli et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.*, opcionalmente en una cantidad efectiva.

45

[0012] Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para lograr un efecto terapéutico y/o profiláctico deseado, por ejemplo, una cantidad que resulta en el tratamiento y/o prevención de la resistencia a la insulina y/o complicaciones relacionadas como la dislipidemia y la diabetes mellitus tipo 2, así como la resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas (p. ej., sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndromes de lipodistrofia). En el contexto de las aplicaciones terapéuticas o profilácticas, la cantidad de bacterias administradas al sujeto dependerá del tipo y la gravedad de la enfermedad o afección y de las características del sujeto, como la salud general, la edad, el sexo, el peso corporal y la tolerancia a los fármacos. También dependerá del grado, la gravedad y el tipo de enfermedad o afección. El experto en la materia podrá determinar las dosis apropiadas dependiendo de estos y otros factores. Las bacterias también pueden administrarse en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales. Por ejemplo, con la frase una "cantidad terapéuticamente efectiva" de las bacterias se hace referencia a los niveles de las bacterias que conducen a una mejora de los efectos fisiológicos de una enfermedad o afección asociada con la resistencia a la insulina y/o complicaciones relacionadas como la dislipidemia y la diabetes tipo 2 mellitus así como resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas (p. ej., sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndromes de lipodistrofia). El experto en la materia será capaz de determinar cuándo se ha tratado o prevenido dicha enfermedad o afección.

[0013] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se utilizan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, el verbo "consistir" puede ser reemplazado por "consistir

65

esencialmente en" lo que significa que una composición de la invención puede comprender componentes adicionales a los identificados específicamente, dichos componentes adicionales no alteran las características únicas de la invención.

- 5 **[0014]** Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que haya más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" por lo general significa "al menos uno".

Descripción detallada de la invención

10

[0015] Los presentes inventores han encontrado un papel causal de la microbiota del intestino delgado en la resistencia a la insulina y la dislipidemia. Dieciocho sujetos varones con síndrome metabólico recién diagnosticado se sometieron a biopsias del intestino delgado y al posterior lavado intestinal con polietilenglicol a través de la inserción del tubo duodenal, seguido de una asignación aleatoria a trasplantes fecales alogénicos o autólogos. En el grupo alogénico de trasplante fecal que se realizó en 9 sujetos, el material fecal se derivó de un donante sano y magro. El grupo de trasplante autólogo incluyó los otros 9 sujetos y estos recibieron su propio material fecal.

15

[0016] Se encontró que los sujetos del grupo alogénico se caracterizaban por una microbiota intestinal sigmoide diferente en comparación con los del grupo autólogo según se determinó mediante análisis con un microarray filogenético (el chip humano del tracto intestinal, HITChip) (Rajilic-Stojanovic. 2009. Environ. Microbiol. 11 (7): 1736-1751). Los niveles de ayuno de lipoproteínas ricas en TG (relación TG/ApoB) se redujeron significativamente en los sujetos en el grupo alogénico sin efecto después de la infusión de heces autólogas. Aunque el peso de los sujetos permaneció estable, 6 semanas después del trasplante de heces, se observó una mejoría en la sensibilidad a la insulina tanto periférica (Rd) como hepática (supresión de EGP) 6 semanas en el grupo alogénico, mientras que no se observaron cambios significativos en el grupo de tratamiento autólogo.

20

[0017] Los presentes inventores han identificado cambios en la microbiota del intestino delgado entre sujetos que reciben trasplantes fecales alogénicos o autólogos. La comparación de la composición de la microbiota del intestino delgado al inicio del estudio y después de 6 semanas en el grupo alogénico mostró un aumento de la abundancia de bacterias relacionadas con el íleon: el hábitat de *Alcaligenes faecalis* y *Eubacterium hallii*, que produce butirato. En particular, el último productor de butirato se redujo casi el doble después de la infusión en el grupo autólogo. Bacterias pertenecientes a *Eubacterium hallii et rel.* incluyen anaerobios de crecimiento relativamente rápido. Tienen la capacidad metabólica para convertir el lactato en butirato en un proceso que necesita acetato (Munoz-Tamayo y col. 2011 FEMS Microbiol Ecolo 76: 615-624). El lactato y el acetato son metabolitos abundantes en el tracto intestinal superior que está colonizado por, entre otros, estreptococos y lactobacilos que pueden producir estos compuestos (Booijink y col. 2010, *vide supra*). Sin embargo, puede ser una realización específica de la presente invención incluir los sustratos de lactato y acetato en la formulación que contiene bacterias que pertenecen al taxón *Eubacterium hallii et rel.* Las bacterias relacionadas con *Alcaligenes faecalis* (que pertenecen al taxón *Alcaligenes faecalis* y col.) son bacterias anaerobias facultativas que degradan una variedad de sustratos: tienen la capacidad inusual de producir óxido nítrico y nítrico en condiciones de bajo oxígeno en presencia de amoníaco (Anderson y col. 1993 Appl Environ Microbiol 95: 3525-33). Como estas condiciones se cumplen en el intestino superior, es posible que *Alcaligenes faecalis* produzca óxido nítrico. Se ha propuesto que el óxido nítrico es una terapia para el tratamiento de pacientes con diabetes tipo 2 y síndrome metabólico (Ahanchi y col. 2008). Am J Physiol Heart Circ Physiol 295: H2388-98). Sin embargo, el suministro de óxido nítrico a través de su producción por bacterias intestinales no se ha descrito.

