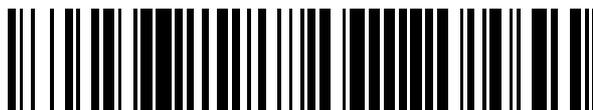


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 427**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/747** (2015.01)

**A61P 19/08** (2006.01)

**A23L 33/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013 PCT/SE2013/050646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13184064**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013 E 13800449 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2854826**

54 Título: **Lactobacillus reuteri ATCC PTA 6475 para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea en mamíferos**

30 Prioridad:

**04.06.2012 US 201261689338 P**

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

**03.05.2019**

73 Titular/es:

**BIOGAIA AB (50.0%)  
Box 3242  
103 64 Stockholm, SE y  
MICHIGAN STATE UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CONNOLLY, EAMONN;  
BRITTON, ROBERT ALLEN y  
MCCABE, LAURA RAE**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 2 711 427 T3

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

## DESCRIPCIÓN

*Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea en mamíferos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere, en general, a complementos para alimentos, medicina y farmacología. Más específicamente la invención se refiere a bacterias del ácido láctico para su uso en la prevención de la pérdida ósea en mamíferos.

10

**Antecedentes de la invención**

Más de 40 millones de norteamericanos con más de 50 años de edad (14 millones de los cuales son hombres) están aquejados de baja densidad ósea u osteoporosis y su riesgo aumentado asociado de fracturas. Los individuos con fracturas osteoporóticas son propensos a padecer depresión, dependencia y mortalidad aumentada. Aunque el envejecimiento es una causa principal de osteoporosis, la enfermedad, la inactividad, y determinados fármacos también pueden provocar pérdida ósea en cualquier etapa de la vida.

15

El esqueleto es un sistema altamente organizado que soporta el peso corporal, aloja células madre hematopoyéticas y mesenquimatosas, y sirve como depósito de calcio. La estructura del hueso comprende una cubierta externa densa cortical y una malla interna de hueso trabecular. El ejercicio puede aumentar la densidad mineral ósea (DMO) trabecular y la fracción de volumen óseo (FVO), el grosor trabecular, y DMO y grosor cortical. En cambio, la enfermedad, la inactividad y determinados fármacos (tales como glucocorticoides) pueden disminuir estos parámetros y provocar osteoporosis tanto en hombres como en mujeres. La osteoporosis está definida por una reducción en la masa ósea (más de 2,5 desviaciones estándar (D.E.) por debajo del promedio) y microarquitectura ósea alterada (tal como grosor trabecular disminuido). Con la disminución de la masa ósea, existe un riesgo aumentado de fracturas óseas. Por tanto, en el punto de ser diagnosticado como osteoporótico, un paciente tiene un aumento de 16 veces del riesgo de fractura en comparación con una persona con densidad ósea normal. Las fracturas se asocian con depresión, dependencia y mortalidad aumentada (mayor del 25% en el plazo de 12 meses para los ancianos) y las fracturas de cadera representan más de 50.000 fallecimientos cada año (estadística de la Fundación Nacional de Osteoporosis (NOF)). Aunque la osteoporosis es menos prevalente en hombres, más del 30% de las fracturas de cadera se producen en hombres y las tasas de mortalidad son mayores para hombres en comparación con mujeres. Actualmente, se gastan más de 20 mil millones de dólares en los EE.UU. y 30 mil millones de dólares en la Unión Europea para cubrir los costes directos de la osteoporosis. De manera aún más preocupante, se estima que para 2020 más de 61 millones de hombres y mujeres en los EE.UU., con más de 50 años de edad, tendrán baja densidad ósea u osteoporosis (estadística de la NOF) y, por tanto, hallar tratamientos novedosos eficaces es una prioridad. De hecho, una de cada tres mujeres con más de 50 años de edad experimentará una fractura relacionada con osteoporosis a lo largo de su vida. Junto con su aumento asociado del riesgo de fractura, la pérdida ósea puede tener efectos negativos sobre el metabolismo y la secreción de insulina. A pesar de todos los tratamientos disponibles en el mercado, el número de pacientes osteoporóticos está en aumento en los EE.UU. y a nivel mundial. Existen varios motivos para esto, incluyendo una falta de concienciación de que se está en riesgo en etapas tempranas de la vida, una población de edad cada vez más avanzada y el incumplimiento por parte del paciente debido a efectos secundarios no deseados de la medicación. Además, los tratamientos convencionales contra la pérdida ósea no son siempre eficaces. Actualmente no hay tratamientos alternativos o naturales que puedan usarse en lugar de los medicamentos para la osteoporosis para personas con baja densidad ósea u osteoporosis. Por tanto, los médicos están buscando nuevos enfoques para aumentar la densidad ósea en sus pacientes y las empresas trabajan para mejorar los fármacos para tratamientos óseos farmacológicos.

20

25

30

35

40

45

50

Es más probable que determinadas personas desarrollen osteoporosis que otras, algunos factores de riesgo son;

\*Ser mujer

\*Edad avanzada

55 \*Antecedentes familiares de osteoporosis o de huesos rotos

\*Ser pequeño y delgado

60 \*Determinadas razas/etnias tales como de raza blanca, asiáticos o hispanos/latinos aunque los afroamericanos también están en riesgo

