

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 125**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/74** (2015.01)

**A61K 35/66** (2015.01)

**A61P 3/04** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

**A23L 33/135** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.12.2015 PCT/KR2015/013402**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16093599**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2015 E 15867191 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3231436**

54 Título: **Composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades metabólicas, que comprende *Bacteroides acidifaciens* como principio activo**

30 Prioridad:

**08.12.2014 KR 20140175349**

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

**17.11.2020**

73 Titular/es:

**GI BIOME (100.0%)  
A-1117, 167, Songpa-daero, Songpa-gu  
Seoul, KR**

72 Inventor/es:

**KWEON, MI NA y  
YANG, JIN YOUNG**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 794 125 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

Composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades metabólicas, que comprende *Bacteroides acidifaciens* como principio activo

5

**[Campo técnico]**

La presente divulgación se refiere a una composición para su uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas, incluyendo la composición *Bacteroides acidifaciens* como principio activo.

10

Además, la presente divulgación también se refiere a una composición para su uso en un método de oxidación de grasas o de inhibición de DPP-4, incluyendo la composición *Bacteroides acidifaciens* como principio activo.

**[Antecedentes de la técnica]**

15

Una enfermedad metabólica es un síndrome que aparece con factores de riesgo tales como obesidad, diabetes, hipertensión y arterioesclerosis provocados por una acumulación de nutrición excesiva en el organismo y falta de ejercicio. En los últimos años, se ha nombrado formalmente como síndrome metabólico o síndrome de resistencia a la insulina según el Adult Treatment Program Panel III establecido por la Organización Mundial de la Salud y el National Heart, Lung and Blood Institute de los National Institutes of Health. Además, de acuerdo con el ATP del USA National Cholesterol Education Program (NCEP) anunciado en 2001, se considera que hay una enfermedad metabólica en caso de que un paciente muestre al menos tres de los cinco factores de riesgo de obesidad abdominal con una circunferencia de la cintura de 102 cm (40 pulgadas) o más para hombres y 88 cm (35 pulgadas) o más para mujeres, triglicéridos de 150 mg/dl o más, colesterol asociado a HDL de 40 mg/dl o menos para hombres y 50 mg/dl o menos para mujeres, presión arterial de 130/85 mmHg o más y glucosa en ayunas de 110 mg/dl o más. En el caso de personas de ascendencia asiática, esto se ha ajustado en cierto modo y se considera obesidad abdominal cuando hay una circunferencia de la cintura de 90 cm o más para hombres y de 80 cm o más para mujeres. Cuando se aplican estas reglas, hay un estudio reciente que demuestra que aproximadamente un 25 % de la población general en Corea muestra síntomas de síndrome metabólico.

20

25

30

Por otra parte, los tejidos inmunitarios mucosos se refieren a tejidos recubiertos con membranas mucosas que varían entre los órganos respiratorios, los órganos genitales y los órganos digestivos y estos tejidos están conectados directamente con el ambiente externo y están fácilmente expuestos a antígenos y patógenos extraños. En los tejidos mucosos del cuerpo humano, varios microorganismos de los prácticamente 100 mil millones, tales como bacterias, hongos, protozoos, etc. producen agregados y coexisten con ellos.

35

En comparación con los tejidos inmunitarios sistémicos, los tejidos inmunitarios mucosos tienen un mecanismo de tolerancia inmunológica que les permite coexistir con diversos microorganismos simbióticos y al mismo tiempo, tienen un sistema que puede provocar una respuesta inmunitaria rápida y potente para la defensa primaria contra microorganismos patógenos.

40

Se sabe que los microorganismos intestinales afectan a la salud y la enfermedad en seres humanos al participar en el mantenimiento de la homeostasia intestinal y la regulación metabólica por medio de diversos mecanismos. Por ejemplo, el documento KR 2013 0021920 describe una composición que comprende vesículas extracelulares procedentes de *Akkermansia muciniphila* y *Bacteroides acidifaciens* como principio activo para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias. Los microorganismos intestinales fermentan los polisacáridos no digeridos para preparar ácidos grasos de cadena corta y suministran la fuente de energía de las células epiteliales intestinales. La microflora intestinal de un ser humano puede dividirse ampliamente en cuatro filos de bacterias gramnegativas, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* y bacterias grampositivas, *Firmicutes* y *Actinobacteria*.

45

50

En particular, la obesidad es uno de los factores de riesgo asociados con enfermedades tales como enfermedad cardiovascular, diabetes y osteoporosis. Recientemente, se han publicado diversos resultados de investigación que demuestran que la obesidad está profundamente relacionada con los cambios y la diversidad de la microflora intestinal. Al comparar los microorganismos de un ratón obeso (ratón ob/ob) con los de un ratón con peso corporal normal, se sabe que el filo *Firmicutes* está aumentado y el filo *Bacteroides* está reducido. De manera similar, se ha comunicado que cuando se sirven comidas bajas en carbohidratos o bajas en grasas a seres humanos obesos, aumenta el filo *Bacteroidetes* y en un estudio con gemelos, se reduce la diversidad y se reduce el filo *Bacteroidetes* en el análisis de los microorganismos intestinales de seres humanos obesos.