30

[0018] Por lo tanto, la presente invención se refiere a bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* para uso en la prevención y/o tratamiento de la resistencia a la insulina y/o complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina seleccionadas de entre síndrome metabólico, dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2, así como resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas (p. ej., sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing o síndromes de lipodistrofia). En otra realización, la presente invención se refiere a bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una afección clínica en un mamífero, como el humano, que resulta de que la insulina, la hormona endógena, se vuelve menos efectiva para reducir los niveles de azúcar en la sangre y los perfiles subsiguientes de colesterol en plasma. Las condiciones clínicas incluyen síndrome metabólico, dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2, así como resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas (p. ej., sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndromes de lipodistrofia). Las bacterias de cualquiera de los taxones se pueden usar solas como medicamento para los fines indicados, o las bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* pueden usarse juntas como un medicamento. Además, se puede usar una combinación de cualquiera de estos taxones de bacterias o bacterias de su taxón en conjunto con los agentes terapéuticos utilizados actualmente en la práctica clínica (por ejemplo, biguanidas, derivados de sulfonuro, agonistas de gamma PPAR, inhibidores de DPPIV y medicamentos inyectables como agonista de GLP1 y/o insulina exógena de acción corta/larga).

40

50

60

- [0019]** La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica, alimentaria o de pienso que comprende *Eubacterium hallii et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* para uso en la prevención y/o tratamiento de la resistencia a la insulina y/o complicaciones relacionadas como dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2. La composición farmacéutica, de alimentos o piensos comprende preferiblemente una cantidad eficaz de *Eubacterium hallii et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* Preferiblemente, la composición farmacéutica, de alimentos o piensos comprende en total entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{12} , preferiblemente entre aproximadamente 10^8 y aproximadamente 10^{12} , bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* Preferiblemente, dichas bacterias están contenidas en un cierre diario.
- 10 **[0020]** En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica, alimentaria o de piensos que comprende *Alcaligenes faecalis et rel.*, opcionalmente para uso como medicamento. Dicha composición puede comprender un portador, tal como un portador inerte.
- [0021]** Preferiblemente, la posición mencionada en este documento es para administración enteral u oral. Una
15 composición para administración enteral u oral puede ser una composición alimenticia, una composición de pienso o una composición farmacéutica. Dicha composición alimenticia, composición de pienso o composición farmacéutica no incluye composiciones fecales o composiciones derivadas de composiciones fecales.
- [0022]** Una composición farmacéutica comprenderá habitualmente un portador, tal como un portador
20 farmacéutico, además de las bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* El portador es preferiblemente un portador inerte. La forma preferida depende del modo de administración previsto y de la aplicación (terapéutica). Un portador farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica, adecuada para administrar bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* al tracto gastrointestinal de un sujeto. Por ejemplo, se puede usar agua estéril o sólidos inertes como un portador
25 que suele complementarse con un adyuvante, un agente de tamponamiento, un agente dispersante y similares farmacéuticamente aceptables. Una composición estará en líquido, por ejemplo, una suspensión estabilizada de bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.*, o en formas sólidas, por ejemplo, un polvo de bacterias liofilizadas del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* En el caso de la liofilización, puede preverse un crioprotector como la lactosa, la trehalosa o el
30 glucógeno. Por ejemplo, para administración oral, bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* se pueden administrar en formas de dosificación sólidas, como cápsulas, pastillas y polvos, o en formas de dosificación líquidas, como elixires, jarabes y suspensiones. Bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* se pueden encapsular en cápsulas como cápsulas de gelatina, junto con ingredientes inactivos y portadores en polvo, como por ejemplo glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, almidón,
35 celulosa o derivados de celulosa, estearato de magnesio, ácido esteárico, sacarina de sodio, talco, carbonato de magnesio y similares.
- [0023]** Una composición preferida de acuerdo con la invención es adecuada para el consumo por parte de un sujeto, que es preferiblemente un animal humano o no humano. Dichas composiciones pueden estar en forma de un
40 complemento alimenticio o una composición alimenticia o alimentaria (en este documento, conjuntamente, se denomina "composición alimenticia"), que además de las bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* también contiene una base alimenticia adecuada. Alternativamente, dicha composición puede estar en forma de un suplemento alimenticio o un pienso o composición alimenticia (en este documento, conjuntamente, se denomina "composición alimenticia"). Una composición de alimento o comida o
45 composición de pienso se entiende aquí que incluye un líquido para consumo humano o no humano, es decir, una bebida o brebaje. Un alimento o una composición de alimentos o una composición de pienso puede ser un alimento o composición de alimentos sólido, semisólido y/o líquido, y en particular puede ser un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado, que incluye, entre otros, un yogur, una bebida a base de yogur o suero de leche. Tal alimento o composición de alimento o composición de pienso puede prepararse de una manera conocida, por ejemplo,
50 añadiendo bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* a un alimento, base alimenticia o base de pienso adecuado, en una cantidad adecuada. De manera similar, esto puede incluir el uso de estas bacterias en forma encapsulada como se describió anteriormente, ya que tienen que pasar el bajo pH del estómago. Esta también puede ser una forma preferida de reducir las trazas de butirato que están asociadas con el crecimiento de bacterias que pertenecen al taxón *Eubacterium hallii et rel.* y puede producir un sabor desagradable en
55 un alimento o en una composición de alimentos. En otra realización, las bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* se pueden usar en o para la preparación de un alimento o composición de alimento o composición de pienso, por ejemplo, por fermentación. Al hacerlo, las bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* se puede usar de una manera conocida per se para la preparación de tales alimentos fermentados o composiciones alimenticias fermentadas o composiciones de
60 piensos fermentados, por ejemplo, de una manera conocida per se para la preparación de productos lácteos fermentados usando bacterias de ácido láctico. En tales métodos, las bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* se pueden usar además de un microorganismo que se usa generalmente, y/o puede reemplazar uno o más o parte de un microorganismo que se usa habitualmente.