\*Antecedentes de huesos rotos

\*Bajos niveles de hormonas sexuales

65

\*Bajos niveles de estrógenos en mujeres, incluyendo menopausia

- \*Falta del periodo (amenorrea)
- \*Bajos niveles de testosterona y estrógenos en hombres
- 5 \*Dieta
  - Baja ingesta de calcio
  - 10 - Baja ingesta de vitamina D
  - Ingesta excesiva de proteínas, sodio y cafeína
- \*Estilo de vida sedentario
- 15 \*Fumar
- \*Alcoholismo
- 20 \*Determinadas medicaciones tales como medicaciones esteroideas, algunos anticonvulsivos y otros
- \*Determinadas enfermedades y estados tales como anorexia nerviosa, artritis reumatoide, enfermedades gastrointestinales y otros
- 25 Las mujeres menopáusicas son propensas a perder hueso durante la época de la menopausia debido a niveles disminuidos de estrógenos. Incluso durante la perimenopausia (el periodo de 2 a 8 años antes de la menopausia) los niveles de estrógenos pueden empezar a reducirse. A lo largo del tiempo, demasiada pérdida ósea puede provocar en primer lugar osteopenia (baja masa ósea) y luego osteoporosis.
- 30 El diagnóstico de diabetes tipo 1 (DT1) está aumentando en niños y adultos. Aunque los avances médicos están ampliando la esperanza de vida de los pacientes, sigue siendo difícil mantener la normoglucemia, incluso con vigilancia terapéutica. Por tanto, más pacientes con DT1 (hombres y mujeres) están presentando complicaciones, incluyendo pérdida ósea. Esto significa que los pacientes empiezan a envejecer/la menopausia con un riesgo de fracturas ya aumentado. Una vez que se producen las fracturas, pueden ser difíciles de consolidar, requerir hospitalizaciones prolongadas, reducir la calidad de vida y aumentar la mortalidad. Una mala salud ósea también afecta negativamente a todo el cuerpo. Las mujeres posmenopáusicas con diabetes DT1 tienen mayores incidencias de fracturas osteoporóticas que las mujeres sin diabetes. Los niños con DT1 tienen menor densidad mineral ósea que los niños sin diabetes. Por tanto, el mantenimiento de unos huesos sanos es crítico para la calidad de vida global de pacientes con DT1 e importante para maximizar tratamientos terapéuticos/curativos que implican células progenitoras/inmunitarias de la médula puesto que las células de la médula y las células óseas están en comunicación.
- 35
- 40 Los pacientes con diabetes tipo 2 (DT2) también corren un mayor riesgo de fracturas osteoporóticas que las personas que no son diabéticas.
- 45
- Los dos componentes clave para reforzar los huesos y prevenir la osteoporosis son 1) obtener una máxima densidad ósea y 2) prevenir la pérdida ósea durante la vida adulta y la vejez. Se produce remodelación ósea porque el hueso es un elemento dinámico y se adapta constantemente a señales ambientales para formar o resorber hueso. La remodelación ósea dirigida a través de las actividades de los osteoblastos (células de formación ósea) y los osteoclastos (células de resorción ósea) mantiene los niveles de calcio en sangre dentro de un intervalo crítico mientras mantiene la resistencia del hueso en sitios en los que es necesario soporte. Cuando están en equilibrio las actividades de formación y resorción, no existe ganancia o pérdida neta de hueso, sin embargo cuando la formación está disminuida y/o la resorción está aumentada, entonces resulta una pérdida ósea.
- 50
- 55 La actividad osteoclástica aumentada da como resultado resorción ósea. Los osteoclastos se derivan de células madre hematopoyéticas. Estas células dan lugar a células del linaje de los monocitos/macrófagos que, en las condiciones adecuadas, se desarrollan para dar precursores osteoclásticos. La señalización adicional a través de factores tales como RANKL (ubicado en las superficies de osteoblastos) estimula la maduración de osteoclastos. Los osteoclastos maduros expresan enzimas implicadas en la degradación de la matriz ósea (incluyendo catepsina K y TRAP5b).
- 60
- La actividad osteoblástica aumentada da como resultado formación ósea, que puede regularse en varios niveles incluyendo 1) selección de linaje, 2) maduración y 3) muerte. Dado que las células del estroma de médula ósea (BMSC) dan lugar a osteoblastos, adipocitos y otros tipos celulares, la selección de un linaje (adipocito) podría ser a costa de otro (osteoblasto). Esto está respaldado por la relación recíproca entre adiposidad ósea y densidad mineral reconocida con el envejecimiento, descarga de extremidades, modelos de cultivo celular y diabetes tipo 1 (T1). La
- 65

actividad osteoblástica puede estar regulada además a través de muerte/apoptosis. Un aumento de la muerte de osteoblastos dará como resultado menos células productoras de hueso y, por tanto, pérdida ósea. Los ejemplos incluyen la rápida adaptación del hueso a inactividad/descarga, lo que da como resultado pérdida ósea, adiposidad medular aumentada y muerte aumentada de células óseas. El envejecimiento también aumenta la apoptosis de células óseas. Muchos factores contribuyen a la modulación de algunos o todos los aspectos de la regulación de osteoblastos (linaje, maduración, muerte) incluyendo: factores positivos tales como TGF $\beta$ , proteínas morfogenéticas óseas (BMP), hormona paratiroidea (PTH), y Wnt y factores negativos tales como citocinas.

Los bisfosfonatos son uno de los tratamientos más habituales para la osteoporosis. Estos compuestos incorporan en el hueso mineral e inhiben el catabolismo óseo por parte de los osteoclastos y son eficaces en la reducción de fracturas. Sin embargo, es necesario tomar muchos de estos compuestos con el estómago vacío y pueden provocar reflujo gástrico y náuseas, lo que da como resultado un cumplimiento reducido por parte del paciente. También existe una preocupación sobre la duración de tiempo en que estos compuestos residen en el hueso y su impacto a largo plazo sobre la resistencia y la remodelación ósea. Los modificadores selectivos de receptores de estrógenos (SERM) son otro tratamiento terapéutico, pero todavía despiertan algunas preocupaciones con respecto al cáncer. La terapia de sustitución hormonal se ha estudiado como que es útil en la prevención o ralentización de la aparición de osteoporosis, pero el uso sostenido de sustitución hormonal durante muchos años puede aumentar el riesgo que corren las mujeres de padecer cáncer de mama, puede aumentar la incidencia de trombosis venosa (coágulos de sangre), empeoramiento de enfermedades hepáticas preexistentes y un riesgo aumentado de padecer cáncer de endometrio así como hipertensión. Amgen tiene un fármaco en desarrollo (que es similar a osteoprotegrina) que actúa modificando el sistema RANKL/RANK y así suprime la actividad osteoclástica. El tratamiento intermitente con PTH es un tratamiento anabólico, pero este tratamiento intravenoso es caro y solamente está indicado para pacientes osteoporóticos graves. Tomado conjuntamente, no es sorprendente que muchas personas a las que se les diagnostica baja densidad ósea estén confundidas acerca de qué hacer. Muchas personas no quieren tomar medicación por miedo a efectos a largo plazo. Aunque el ejercicio de levantamiento de peso y una ingesta adecuada de calcio son dos enfoques naturales, no siempre pueden superar los efectos de la enfermedad, los medicamentos y el envejecimiento.

### Sumario de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

Un objeto principal de la presente invención es proporcionar una cepa de bacterias del ácido láctico que pueda prevenir la pérdida ósea, especialmente en mujeres menopáusicas, en diabéticos, en pacientes osteopénicos que incluyen por ejemplo hombres jóvenes con una gran ingesta calórica y baja frecuencia de realizar ejercicio.

Un objeto de la presente invención es usar productos que contienen tales cepas en mujeres menopáusicas para prevenir la pérdida ósea.

Un objeto de la presente invención es usar productos que contienen tales cepas en mujeres que se han sometido a una histerectomía para prevenir la pérdida ósea.

Otro objeto es usar productos que contienen tales cepas en hombres, incluyendo pero sin limitarse a hombres jóvenes, diabéticos con alteración metabólica y hombres osteopénicos, para prevenir la pérdida ósea.

Otro objeto es usar tal producto en combinación con terapias para la pérdida ósea o formación ósea para reducir la dosis de tales fármacos para poder minimizar los efectos secundarios.

Otro objeto es mejorar la reparación ósea tras una fractura.

En el presente documento se describe un método para seleccionar una cepa de bacterias del ácido láctico para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea, que comprende seleccionar una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 95% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), y que alberga un nucleótido idéntico en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) en al menos una de las siguientes cuatro posiciones: C en el par de bases 271 391, G en el par de bases 453 538, G en el par de bases 529 228, y C en el par de bases 599 338.

El método puede comprender seleccionar una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 96%, tal como el 97%, tal como el 98%, tal como el 99% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), y que alberga un nucleótido idéntico en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) en al menos una de las siguientes cuatro posiciones: C en el par de bases 271 391, G en el par de bases 453 538, G en el par de bases 529 228, y C en el par de bases 599 338.