[0024] Preferiblemente, las composiciones anteriores contendrán bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* en cantidades que permitan una administración (oral) conveniente como se indicó anteriormente, por ejemplo, como una o más dosis por día o por semana. En particular, una preparación puede contener una dosis unitaria de bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.*

[0025] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para prevenir y/o tratar la resistencia a la insulina y/o complicaciones relacionadas como dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2. En un sujeto que lo necesite, dicho método comprende la etapa de aumentar el nivel de *Eubacterium hallii et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* en el intestino delgado.

[0026] El nivel de dichas bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* se puede medir determinando los niveles de secuencias de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos y/o metabolitos específicos para dicha una o más bacterias, preferiblemente el nivel de secuencias de ácido nucleico específicas para dicha una o más bacterias.

[0027] El nivel de dicha una o más bacterias puede medirse preferiblemente determinando el nivel de secuencias específicas de ácido nucleico en una muestra de prueba derivada del intestino delgado, cuyas secuencias de ácido nucleico son preferiblemente secuencias de genes de ARNr 16S de bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* y/o bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.*, más preferiblemente una o más regiones variables de dichas secuencias de genes de ARNr 16S, por ejemplo, una o más de las regiones variables V1 y/o V6 de dichas secuencias de genes de ARNr 16S.

[0028] El nivel de *Eubacterium hallii et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* en el intestino delgado se puede aumentar mediante un método seleccionado del grupo que consiste en administrar una cantidad eficaz de *Eubacterium hallii et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* a dicho sujeto, y administrando una cantidad efectiva de un compuesto capaz de aumentar el nivel de *Eubacterium hallii et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* en el intestino delgado.

[0029] Los compuestos capaces de aumentar el nivel de *Eubacterium hallii et rel.* en el intestino delgado pueden incluir, sin limitación, lactato y acetato. Alternativamente, *Eubacterium hallii et rel.* se pueden administrar en combinación con bacterias productoras de ácido láctico, como *Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.* Las bacterias productoras de ácido láctico pueden estar presentes en un producto alimenticio fermentado como el yogur o una bebida de yogur per se, y se puede añadir *Eubacterium hallii et rel.* Los compuestos capaces de aumentar el nivel de *Alcaligenes faecalis et rel.* en el intestino delgado pueden incluir, sin limitación, sustratos que permiten la producción de óxido nitroso y nítrico en condiciones de bajo oxígeno en presencia de amoníaco.

[0030] En una realización, las bacterias del taxón *Eubacterium hallii et rel.* son bacterias de la cepa L2-7 de *Eubacterium hallii*. La cepa *Eubacterium hallii* L2-7 (DSM 17630) está disponible en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSMZ). Las bacterias del taxón *Alcaligenes faecalis et rel.* pueden, por ejemplo, cultivarse de acuerdo con Annamalai y col. (Ann Microbiol. Diciembre 2011; 61 (4): 801-807).

[0031] El experto en la materia será capaz de seleccionar una cantidad eficaz de un compuesto capaz de aumentar el nivel de *Eubacterium hallii et rel.* y/o *Alcaligenes faecalis et rel.* en el intestino delgado usando métodos que son rutinarios en la técnica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Métodos

[0032] Se realizó un ensayo controlado aleatorio doble ciego en el que se investigó el efecto de una infusión fecal microbiana alogénica (donante magro) en el metabolismo de la glucosa en relación con la composición de microbiota intestinal en sujetos obesos.

Sujetos

[0033] Se examinaron sujetos caucásicos machos obesos para detectar las características del síndrome metabólico que comprende circunferencia de la cintura > 102 cm y glucosa plasmática en ayunas > 5,6 mmol/l. Se excluyeron 17 sujetos con colestectomía y/o que usaron cualquier medicamento, probióticos y/o antibióticos en los 3 meses precedentes. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los sujetos. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional y se llevó a cabo de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki (1996). El estudio se registró en el registro de ensayos holandés en línea (NTR1776).

Selección de donantes magros

[0034] Los machos caucásicos magros (IMC <23 kg/m²) también fueron reclutados por anuncios en los periódicos. Completaron un cuestionario sobre hábitos intestinales, antecedentes de viaje, comorbilidad y uso de medicamentos. Se examinaron en busca de la presencia de enfermedades infecciosas según una versión adaptada del cuestionario del servicio holandés de transfusión de sangre (Sanquin) (Langeveld y col. 2008. J Clin Endocrinol Metab; 93 (3): 845-851). La sangre se analizó en busca de la presencia de anticuerpos contra el virus de inmunodeficiencia humana; virus tinfogotrópico humano; Hepatitis A, B y C; citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, Strongyloides; y amebiasis. Los donantes también se excluyeron si el examen de sus heces revelaba la presencia de parásitos (por ejemplo, Blastocystis hominis o Dictyostelium fragilis), Clostridium difficile y otras posibles bacterias patógenas (Shigella, Campylobacter, Yersinia, Salmonella).

Diseño experimental

[0035] El metabolismo de la glucosa se midió en el estado basal y durante una prueba de clamp euglucémico hiperinsulinémico de dos pasos para medir la producción de glucosa endógena (EGP), la sensibilidad a la insulina hepática y periférica (tasa de eliminación, Rd) usando glucosa [6,6-2H₂]. Se registró el peso corporal y se midió la composición corporal mediante análisis de bioimpedancia. El gasto de energía en reposo (REE) y el cociente respiratorio se midieron usando calorimetría indirecta (Langeveld, J Clin Endocrinol Metab 2008; 93 (3): 845-851).

[0036] Se permitió a los participantes mantener su propia dieta, pero se les pidió que mantuvieran un diario nutricional en línea semanalmente (www.dieetinzicht.nl) para controlar la ingesta calórica. Después de una noche de ayuno, los sujetos del estudio y los donantes trajeron heces frescas de la mañana para su procesamiento; los sujetos del estudio se asignaron al azar de forma doble ciego a infusión microbiana intestinal alogénica (de donantes magros con IMC <23 kg/m²) o autológica (propias heces recolectadas) a través de infusión gastroduodenal (ver procedimiento). Los sujetos del estudio se sometieron por primera vez a una gastroduodenoscopia y se tomaron biopsias del intestino delgado (yeyuno) cerca del ligamento de Treitz. Las muestras de biopsia se recogieron en tubos estériles, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se procesaron como se describió anteriormente (Langeveld y col., *supra*). Se colocó un tubo duodenal y se realizó un lavado intestinal con solución de macrogol durante 5 horas para limpiar la contaminación fecal externa seguida por la infusión microbiana intestinal. Las biopsias asistidas por gastroduodenoscopia y el clamp euglucémico hiperinsulinémico se repitieron 6 semanas después del trasplante.

Clamp euglucémico hiperinsulinémico

[0037] Después de un ayuno de 12 horas, se insertó un catéter en una vena antecubital para la infusión de trazador de isótopo estable [6,6-2H₂] de glucosa (isótopos de Cambridge, Andover, MA), insulina y glucosa. Se insertó un segundo catéter retrógrado en la vena de la mano contralateral y se mantuvo en una caja de plástico transparente termorregulada (60 °C) para tomar muestras de sangre venosa arterializada. La solución salina se infundió como NaCl al 0,9 % a una velocidad de 50 ml/h para mantener los catéteres claros. A t = 0 h (0800), se extrajeron muestras de sangre para la determinación de los enriquecimientos de fondo. Luego, se inició una infusión continua de isótopos cebada: [6,6-2H₂] glucosa (primer: 8,8 μmol/kg; continuo: 0,11 μmol • kg⁻¹ • min⁻¹) y continuó hasta el final del clamp. Después de un período de equilibrio de 2 h, se extrajeron muestras de sangre para los enriquecimientos de isótopos y muestras de hormonas glucorreguladoras, ácidos grasos libres (FFA) e incretinas. Posteriormente (t = 2,0 h), se inició un clamp euglucémico hiperinsulinémico de 2 pasos: el paso 1 incluía una infusión de insulina a una tasa de 20 mU • m⁻² • min⁻¹ (Actrapid 200 UI/ml; Novo Nordisk Farma BV, Alphen aan den Rijn, Países Bajos) para evaluar la sensibilidad a la insulina hepática. La glucosa al 20 % comenzó a mantener una concentración de glucosa en plasma de 5 mmol/L. Las concentraciones de glucosa en plasma se midieron cada 5 minutos al lado de la cama usando un medidor de glucosa Beckman. Después de 2 h (t = 4 h), se extrajeron muestras de sangre a intervalos de 5 minutos para medir las concentraciones de glucosa y los enriquecimientos isotópicos. Se extrajo otra muestra de sangre para medir las hormonas glucorreguladoras y los FFA. En lo sucesivo, la infusión de insulina se incrementó a una velocidad de 60 mU • m⁻² • min⁻¹ (paso 2) para evaluar la sensibilidad a la insulina periférica. Después de otras 2 h (t = 6 h), se repitió el muestreo de sangre.

[0038] La composición corporal se midió al inicio y después de 6 semanas con un análisis de impedancia bioeléctrica (Maltron BF906; Maltron, Rayleigh, Reino Unido). El consumo de oxígeno (V_{O2}) y la producción de CO₂ (VCO₂) se midieron continuamente durante los 20 minutos finales tanto del estado basal como del clamp euglucémico hiperinsulinémico mediante calorimetría indirecta utilizando un sistema de campana ventilada (Sensormedics modelo 2900; Sensormedics, Anaheim, CA). Las tasas de REE, oxidación de carbohidratos (CHO) y oxidación de ácidos grasos (FAO) se calcularon a partir del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono. La tasa de aparición (Ra) y la tasa de desaparición (Rd) de glucosa se calcularon utilizando la forma modificada de las ecuaciones de Steele para mediciones en estado no estacionario como se describió anteriormente.³⁸ La producción de glucosa endógena (EGP) se calculó como la diferencia entre la glucosa Ra y la velocidad de infusión de glucosa. Tanto la sensibilidad a la insulina periférica (Rd) como la hepática (supresión de EGP) se calcularon y expresaron como mediana con rango.