En el presente documento se describe además un método para seleccionar una cepa de bacterias del ácido láctico, tal como una cepa de *Lactobacillus reuteri*, para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea, que comprende seleccionar una *Lactobacillus reuteri* que alberga un nucleótido idéntico en relación con el genoma de *L*

*reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) en al menos una de las siguientes cuatro posiciones: C en el par de bases 271 391, G en el par de bases 453 538, G en el par de bases 529 228, y C en el par de bases 599 338.

5 En uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente, la cepa de bacterias del ácido láctico alberga al menos dos de dichos cuatro nucleótidos, tal como al menos tres de dichos cuatro nucleótidos, tal como los cuatro de dichos nucleótidos.

10 Además, en el presente documento se describe un método para seleccionar una cepa de bacterias del ácido láctico para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea, que comprende seleccionar una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 95% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), siempre que la cepa de bacterias del ácido láctico no albergue al menos una mutación en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), seleccionada del grupo de cuatro mutaciones que consisten en C a T en el par de bases 271 391, G a A en el par de bases 453 538, G a A en el par de bases 529 228, y C a T en el par de bases 599 338.

15 Dicho método puede comprender seleccionar una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 96%, tal como el 97%, tal como el 98%, tal como el 99% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), siempre que la cepa de bacterias del ácido láctico no albergue al menos una mutación en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), seleccionada del grupo de cuatro mutaciones que consisten en C a T en el par de bases 271 391, G a A en el par de bases 453 538, G a A en el par de bases 529 228, y C a T en el par de bases 599 338.

20 La cepa de bacterias del ácido láctico puede albergar o no al menos dos de dichas cuatro mutaciones, tal como al menos tres de dichas cuatro mutaciones, tal como una cualquiera de dichas cuatro mutaciones.

25 La invención proporciona una cepa de bacterias del ácido láctico para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea. La cepa de bacterias del ácido láctico es *L reuteri* ATCC PTA 6475, para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea. Esta cepa está disponible para el público en la Colección Americana de Cultivos Tipo (10801 Univ. Blvd., Manassas, Va.), que se ha depositado allí según el Tratado de Budapest el 21 de dic. de 2004.

30 En el presente documento también se describe una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 95% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), y que alberga un nucleótido idéntico en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) en al menos una de las siguientes cuatro posiciones: C en el par de bases 271 391, G en el par de bases 453 538, G en el par de bases 529 228, y C en el par de bases 599 338, para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea.

35 La cepa de bacterias del ácido láctico puede tener una identidad de al menos el 96%, tal como el 97%, tal como el 98%, tal como el 99% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), y puede albergar un nucleótido idéntico en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) en al menos una de las siguientes cuatro posiciones: C en el par de bases 271 391, G en el par de bases 453 538, G en el par de bases 529 228, y C en el par de bases 599 338.

40 La cepa de bacterias del ácido láctico puede albergar al menos dos de dichos cuatro nucleótidos, tal como al menos tres de dichos cuatro nucleótidos, tal como los cuatro de dichos nucleótidos. En el presente documento se describe además una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 95% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), siempre que la cepa de bacterias del ácido láctico no albergue al menos una mutación en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), seleccionada del grupo de cuatro mutaciones que consisten en C a T en el par de bases 271 391, G a A en el par de bases 453 538, G a A en el par de bases 529 228, y C a T en el par de bases 599 338.

45 La cepa de bacterias del ácido láctico puede tener una identidad de al menos el 96%, tal como el 97%, tal como el 98%, tal como el 99% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), siempre que la cepa de bacterias del ácido láctico no albergue al menos una mutación en relación con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), seleccionada del grupo de cuatro mutaciones que consisten en C a T en el par de bases 271 391, G a A en el par de bases 453 538, G a A en el par de bases 529 228, y C a T en el par de bases 599 338.

50 La cepa de bacterias del ácido láctico puede albergar o no al menos dos de dichas cuatro mutaciones, tal como al menos tres de dichas cuatro mutaciones, tal como una cualquiera de dichas cuatro mutaciones.

55 Según la invención, la cepa de bacterias del ácido láctico es *L reuteri* ATCC PTA 6475.

La invención proporciona además una composición que comprende una cepa de bacterias del ácido láctico, que es *L reuteri* ATCC PTA 6475.

60 En el presente documento también se describe una composición que comprende una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 95% con el genoma de *L reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), y que

alberga un nucleótido idéntico en relación con el genoma de *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) en al menos una de las siguientes cuatro posiciones: C en el par de bases 271 391, G en el par de bases 453 538, G en el par de bases 529 228, y C en el par de bases 599 338.

5 La cepa de bacterias del ácido láctico puede tener una identidad de al menos el 96%, tal como el 97%, tal como el 98%, tal como el 99% con el genoma de *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), y alberga un nucleótido idéntico en relación con el genoma de *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1) en al menos una de las siguientes cuatro posiciones: C en el par de bases 271 391, G en el par de bases 453 538, G en el par de bases 529 228, y C en el par de bases 599 338.

10 La cepa de bacterias del ácido láctico puede albergar al menos dos de dichos cuatro nucleótidos, tal como al menos tres de dichos cuatro nucleótidos, tal como los cuatro de dichos nucleótidos.

15 En el presente documento también se describe una composición que comprende una cepa de bacterias del ácido láctico que tiene una identidad de al menos el 95% con el genoma de *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), siempre que la cepa de bacterias del ácido láctico no albergue al menos una mutación en relación con el genoma de *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), seleccionada del grupo de cuatro mutaciones que consisten en C a T en el par de bases 271 391, G a A en el par de bases 453 538, G a A en el par de bases 529 228, y C a T en el par de bases 599 338.

20 La cepa de bacterias del ácido láctico puede tener una identidad de al menos el 96%, tal como el 97%, tal como el 98%, tal como el 99% con el genoma de *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), siempre que la cepa de bacterias del ácido láctico no albergue al menos una mutación en relación con el genoma de *L. reuteri* JCM 1112 (SEQ ID NO: 1), seleccionada del grupo de cuatro mutaciones que consisten en C a T en el par de bases 271 391, G a A en el par de bases 453 538, G a A en el par de bases 529 228, y C a T en el par de bases 599 338.

25 La cepa de bacterias del ácido láctico puede albergar o no al menos dos de dichas cuatro mutaciones, tal como al menos tres de dichas cuatro mutaciones, tal como una cualquiera de dichas cuatro mutaciones.

30 Según la invención, la cepa de bacterias del ácido láctico para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea es *L. reuteri* ATCC PTA 6475.

Además según la invención, una composición que comprende *L. reuteri* ATCC PTA 6475 es para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea.

35 En una realización de la invención, la composición es para su uso en la prevención de la pérdida ósea en mujeres menopáusicas, mujeres que se han sometido a histerectomía, diabéticos, individuos osteopénicos, individuos osteoporóticos e individuos con alteración metabólica.

40 En aún otra realización de la invención, la composición es para su uso en la mejora de la reparación ósea después de una fractura.

En una realización de la invención, la composición descrita anteriormente en combinación con vitamina D es para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea.