65

Análisis de microbiota intestinalAislamiento de ADN

5 **[0039]** El ADN se aisló y se purificó utilizando el método repetido de columna de golpeo de microesferas plus como se describió anteriormente (Zoetendal, SystAppl Microbiol 2001; 24 (3): 405-410). Para el aislamiento de ADN de las biopsias, utilizamos un protocolo diferente de golpeo de microesferas (Nadkarni y col. 2002. Microbiology 2002; 148 (Pt 1): 257-266). En resumen, se suspendieron 0,5 gramos (peso húmedo) de las heces en tampón de lisis (NaCl 500 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,50 mM EDTA, SDS al 4 %) más microesferas de zirconia y microesferas de vidrio. El tubo se agitó con Fastprep (en el ajuste 5.5) durante 3 minutos a 4 °C, seguido de incubación a 95 °C durante 15 minutos. El ADN en el sobrenadante se precipitó con acetato de amonio e isopropanol, se lavó con etanol al 70 % y luego se trató con proteinasa K y ARNasa libre de ADNasa. Finalmente, el ADN se purificó en una columna de centrifugación QIAamp (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de ADN se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Nanodrop® Technologies, Wilmington, DE).

15

Perfil de microbiota HITChip

[0040] El HITChip se usó para el perfil filogenético de la microbiota en heces y biopsias de intestino delgado como se describió anteriormente (Rajilic-Stovanojic. 2009, *supra*). En resumen, se utilizaron 10 ng de ADN para amplificar los genes de ARNr 16S utilizando los cebadores T7prom-Bact-27-for y Uni-1492-seguidos de la transcripción y el marcado in vitro con Cy3 y Cy5, respectivamente, para muestras fecales. El cebador Prok-1369-rev se usó como cebador inverso para las muestras de biopsia porque Uni-1492-rev apuntaba principalmente al ADN humano sobreabundante, dando como resultado su agotamiento para una amplificación eficaz del gen ARNr 16S bacteriano (datos no mostrados). Las mezclas equimolares de dianas de ARNr 16S marcadas con Cy3/Cy5 se fragmentaron y posteriormente se hibridaron en las micromatrices a 62,5 °C durante 16 h en un horno de rotación (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Bajos) seguido del lavado y secado de los portaobjetos. Las muestras se dispusieron en dúplex (replicación técnica). Después de escanear las diapositivas, los datos se extrajeron de las imágenes de microarrays utilizando el software Agilent Feature Extraction, versiones 7.5 a 9.1 (<http://www.agilent.com>). Posteriormente, los datos de la micromatriz se normalizaron al mínimo y se analizaron mediante un conjunto de scripts basados en R (<http://www.r-project.org/>) en combinación con una base de datos relacional diseñada a medida que se ejecuta bajo el sistema de gestión de base de datos MySQL (<http://www.mysql.com>). El agrupamiento jerárquico de los perfiles de sonda se llevó a cabo utilizando la distancia basada en la correlación y el método de enlace completo.

35 Procedimiento de trasplante fecal

[0041] El paciente y el donante entregaron heces recién producidas el día de la infusión (aproximadamente 200 gramos, producidas dentro de las 6 horas anteriores al uso). Se tomaron muestras fecales (alógenas o autólogas) antes y después del procesamiento para estudiar los efectos del procedimiento en la composición microbiana. Después de su entrega, las heces se cubrieron con solución salina estéril 50000 (NaCl al 0,9 %), se transfirieron a un mezclador y se mezclaron durante 10 minutos. La solución homogeneizada se filtró luego dos veces a través de un tamiz metálico limpio. Posteriormente, el filtrado se transfirió a una botella de vidrio estéril de 1000 ml y se almacenó a temperatura ambiente hasta que el paciente hubo terminado el lavado intestinal. Finalmente, la solución microbiana fecal se reposó gradualmente a través del tubo duodenal, en aproximadamente 30 minutos.

45

Bioquímica

[0042] Se obtuvieron muestras de plasma en ayunas para medir el colesterol total, el colesterol LDL (LDLc), el colesterol HDL (HDLc) y los triglicéridos (TG), utilizando ensayos enzimáticos disponibles comercialmente (Randox, EE. UU. Y Daiichi, Japón). Todos los análisis se realizaron utilizando un autoanalizador Cobas Mira (Horiba, Francia). La proteína de unión LPS (LBP) y la proteína reactiva C (CRP) se midieron utilizando un ELISA comercial (HyCult, EE. UU. Y Roche, Suiza). Las concentraciones de ácido graso de cadena corta fecal que comprenden acetato, butirato y propionato se analizaron como se describió anteriormente (Wolever y col. 2000. BrJ Nutr; 84 (1): 57-61).

55 Análisis de respuesta de microbiota intestinal y mucosa del anfitrión

[0043] Se obtuvo una muestra de heces de la mañana recogida al inicio del estudio y después de 6 semanas, respectivamente, del donante y de los sujetos del estudio para determinar la composición de la microbiota. Las muestras se recogieron en dos recipientes de plástico, se congelaron inmediatamente a -20 °C y se transfirieron a -80 °C en una semana. La composición de microbiota de las biopsias del intestino delgado y las muestras fecales se determinó utilizando el chip del tracto intestinal humano (HITChip), un microarray de Agilent hecho a medida (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.) Que contiene aproximadamente 5.500 pruebas oligonucleótidas que cubren más de 1.000 filotipos intestinales (Rajilic —Stojanovic y col. 2009, *vide supra*). La cuantificación del total de bacterias y metanógenos se realizó mediante la PCR cuantitativa del gen ARNr 16S con el mismo ADN utilizado para el análisis HITChip. Los datos en bruto del transcriptoma de la biopsia del intestino delgado que utilizan las matrices

65

de expresión Human HT-12 v3 (Illumina, San Diego, EE. UU.) Se cargaron en Gene Expression Omnibus (número de registro: GSE30854). Los detalles de la microbiota intestinal y el análisis de la matriz se proporcionan en el Apéndice Suplementario.

5 Análisis estadísticos

[0044] Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS, versión 16. Los datos se expresan como medio \pm error estándar de media (distribución normal) o media (distribución sesgada). Para comparar los datos entre grupos, se usó la prueba t de Student (distribución normal) o la prueba de rango con signo de Wilcoxon (distribución sesgada). Todos los valores de P reportados son a dos caras. El análisis de expresión para las matrices HITChip y Illumina se llevó a cabo con métodos lineales mixtos y aleatorios random forest, así como un análisis de correlación canónica (CCA). Las pruebas estadísticas se realizaron con el software estadístico Microsoft Office Excel o R (<http://r-project.org/>).

15 Análisis estadístico de matriz HITChip y matriz de Illumina

[0045] El análisis de expresión para la matriz de HITChip e Illumina se llevó a cabo con el paquete NLME (Pinheiro y Bates. Modelos de efectos mixtos en S y S — plus. Saltador; 2000). Se construyó un modelo lineal mixto con efectos por tiempo (0 o 6 semanas), tratamiento (autólogo o alogénico) y un efecto cruzado de los dos efectos principales. Se tuvo en cuenta el diseño de medidas repetidas del experimento al incluir un efecto aleatorio específico del paciente. Para cada unidad de medida (gen o bacteria), los contrastes se calcularon utilizando el paquete multcomp, y los valores p obtenidos de este modo se corrigieron para múltiples comparaciones por paquete de valor q (Bretz. HTWP. Comparaciones múltiples usando R. CRC Press, Boca Raton, 2010; Storey JA enfoque directo a tasas de descubrimiento falso. Revista de la Royal Statistical Society Series B (metodología estadística) 2010; 64 (3): 479-498). La estabilidad temporal individual de la microbiota fecal en los pacientes de ambos grupos se determinó calculando una correlación de Pearson en el nivel de oligonucleótidos entre las muestras tomadas en el momento del trasplante y las obtenidas después de 6 semanas.

[0046] En muestras yeyunales, los grupos bacterianos asociados con la diferencia entre los grupos alogénicos y autólogos se determinaron con el método de Random Forest utilizando los cambios en la composición bacteriana antes y 6 semanas después del trasplante como covariables. Promedio de arranque (embolsado) (Breiman. Bagging predictors. Machine Learning 1996; 24 (2) combinado con el análisis de redundancia para obtener una estimación sólida de los grupos que contribuyen a la diferencia, para estimar el valor de P de la separación y para visualizar el resultado. La asociación entre la expresión génica y las muestras yeyunales se determinó mediante un análisis de correlación canónica escasa (CCA escasa). Para reducir el efecto del sobreajuste, el conjunto de genes a correlacionar consistía en los diez mejores genes expresados diferencialmente. Los datos de microbiota consistieron en datos de HITChip en seis taxones que contribuyeron significativamente a la diferencia entre las muestras autólogas y alogénicas en las muestras yeyunales. En el análisis de CCA, los parámetros de regularización se estimaron primero con la validación cruzada de dejar uno fuera. Luego se repitió el modelo con todos los datos, y para cada variable se calcularon las correlaciones a las variables canónicas.

Resultados

Características iniciales

[0047] Se examinaron un total de 44 sujetos obesos masculinos para detectar las características del síndrome metabólico y se incluyeron 20 sujetos elegibles. Dos sujetos se excluyeron de los análisis debido al uso de antibióticos durante el ensayo no relacionado con el trasplante microbiano. Por lo tanto, dieciocho sujetos estaban disponibles para su análisis.

Efecto del trasplante fecal sobre la sensibilidad a la insulina, SCFA fecal y LBP

[0048] Se usaron siete donantes magros sanos, uno de los cuales proporcionó donaciones múltiples, para el trasplante alogénico de nueve sujetos obesos con síndrome metabólico. Se infundieron cantidades iguales de heces en los sujetos obesos de infusión fecal microbiana alógena o autóloga (190 \pm 33 y 187 \pm 47 gramos, ns). Además, el tiempo de procesamiento entre la producción de heces y la infusión no difirió (5.8 \pm 0.8 y 6.1 \pm 1.2 horas en los grupos alogénicos y autólogos, respectivamente). Ninguno de los sujetos obesos experimentó ningún evento adverso durante el ensayo o desarrolló. Síntomas del síndrome del intestino irritable según los criterios Roma III.