45 En otra realización de la invención, la composición descrita anteriormente en combinación con una hormona (para su uso en terapia de sustitución hormonal) es para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea.

50 En una realización de la invención, la composición descrita anteriormente es una composición farmacéutica (que comprende opcionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable), o un producto alimenticio o un complemento alimenticio (que comprende opcionalmente al menos un excipiente de calidad alimentaria, tal como conoce un experto habitual en la técnica).

### Breve descripción de los dibujos

55 La figura 1 muestra la agrupación de comunidades microbianas en yeyuno e íleon.

La figura 2 muestra la supresión de la pérdida ósea por *L. reuteri* ATCC PTA 6475.

60 La figura 3 muestra el efecto sobre la pérdida ósea en diferentes cepas de *L. reuteri*.

### Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas de la misma

65 Las enfermedades inflamatorias crónicas se asocian frecuentemente con una pérdida ósea sistémica. En el resumen de la beca del NIH, número de beca 1R21AT005472-01A1, McCabe sugiere que las terapias que mejoran la salud intestinal global tienen el potencial de beneficiar la salud de los huesos. McCabe y Britton hallaron que el tratamiento con *L. reuteri* disminuía los niveles de TNF en el íleon y aumentaba el volumen óseo en ratones macho sanos pero

no en hembras y sugieren que *L reuteri* aumenta la densidad ósea de manera dependiente del sexo a través de la supresión de inflamación intestinal y regulación por incremento de la formación ósea. Sugieren que tienen un modo novedoso de aumentar la masa ósea mediante el uso de una bacteria probiótica que atenúa la inflamación intestinal. Esto es una regulación por incremento dependiente del sexo de la formación ósea, no la prevención de la pérdida ósea, asociada a las propiedades antiinflamatorias de *L reuteri*, a diferencia de la presente invención en la que se usan determinadas cepas seleccionadas específicamente para prevenir la pérdida ósea tanto en hombres como en mujeres.

Los probióticos pueden aumentar el grosor de hueso cortical de pollo y reducir la pérdida ósea en ratones de edad avanzada. Narva *et al.* describieron en “Effects of bioactive peptide, valyl-prolyl-proline (VPP), and lactobacillus helveticus fermented milk containing VPP on bone loss in ovariectomized rats” que leche fermentada con *L. helveticus* previene la pérdida ósea, y que el efecto podría deberse al péptido valil-prolil-prolina. Narva *et al.* describieron además en “The effect of Lactobacillus helveticus fermented milk on acute changes in calcium metabolism in postmenopausal women” que la fermentación de leche con *Lactobacillus helveticus* tuvo un efecto agudo positivo sobre el metabolismo del calcio.

Yeo *et al.* sugieren en “Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics” que un probiótico incorporado en leche de soja complementada con prebiótico podría usarse potencialmente como terapia dietética, por ejemplo, en osteoporosis.

Kim *et al.* mostraron en “Effects of a *Lactobacillus casei* 393 fermented milk product on bone metabolism in ovariectomised rats” que *L. casei* 393 FMP tenía un efecto preventivo sobre la pérdida ósea en ratas sometidas a ovariectomía.

Sin embargo ningún documento de la técnica anterior mencionado anteriormente ni solo ni en combinación enseña cómo pueden seleccionarse cepas probióticas específicas que sean eficaces para prevenir la pérdida ósea.

La presente invención en el presente documento comprende una cepa de bacterias del ácido láctico eficaces para prevenir la pérdida ósea en seres humanos. Pueden formularse productos tales como alimentos, formulaciones y aditivos nutricionales, productos farmacéuticos o dispositivos médicos que contienen células completas o componentes derivados de estas cepas, tal como se conoce en la técnica, y generalmente incluyen un soporte ingerible conocido más la cepa de bacterias del ácido láctico, o su componente derivado.

Basándose en la técnica anterior, resultaría natural pensar que la capacidad de una cepa de prevenir la pérdida ósea estaría asociada con su efecto general sobre la salud intestinal o sus propiedades antiinflamatorias, sin embargo los inventores han descubierto sorprendentemente que estas propiedades no son predictivas de la eficiencia en la prevención de la pérdida ósea. *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 y *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 4659 son dos cepas casi idénticas, que son ambas antiinflamatorias y mejoran la salud intestinal global. Resulta natural suponer que estas cepas tendrán por tanto el mismo efecto sobre la pérdida ósea también. Sin embargo, los inventores han mostrado que estas cepas no tienen el mismo impacto sobre la prevención de la pérdida ósea y, basándose en esta observación, han descrito un modo de seleccionar cepas de bacterias del ácido láctico, tales como por ejemplo *Lactobacillus reuteri* que serán eficaces para el tratamiento y/o la prevención de la pérdida ósea.

Las bacterias del ácido láctico seleccionadas específicamente mediante el método presentado en el presente documento pueden administrarse a seres humanos para prevenir la pérdida ósea.

*L reuteri* ATCC PTA 6475 y ATCC PTA 4659 difieren en cuatro SNP, que son importantes para la capacidad de las bacterias para prevenir la pérdida ósea. Estos SNP se muestran en Walter *et al.* (Walter *et al.* Host-microbial symbiosis in the vertebrate gastrointestinal tract and the *Lactobacillus reuteri* paradigm”; PNAS, vol. 108 págs. 4645-4652), que se incorpora en su totalidad por el presente documento como referencia. Para el análisis de SNP, se mapearon los resultados de secuenciación sobre un genoma de referencia (*L reuteri* JCM 1112, n.º de registro GenBank AP007281, SEQ ID NO: 1). Se hallaron siete SNP en *L reuteri* ATCC PTA 4659, y también se hallaron tres de ellos en *L reuteri* ATCC PTA 6475 (SNP 4 ubicado en pb 567 368, SNP 6 ubicado en pb 968 088, y SNP 8 ubicado en pb 1 358 460, haciendo referencia al genoma de referencia, *L reuteri* JCM 1112, n.º de registro GenBank AP007281, SEQ ID NO: 1). Los cuatro SNP únicos restantes (con el propósito del presente texto, denominado a continuación en el presente documento SNP 1, SNP 2, SNP 3 y SNP 5, respectivamente) constituyen las diferencias genómicas entre *L reuteri* ATCC PTA 6475 y *L reuteri* ATCC PTA 4659. Dichos cuatro SNP están ubicados en:

- pb 271 391 (SNP 1),

- pb 453 538 (SNP 2),

- pb 529 228 (SNP 3), y

- pb 599 338 (SNP 5),

(haciendo referencia al genoma de referencia, *L. reuteri* JCM 1112, n.º de registro GenBank AP007281; SEQ ID NO: 1).

5 SNP 1 está ubicado en un gen que codifica para una proteína hipotética conservada (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224225>), SNP 2 está ubicado en un gen que codifica para una proteína de canal de cloruro (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224386>), SNP 3 está ubicado en un gen que codifica para una subunidad gamma de ATP sintasa (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224455>) y SNP 5 está ubicado en un gen que codifica para una proteína de reparación de apareamiento erróneo de ADN, HexB (*L. reuteri* JCM 1112: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/183224511>). Los SNP implicados en esta invención son los que se aparean a *L. reuteri* ATCC PTA 6475, cuya secuencia tiene nucleótidos idénticos a *L. reuteri* JCM 1112 en las posiciones de SNP 1, SNP 2, SNP 3 y SNP 5). Se enumeran a continuación los nucleótidos que difieren entre las cepas *L. reuteri* ATCC PTA 6475 y 4659:

15 SNP 1) un gen que codifica para una proteína hipotética, en la que el nucleótido 267 se ha cambiado en ATCC PTA 4659 de una C (como en ATCC PTA 6475 y JCM 1112) a una T.

20 SNP 2) el gen que codifica para la proteína de canal de cloruro, en la que el nucleótido 373 se ha cambiado en ATCC PTA 4659 de una G (como en ATCC PTA 6475 y JCM 1112) a una A.

SNP 3) el gen que codifica para una subunidad gamma de ATP sintasa, en la que el nucleótido 296 se ha cambiado en ATCC PTA 4659 de una G (como en ATCC PTA 6475 y JCM 1112) a una A.

25 SNP 5) el gen que codifica para la proteína HexB, en la que el nucleótido 1966 se ha cambiado de una C (como en ATCC PTA 6475 y JCM 1112) a una T.

En el método de selección descrito en el presente documento, se buscan cepas que, en al menos uno de estos SNP, alberguen los mismos nucleótidos que *L. reuteri* ATCC PTA 6475 para los SNP mencionados anteriormente.

30 La microbiota desempeña un papel importante en la pérdida ósea; muchos pacientes que presentan pérdida ósea tienen una microbiota intestinal alterada. Las bacterias del ácido láctico que pueden restablecer la comunidad microbiana normal en el tracto GI son sorprendentemente más eficaces en la prevención de la pérdida ósea.

35 En el presente documento se describe un método de selección, que selecciona cepas eficaces para prevenir la pérdida ósea. La capacidad para restablecer la composición microbiana intestinal total también es sorprendentemente importante para la función en la prevención de la pérdida ósea. Los inventores han descubierto que las cepas que pueden restablecer una comunidad microbiana alterada a normal y/o que albergan al menos uno de los cuatro SNP específicos son eficaces para prevenir la pérdida ósea.

40 La capacidad para prevenir la pérdida ósea es única para determinadas cepas y no es en absoluto general para todas las bacterias del ácido láctico. Cuando se seleccionan cepas eficaces, no basta con usar la capacidad antiinflamatoria como criterio de selección puesto que los inventores muestran claramente que este efecto no depende de características antiinflamatorias. *L. reuteri* ATCC PTA 6475 y *L. reuteri* ATCC PTA 4659 son ambas cepas antiinflamatorias, pero *L. reuteri* ATCC PTA 6475 es mucho más eficaz cuando se usa para la prevención de la pérdida ósea, *L. reuteri* ATCC PTA 4659 no se selecciona según el método de selección descrito en el presente documento. Pueden usarse cepas de bacterias del ácido láctico específicas seleccionadas según el método descrito en el presente documento para prevenir la pérdida ósea en general y las realizaciones a continuación no pretenden limitar el alcance de esta invención, sino ejemplificar realizaciones preferidas.

50 La vitamina D es crucial para la salud de los huesos y las personas con bajos niveles de vitamina D tienen menor densidad ósea o masa ósea. Las personas que no obtienen suficiente vitamina D pueden perder hueso, puesto que se requiere vitamina D para absorber calcio. Los inventores han observado que una microbiota alterada conducirá a una deficiencia de vitamina D y pérdida ósea, y la administración de bacterias del ácido láctico seleccionadas según la presente invención restablecerá la microbiota y aumentará de ese modo la absorción intestinal de vitamina D y restaurará los niveles de vitamina D. También es una opción combinar vitamina D con las cepas seleccionadas para obtener un producto/método incluso más eficaz para prevenir la pérdida ósea.

60 Los pacientes con DT1 presentan complicaciones tales como pérdida ósea. Los pacientes que padecen DT1 tendrán, como resultado del estado, una microbiota alterada. La administración de bacterias del ácido láctico seleccionadas según el método descrito en el presente documento restablecerá la microbiota y prevendrá la pérdida ósea.

65 Una alta densidad ósea durante la juventud y la vida adulta puede ayudar a prevenir enfermedades como la osteoporosis en fases posteriores de la vida. Esto se debe al hecho de que una alta densidad ósea permitirá un mayor grado de pérdida ósea antes de alcanzar una densidad ósea dentro de la zona de osteoporosis. Por tanto, es un objeto de la presente invención prevenir la pérdida ósea administrando cepas de bacterias del ácido láctico,

seleccionadas según el método descrito en el presente documento, a personas jóvenes y adultas, esto ayudará a los individuos a obtener una máxima densidad ósea para prevenir que se produzca osteoporosis en fases posteriores de la vida. Las bacterias del ácido láctico específicas seleccionadas según el método descrito en el presente documento previenen la pérdida ósea en un receptor sano así como en aquellos que presentan pérdida ósea.

5 La administración de bacterias del ácido láctico seleccionadas puede combinarse con la terapia de sustitución hormonal. Tal combinación hará que sea posible reducir la cantidad de hormonas y reducir de ese modo los efectos secundarios, tal como reducir el riesgo de cáncer.

10 Las bacterias del ácido láctico seleccionadas para prevenir la pérdida ósea se administrarán preferiblemente a mujeres menopáusicas y hombres osteopénicos que son propensos a desarrollar osteoporosis, y la administración de bacterias del ácido láctico seleccionadas prevendrá la pérdida ósea y, por tanto, prevendrá la baja densidad ósea y la osteoporosis.

15 Los inventores han observado que la depleción de estrógenos altera la microbiota intestinal, el tratamiento con bacterias del ácido láctico seleccionadas según el método descrito en el presente documento restablecerá la microbiota en las personas que presentan niveles disminuidos de estrógenos, incluyendo pero sin limitarse a las mujeres menopáusicas y mujeres que se han sometido a histerectomía, previniendo por consiguiente la pérdida ósea.

20 También pueden usarse cepas de bacterias del ácido láctico seleccionadas según el método descrito en el presente documento para mejorar la reparación de fracturas.

25 Para reducir los efectos secundarios de fármacos, tales como por ejemplo bisfosfonatos y la terapia de sustitución hormonal usada para tratar la pérdida ósea, es posible combinar fármacos con la administración de bacterias del ácido láctico seleccionadas y reducir de ese modo la dosis, lo que minimizará los efectos secundarios.

#### EJEMPLO 1

30 *Estudio de la capacidad de L reuteri ATCC PTA 6475 para restablecer comunidades microbianas alteradas en ratones ovx.*

Hay cambios significativos en las comunidades microbianas intestinales de control (no ovx), ovx y ovx alimentadas con *L reuteri*.