[0049] El peso corporal se mantuvo estable en ambos grupos entre el inicio y las 6 semanas (alogénico: de 122,7 \pm 19 a 122,5 \pm 19 kg versus autólogo: 113,2 \pm 20 a 113,4 \pm 20 kg, ns). No se observaron efectos en la ingesta diaria de calorías, el gasto energético en reposo ni la oxidación de carbohidratos/ácidos grasos en ambos grupos después de la infusión fecal microbiana (datos no mostrados). Hubo una mejoría notable en la sensibilidad a la insulina periférica seis semanas después del tratamiento con heces alogénicas (Rd mediana: de 26,2 a 45,3 μ mol/kg.min, p < 0,05), mientras que no se observó ningún cambio significativo en el grupo de tratamiento autólogo (Rd mediana: de

21,0 a 19,5/ $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{min}$, ns). Se observó una tendencia a la mejora de la sensibilidad a la insulina hepática, expresada como supresión de EGP basal (supresión de EGP mediana: de 51,5 a 61,6 %, $p = 0.08$), mientras que no se observó efecto en el grupo de tratamiento autólogo (supresión de EGP mediana: de 53.8 a 52,4 %, ns). No hubo cambios en las hormonas glucorreguladoras en el estado basal o durante la hiperinsulinemia (datos en archivo) en ninguno de los dos grupos.

[0050] Los donantes magros se caracterizaron por un aumento en la cosecha fecal de butirato y propionato en comparación con los participantes obesos, un rasgo que también se observó en la infusión fecal microbiana alogénica. Además, encontramos una disminución significativa de la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP) seis semanas después del trasplante de donante magro (mediana de LBP: de 19,9 a 18,6 $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{min}$ ($p < 0,05$ y CRP mediana de 1,5 a 1,6 mg/L, ns) sin cambios significativos en el grupo autólogo (LBP mediana: de 23,0 a 22,3 $\mu\text{mol/kg}\cdot\text{min}$ y CRP mediana de 3,1 a 2,5 mg/L, ns).

Efecto del trasplante fecal sobre microbiota intestinal en heces

[0051] La microbiota fecal de los sujetos obesos se caracterizó por una menor diversidad microbiana intestinal, mayores cantidades de bacteroidetes y menores cantidades de bacterias Clostridium cluster XIVa en comparación con sujetos magros donantes (datos no mostrados). Para determinar el impacto del trasplante microbiano, comparamos la microbiota fecal al inicio del estudio y después de 6 semanas. El número total de bacterias fecales no cambió después de la infusión fecal microbiana. A las 6 semanas, el análisis en el nivel de mismo género mostró una clara separación de las muestras pertenecientes a grupos alogénicos y autólogos. Un total de once grupos de bacterias bacterianas aumentaron significativamente (1,5-2,5 veces) en la infusión fecal microbiana alogénica y contribuyó significativamente a la separación de los grupos. Estos incluyen aquellos relacionados con el bien conocido butirato, el productor de Roseburia intestinalis, el oxalato, que convierte a Oxalobacter formigenes, varios Ruminococos y otros Firmicutes.

Efecto del trasplante fecal sobre la microbiota intestinal en el intestino delgado

[0052] Los números totales de bacterias del intestino delgado no cambiaron después de la infusión fecal microbiana. Se detectó un conjunto de siete bacterias significativamente asociadas con la diferencia en las biopsias del intestino delgado entre los grupos alogénicos y autólogos a las seis semanas (Tabla 1). En análisis adicionales, se encontró una asociación significativa ($r = 0,8$, $p < 0,01$) entre las concentraciones de *Eubacterium hallii* del intestino delgado y la mejora en la sensibilidad a la insulina (Rd) en sujetos humanos con síndrome metabólico 6 semanas después del trasplante fecal de donante magro. Además, se encontró una correlación significativa ($r = 0,6$, $p < 0,05$) entre las concentraciones de *Alcaligenes faecalis* del intestino delgado y la mejora en la sensibilidad a la insulina (Rd) en sujetos humanos con síndrome metabólico 6 semanas después del trasplante fecal de donante magro. En particular, *E. hallii* fue casi dos veces menor después de la infusión en el grupo autólogo. Otras bacterias que se incrementaron específicamente en el grupo autólogo en comparación con el grupo alogénico incluyen habitantes del ileon, como *Lachnobacillus bovis*, *Streptococcus bovis* y *Prevotella ruminicola*. *Corynebacterium* spp. se redujeron en el alogénico pero aumentaron en el grupo autólogo. Finalmente, las bacterias relacionadas con la *Escherichia coli* Gram-negativa produjeron una disminución de casi 2 veces en el grupo alogénico y un aumento de 2 veces en el grupo autólogo (Tabla 1).

Tabla 1. Cambio en la microbiota de la mucosa yeyunal después de un trasplante fecal alogénico (n = 9 por grupo).

Nivel de philo	Grupo bacteriano	Grupo alogénico Cambio de plegado después/antes del trasplante	Grupo autólogo Cambio de plegado después/antes del trasplante
Firmicutes	<i>Eubacterium hallii et rel.</i>	1,09	0,61
Proteobacteria	<i>Alcaligenes faecalis et rel.</i>	1,18	0,97
Firmicutes	<i>Streptococcus bovis et rel.</i>	0,89	1,23
Firmicutes	<i>Lachnobacillus bovis et rel.</i>	0,63	0,98
Actinobacteria	<i>Corynebacterium spp.</i>	0,87	1,34
Proteobacteria	<i>Escherichia coli et rel.</i>	0,58	2,21
Bacteroidetes	<i>Prevotella ruminicola et rel.</i>	0,99	1,01

Ejemplo 2

[0053] *Eubacterium hallii* L2-7 como se describe por Barcenilla y col. (2000, Appl. Environ. Microbiol, abril; 66 (4): 1654-61; DSM 17630; obtenido del laboratorio del Prof. Harry Flint, Rowett Research Institute, Aberdeen, Escocia,

Reino Unido, se cultivó en 2 botellas de cada 500 ml de medio Wilkins-Chalgren (1976, Antimicrob. Agents Chemother. 10. 926-928) en condiciones anaeróbicas hasta aproximadamente 2×10^9 de células por ml. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron (10.000 rpm en 15 minutos a 4 °C), se lavaron dos veces con PBS anaeróbico (20 mM, pH 7, como se detalla en http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline) y se resuspendieron en 20 ml de glicerol al 10 % en PBS 20 mM con glucosa 20 mM y maltodextrina 20 mM y se congelan a -80 °C en alícuotas de 100 µl que contienen aproximadamente 1011 células por ml. Todas las manipulaciones se realizaron bajo condiciones anaeróbicas.