35 Grupos experimentales y extracción de tejidos.

Para medir los efectos de la ovariectomía (ovx) y el tratamiento con *L reuteri* 6475 de ratones ovx, se compararon tres grupos experimentales de animales. Los ratones de control eran ratones no ovx que recibieron una alimentación por sonda de control de vehículo tres veces a la semana. Los ratones ovx recibieron una alimentación por sonda de control de vehículo tres veces a la semana. Ovx + *L reuteri* 6475 fueron ratones que recibieron 300 µl de *L reuteri* 6475 durante la noche tres veces a la semana durante cuatro semanas. Al final del experimento, se sacrificaron los ratones y se aislaron muestras de tejido del estómago, duodeno, yeyuno, íleon, partes proximal y distal del colon y se guardaron para análisis de ecología microbiana.

45 Extracción de ADN

Se puso tejido intestinal murino en tubos con perlas para ADN fecal Ultra Clean de MoBio (n.º de cat. 12811-100-DBT) que contenían 360 µl de tampón ATL (n.º de cat. Qiagen 19076) y se lisó en un aparato Mini-Beadbeater-8 (BioSpec Products) durante 1 minuto a máxima velocidad. Se extrajo el ADN del tejido intestinal murino usando el kit para sangre y tejido DNeasy de Qiagen (n.º de cat. 69504). Se rompió adicionalmente este tejido añadiendo 40 µl de proteinasa K (Qiagen, n.º de cat. 19133) e incubando a 55°C durante 1 hora. Se extrajo el ADN usando el kit para sangre y tejido DNeasy de Qiagen (n.º de cat. 69504). Se cuantificó el rendimiento de ADN usando un aparato Nanodrop 1000.

55 Amplificación por PCR

Se amplificaron secuencias de 16S bacterianas para la secuenciación 454 a partir de tejido intestinal murino usando el conjunto de cebadores con código de barras V3-V5 y el protocolo de amplificación desarrollado por el Instituto Broad para el Proyecto Microbioma Humano. Se sintetizaron cebadores directos con código de barras por IDT DNA Technologies y el cebador inverso lo sintetizó Sigma. Se diluyeron los cebadores directos con código de barras hasta una concentración de trabajo de 4 µM en placas de 96 pocillos; se añadió el cebador inverso a cada pocillo hasta una concentración final de 4 µM. Se prepararon reacciones por triplicado en un volumen de 25 µl que contenían 400 µg de ADN intestinal murino, 2 µl de cebadores 4 µM y 0,15 µl de Taq polimerasa Accuprime HiFi en tampón II de IX Accuprime (Invitrogen, n.º de cat. 12346086). Se amplificaron las reacciones en un ciclador térmico

de placa de aluminio Eppendorf Pro con una desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C x 20 s, 50°C x 30 s, 72°C x 5min.

#### Purificación de productos de amplificación

5 Se purificaron los productos de amplificación de 16S usando perlas Ampure Agencourt XP (Beckman Coulter, n.º de cat. A63880). En primer lugar, se combinaron reacciones por triplicado para cada muestra en tubos para microcentrífuga de 1,7 ml y se añadieron las perlas Ampure XP a una razón volumétrica de 0,7X. Después de agitar en vórtex, se incubaron las muestras mezcladas durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se pusieron sobre un soporte magnético para separar las perlas (Invitrogen, n.º de cat.123-21D). Se lavaron las perlas según el protocolo del fabricante con 2 lavados de 200 µl de etanol al 70%. Se secaron las perlas a 37°C durante 5 minutos, y se eluyó el ADN con 20 µl de tampón Tris 10 µM/EDTA 0,1 µM. Se separó el eluyente de las perlas sobre el soporte magnético, se transfirió a un nuevo tubo para microcentrífuga de 1,7 ml, y se cuantificó usando el kit de ensayo de alta sensibilidad de ADNbc Quant-It (Invitrogen, n.º de cat. Q33120). Entonces se reunieron cantidades iguales de cada muestra en un tubo para la secuenciación 454.

#### Secuenciación 454 y análisis de secuencias

20 Se realizó secuenciación 454 usando el sistema GS Junior (Roche) que usa la química del titanio. Además de los filtros convencionales utilizados por el sistema GS Jr. para identificar lecturas pasadas, se utilizó un algoritmo de procesamiento de amplicones modificado para reducir el número de secuencias descartadas de manera incorrecta. Se alinearon las secuencias de ARNr 16S por el personal del Proyecto de Base de Datos Ribosómica en el MSU con secuencias de 16S de *E. coli* y se recortaron en las posiciones de nucleótido 617 a 900 de 16S de *E. coli*. Se realizaron el procesamiento y análisis posteriores (incluyendo parámetros de diversidad) usando MOTHUR v.1.21 (<http://www.mothur.org/wiki/>). Se realizaron análisis de tipo ANOSIM (análisis de similitud) y de coordenadas principales usando el paquete de software PAST. La tabla y las figuras adjuntas utilizan el método de Bray-Curtis para medir el nivel de disimilitud entre dos o más comunidades microbianas. En estos análisis, se eligió un punto de corte de unidad taxonómica operativa (UTO) de 0,03, que se considera que es visualizar las comunidades a nivel de especie. A partir de estos datos se concluyó que en ese tratamiento de ratones sometidos a ovariectomía con *L reuteri* ATCC PTA 6475 provoca un desplazamiento significativo en las comunidades microbianas tanto en el yeyuno como en el íleon, lo que se correlaciona con una salud mejorada de los huesos. (ovx+lacto en la tabla 1).

Tejido	Comparación	Valor de R (valor de p)
Yeyuno	wt-ovx-ovxlacto	0,3367 (0,0183) *
	wt-ovx	0,0443 (0,3633)
	wt-ovxlacto	0,6078 (0,0250) *
	ovx-ovxlacto	0,3297 (0,0712)
Íleon	wt-ovx-ovxlacto	0,2068 (0,0084) *
	wt-ovx	0,1710 (0,1180)
	wt-ovxlacto	0,2540 (0,0290) *
	ovx-ovxlacto	0,2209 (0,0206) *

35 Tabla 1: Análisis de tipo ANOSIM a nivel de especie usando la matriz de disimilitud de Bray-Curtis, \*\* indica significación estadística.

40 Una comparación de tres vías del tipo natural, ovx, y ovx tratados con *L reuteri* mostró desplazamientos significativos en las comunidades microbianas (tabla 1). Estas diferencias están impulsadas en gran medida por desplazamientos sustanciales en las comunidades después del tratamiento con *L reuteri*. Se usó un análisis de coordenadas principales de comunidades microbianas del grupo de control de tipo natural (triángulo Δ), el grupo ovx (círculo ●) y el grupo ovx tratado con *L reuteri* (cuadrado ■) para visualizar cómo se agruparon las comunidades en el yeyuno y el íleon. La figura 1 muestra que ratones ovx tratados con *L reuteri* forman una agrupación de comunidades que es distinta de las comunidades de tipo natural y ovx tanto en el yeyuno como en el íleon. Varias UTO que se clasificaron como clostridiales son los principales grupos de bacterias que están impulsando la separación de las comunidades Ovx tratadas con *L reuteri* de los otros dos grupos.

EJEMPLO 2 (que no forma parte de la invención tal como se reivindica)

50 *Estudio de la capacidad de L reuteri ATCC PTA 4659 para restablecer comunidades microbianas alteradas en ratones ovx.*

Se realiza el experimento como en el ejemplo 1, pero se usa *L reuteri* ATCC PTA 4659 en vez de *L reuteri* ATCC PTA 6475.

55 El tratamiento con *L reuteri* ATCC PTA 4659 no puede restaurar las comunidades ovx hacia el control.

EJEMPLO 3 (que no forma parte de la invención tal como se reivindica)

*Identificación de determinados SNP*

5

Secuenciación con Illumina de genomas de *L reuteri*

Las cepas de *L reuteri* usadas en este estudio fueron ATCC PTA 4659 y 6475 hechas crecer en medios MRS (Difco) y se preparó ADN genómico usando el sistema Genomic-Tip de Qiagen. Se fragmentó el ADN mediante sonicación durante 20 min (130 W) para obtener un tamaño de fragmento promedio de 500 pb, luego se purificó adicionalmente y se concentró con columnas de centrifugación para purificación de PCR QIAquick (Qiagen). El tratamiento para retirar proyecciones en 3' y rellenar proyecciones en 5' dio como resultado fragmentos genómicos de extremos romos. Se añadió un residuo de adenina mediante una transferasa terminal al extremo 3', y se ligaron los fragmentos resultantes a adaptadores de Solexa. Se separaron los productos mediante electroforesis en gel de agarosa, y se cortó la banda entre 150 y 200 pb del gel. Se extrajeron los fragmentos de ADN del corte de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Se enriquecieron los fragmentos de ADN modificados con adaptador mediante una PCR de 18 ciclos usando los cebadores adaptadores universales de Solexa. Se cuantificó la biblioteca de fragmentos de ADN, y luego se diluyó hasta una disolución madre de trabajo 10 nM para la generación de agrupaciones. Se desnaturalizaron los fragmentos ligados a adaptador (2 nM) en NaOH 0,1 M durante 5 min, luego se diluyeron adicionalmente hasta una concentración final de 9 pM en 1 ml de tampón de hibridación enfriado previamente, y se introdujeron en la celda de flujo de Solexa usando la estación de agrupación. Tras amplificación isotérmica, se hizo que las agrupaciones fueran monocatenarias mediante desnaturalización con NaOH 0,1 M, dosificándose a través de la celda de flujo mediante la estación de agrupación de Solexa. Se añadió un cebador de secuenciación complementario a un adaptador de Solexa para cebar las cadenas individuales de cada agrupación. Una vez hibridado y habiéndose retirado el cebador en exceso mediante un lavado, la celda de flujo estaba lista para la secuenciación. Se programó el Genome Analyzer II de Solexa para proporcionar hasta 36 flujos secuenciales de nucleótidos bloqueados con 3'-OH, marcados de manera fluorescente y polimerasa hasta la superficie de la celda de flujo, produciendo por tanto una longitud de lectura de 36 pb fija. Después de cada etapa de incorporación de bases, se lavó la superficie de la celda de flujo para retirar los reactivos y luego se obtuvieron imágenes bajo del objetivo del microscopio. Los experimentos recopilaron 300 imágenes en mosaico ("mosaicos") por carril de celda de flujo, que contenían cada una en promedio 30.000 agrupaciones.

Análisis de SNP

Se mapearon los resultados de secuenciación en dos carriles sobre el genoma de referencia *L reuteri* JCM 1112T (n.º de registro GenBank AP007281) por separado. Se usó el software de mapeo Maq versión 0.6.6 (<http://maq.sourceforge.net/maq-man.shtml>) para realizar el mapeo (parámetros por defecto). Se identificaron los SNP y se validaron mediante el software MAQ, y se clasificaron en SNP codificantes y SNP intergenéticos. Se identificaron los SNP codificantes como sinónimos y no sinónimos. Finalmente, se verificaron los SNP mediante amplificación por PCR de la región circundante, seguido por determinación de secuencia de Sanger.

EJEMPLO 4 (que no forma parte de la invención tal como se reivindica)

*Método de selección de cepas*

45

La selección de cepas eficaces para la prevención de la pérdida ósea se basa en la capacidad para restaurar comunidades microbianas alteradas. Basándose en los resultados de los ejemplos 1 y 2, se selecciona *L reuteri* ATCC PTA 6475 basándose en el hecho de que esta cepa tiene la capacidad para restaurar comunidades microbianas alteradas. No se selecciona *L reuteri* ATCC PTA 4659 basándose en los resultados del ejemplo 2.

50

EJEMPLO 5 (que no forma parte de la invención tal como se reivindica)

*Método de selección de cepas*

La selección de cepas eficaces para la prevención de la pérdida ósea se basa en la presencia de determinados SNP. Como consecuencia de los resultados del ejemplo 3, se selecciona *L reuteri* ATCC PTA 6475, puesto que alberga los cuatro SNP buscados. Debido a la falta de estos SNP, no se selecciona *L reuteri* ATCC PTA 4659.

EJEMPLO 6 (que no forma parte de la invención tal como se reivindica)

60

*Método de selección de cepas*

La selección de cepas eficaces para la prevención de la pérdida ósea se basa en los ejemplos 3 y 4 y 5, se seleccionan cepas que albergan al menos uno de los cuatro SNP buscados así como la capacidad para restaurar comunidades microbianas alteradas. Basándose en estos criterios, se selecciona *L reuteri* ATCC PTA 6475.

65

EJEMPLO 7

*L reuteri* ATCC PTA 6475 suprime la pérdida ósea inducida por ovx

5 En este estudio, se usaron ratones BALB/c sometidos a ovariectomía (ovx) como modelo de ratón para la pérdida ósea. Se sometieron a ovariectomía ratones (de 12 semanas de edad) y se dividieron en dos grupos en los que el primer grupo se trató con *L reuteri* ATCC PTA 6475 tres veces a la semana durante cuatro semanas. Se usaron ratones BALB/c que no se habían sometido a ovariectomía como grupo de control. Se midieron la fracción de volumen óseo femoral distal (BV/TV) y ARN de TRAP5 de hueso (en relación con HPRT). Los ratones tratados con *L reuteri* ATCC PTA 6475 mostraron la misma fracción de volumen óseo que el grupo de control. Además, hubo que observarse que TRAP5 (un marcador de la función osteoclástica) vuelve al nivel inicial (grupo de control) tras el tratamiento con *L reuteri* ATCC PTA 6475.

10 La figura 2 muestra que la supresión de la pérdida ósea por *L reuteri* ATCC PTA 6475 es casi del 100% y que la expresión de TRAP5 vuelve al nivel inicial.

EJEMPLO 8

20 *La cepa L reuteri* ATCC PTA 6475 seleccionada es superior a la *L reuteri* ATCC PTA 4659 no seleccionada en la supresión de la pérdida ósea.

25 En este experimento, se alimentaron por sonda animales tres veces a la semana con las cepas *L reuteri* ATCC PTA 6475 y *L reuteri* ATCC PTA 4659 mientras se les proporcionaban también las cepas de manera continua en el agua para beber durante 28 días. Se midió la fracción de volumen óseo femoral distal (BV/TV) mediante  $\mu$ CT. *L reuteri* ATCC PTA 6475 suprimió la pérdida ósea y fue indistinguible de los ratones de control (figura 3). *L reuteri* ATCC PTA 4659 no suprimió la pérdida ósea hasta un nivel suficiente que alcanzase significación estadística ( $p < 0,01$ ). *L reuteri* ATCC PTA 4659 no es tan eficaz como la cepa *L reuteri* ATCC PTA 6475 seleccionada.