Ejemplo 3

10 **[0054]** Se adquirieron ratones machos db/db de ocho semanas de edad sobre un fondo C57BL6 así como ratones C57BL6 machos del Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EE. UU.) y se les permitió aclimatarse en la instalación de animales AMC (ARIA) durante 2 semanas antes de comenzar los experimentos. Los ratones se encontraban en un ciclo constante de luz-oscuridad de 12 horas con temperatura y humedad controladas y se les dio acceso a alimentos (dieta normal) y agua a voluntad. El peso corporal se midió una vez a la semana. Comenzando a la edad de 10 semanas, se administró por vía oral *E. hallii* a 10^6 , 10^8 o 10^{10} UFC en 100 µl de vehículo con alto contenido de glucosa (20 mM). La solución se administró por sonda oral diaria por la mañana con una jeringa de calibre 21 durante 14 días (n = 8 por grupo). La administración de un solo vehículo sirvió como control. El *E. hallii* cultivado se administró por vía oral a ratones db/db (n = 8 por grupo) durante 2 semanas en dosis crecientes (10 xE10/100 µl 10X E8/100 µl y 10 x E6/100 µl o dissolvens (solución salina + glicerol), respectivamente). Su efecto en los perfiles lipídicos (medición del colesterol total, LDLc, HDLc y TG en muestras de plasma en ayunas como se describe en el Ejemplo 1), glucosa en plasma en ayunas y niveles de insulina para la resistencia a la insulina (HOMA), así como la glucosa posprandial (prueba de tolerancia a la glucosa oral) se determinan como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. Los niveles de acetato de ácidos grasos de cadena corta, butirato y propionato se determinan en sangre periférica y portal mediante Espectrometría de masas (ver Vrieze y col., Gastroenterology 2012, 20 de junio, Epub antes de la impresión). Además, después de sacrificar a los ratones, se estudian las muestras de intestino delgado y fecal para determinar las concentraciones de *E. hallii*.

30 **[0055]** En este experimento, encontramos distintos efectos de la suplementación oral a corto plazo de *E. hallii* L2-7 en el intestino delgado en la normalización de la resistencia a la insulina (según lo detectado por el cálculo de HOMA y el metabolismo posprandial de la glucosa por el AUC de la curva de tolerancia a la glucosa oral) así como perfiles lipídicos en ayunas en ratones db/db.

REIVINDICACIONES

1. *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, y/o *Alcaligenes faecalis* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Alcaligenes faecalis*, para uso en la prevención y o el tratamiento de la resistencia a la insulina y/o las complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina seleccionadas de síndrome metabólico, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas, tales como en sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndromes de lipodistrofia.
- 10 2. *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, y/o *Alcaligenes faecalis* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Alcaligenes faecalis*, para uso según la reivindicación 1, en los que *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, y/o *Alcaligenes faecalis* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Alcaligenes faecalis*, está comprendido en un alimento o pienso o una composición farmacológica.
- 20 3. *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, y/o *Alcaligenes faecalis* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Alcaligenes faecalis*, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en los que dichos *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii* son bacterias de *Eubacterium hallii* cepa L2-7 (DSM 17630).
- 25 4. Composición farmacéutica, alimentaria o de piensos que comprende *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, y/o *Alcaligenes faecalis* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Alcaligenes faecalis* para uso en la prevención y/o tratamiento de la resistencia a la insulina y/o las complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina, en la que las complicaciones relacionadas con la resistencia a la insulina se seleccionan de síndrome metabólico, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina en enfermedades endocrinas, tales como en sujetos obesos con diabetes mellitus tipo 1, enfermedad de Cushing y síndrome de lipodistrofia.
- 30 5. Composición para uso según la reivindicación 4, en la que dicha composición que comprende *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*,
- 35 6. Composición para uso según la reivindicación 5, en la que dichos *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii*, son bacterias del *Eubacterium hallii* cepa L2-7 (DSM 17630)
- 40 7. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, siendo dicha composición un alimento o una composición alimenticia o un complemento alimenticio.
- 45 8. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que es una bebida.
9. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que es un producto lácteo fermentado.
- 50 10. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que es una composición farmacéutica.
11. Composición para uso según la reivindicación 10, que está en forma de dosificación sólida.
- 55 12. Composición para uso según la reivindicación 11, cuya forma de dosificación sólida es una cápsula, una pastilla o un polvo.
- 60 13. Composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que los *Eubacterium hallii* o parientes que tienen al menos un 98 % de identidad de secuencia con la secuencia de ARNr 16S de *Eubacterium hallii* están liofilizados.
14. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 13, que comprende entre aproximadamente 10^6 y aproximadamente 10^{12} bacterias.