**REIVINDICACIONES**

1. *L reuteri* ATCC PTA 6475 para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea.
- 5 2. Composición que comprende *L reuteri* ATCC PTA 6475 para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea.
3. Composición para su uso según la reivindicación 2, para su uso en la prevención de la pérdida ósea en  
10 mujeres menopáusicas, mujeres que se han sometido a histerectomía, diabéticos, individuos osteopénicos, individuos osteoporóticos e individuos con alteración metabólica.
4. Composición para su uso según la reivindicación 2, para su uso en la mejora de la reparación ósea después de una fractura.
- 15 5. Composición para su uso según la reivindicación 2, en combinación con vitamina D o una hormona para su uso en la prevención o el tratamiento de la pérdida ósea.
- 20 6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, composición que es una composición farmacéutica, un producto alimenticio o un complemento alimenticio.

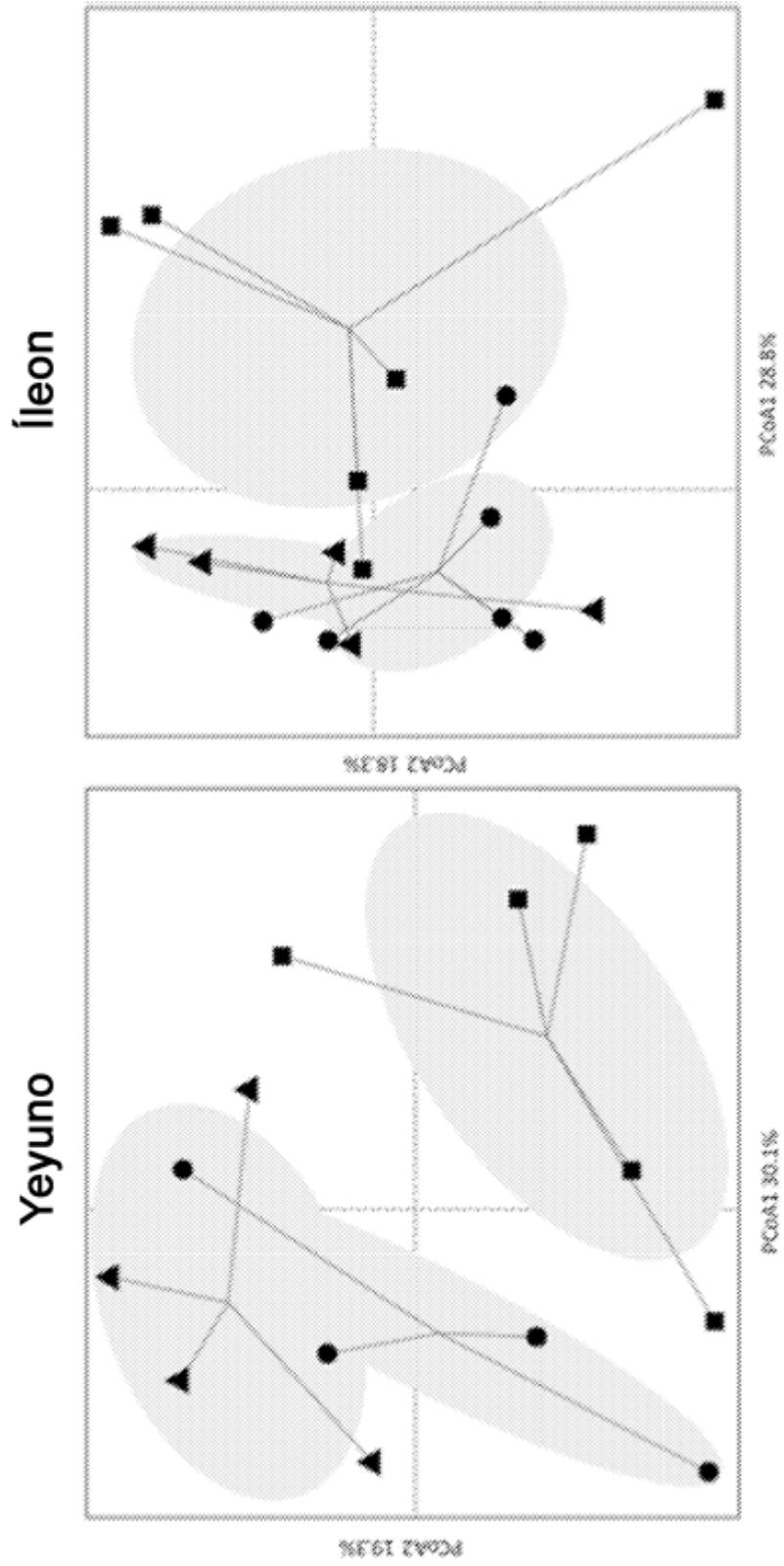


Figura 1

Figura 2

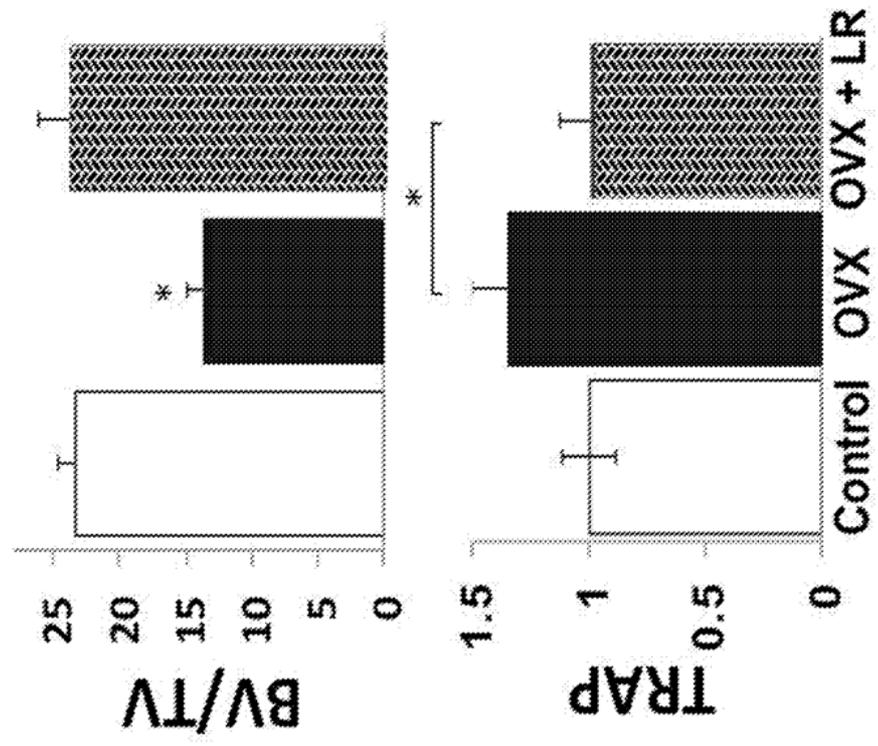


Figura 3