55

Como resultado del análisis del acervo génico de los microorganismos intestinales en seres humanos delgados y obesos, se ha confirmado que hay diferencias significativas en el tipo y la cantidad de especies microbianas intestinales. En otras palabras, el resultado ha mostrado que los pacientes obesos que no tienen microorganismos intestinales abundantes muestran síntomas tales como adiposidad, resistencia a la insulina, dislipidemia y reacción inflamatoria y ganan peso corporal con mayor facilidad que los seres humanos obesos con microorganismos intestinales abundantes.

60

65

La interacción entre los microorganismos intestinales y los hospedadores desempeña un papel importante en la patogénesis de la obesidad y el síndrome metabólico. Hay una elevada probabilidad de prevenir/tratar la obesidad investigando y aislando/identificando el papel de los microorganismos que son simbióticos en el intestino y haciendo cambios en estas interacciones usando el concepto de los probióticos.

5 Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado que ciertos microorganismos intestinales estén directamente implicados en el metabolismo de los lípidos y puedan afectar al peso corporal y a la masa grasa.

10 **[Divulgación]**

**[Problema técnico]**

15 Por consiguiente, los presentes inventores han establecido un ratón transgénico que muestra un fenotipo delgado, han especificado microorganismos intestinales específicamente aumentados en los ratones y han confirmado que los microorganismos correspondientes pueden estar de hecho implicados en el metabolismo interno, en particular en el metabolismo de lípidos y han completado la presente invención.

20 Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación es proporcionar una composición para su uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas, incluyendo la composición los microorganismos eficaces.

25 Otro aspecto es proporcionar un método para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades metabólicas, incluyendo el método administrar los microorganismos efectos a un sujeto que necesite prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas. El método puede incluir además, antes de la administración, identificar a un sujeto que necesite prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas (por ejemplo, identificar si el sujeto en el que se va a efectuar la administración padece o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad metabólica).

30 Otro aspecto es proporcionar el uso de los microorganismos eficaces anteriores para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades metabólicas o para prevenir o tratar enfermedades metabólicas.

Además, un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición para su uso en un método para oxidar grasas o inhibir DPP-4 o a una composición para prevenir o tratar enfermedades asociadas con los mismos, incluyendo la composición los microorganismos eficaces anteriores.

35 Además, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para su uso para inhibir a DPP-4 o promover la oxidación de grasas o a un método para prevenir o tratar enfermedades asociadas con los mismos, incluyendo el método administrar los microorganismos eficaces a un sujeto que necesite inhibición de DPP-4. El método puede incluir además, antes de la administración, identificar a un sujeto que necesite inhibición de DPP-4 o la oxidación de grasas o a un sujeto que necesite prevención o tratamiento de las enfermedades asociadas con los mismos.

40 La presente divulgación se refiere al uso de los microorganismos eficaces anteriores para su uso en la inhibición de DPP-4 o la oxidación de grasas o para prevenir o tratar las enfermedades asociadas con los mismos o a un uso de los microorganismos eficaces anteriores para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para inhibir a DPP-4 u oxidar grasas o para prevenir o tratar las enfermedades asociadas con los mismos.

45 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un transformante que expresa un fenotipo delgado, en el que se elimina el gen Atg7 en células dendríticas.

50 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para preparar un transformante que muestra un fenotipo delgado, incluyendo el método eliminar un gen Atg7 en células dendríticas.

55 Además, otro aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica para su uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas, incluyendo la composición farmacéutica Atg7 y un inhibidor de la expresión o un inhibidor de la actividad de un gen que codifica los mismos como principios activos.

**[Solución técnica]**

60 Un aspecto de la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para su uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas, incluyendo la composición farmacéutica *Bacteroides acidifaciens* como principio activo. Otro aspecto proporciona un método para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades metabólicas, incluyendo el método administrar *Bacteroides acidifaciens* a un sujeto que necesite prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas. El método puede incluir además, antes de la administración, identificar a un sujeto que necesita prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas. Otro aspecto es proporcionar el uso de *Bacteroides acidifaciens* para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades metabólicas o para prevenir o tratar enfermedades metabólicas.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá con detalle la presente divulgación.

En un ejemplo específico, los presentes inventores confirmaron que cuando se elimina el gen *Atg7* en células dendríticas, se expresa un fenotipo delgado en el ratón y posteriormente, se compararon los microorganismos intestinales con un grupo de control y se confirmó que había presencia de *Bacteroides acidifaciens* a un nivel elevado en un ratón *Atg7<sup>ΔCD11c</sup>* que expresaba un fenotipo delgado. Además, se ha confirmado que *Bacteroides acidifaciens* reduce el peso corporal y la grasa corporal de un ratón, reduce los niveles de glucosa en sangre y aumenta la producción de insulina en sangre.

Además, *Bacteroides acidifaciens* (BA), de acuerdo con la presente divulgación, provoca la actividad de oxidación de grasas a través de un eje de ácidos biliares-TGR5-PPAR $\alpha$  en tejidos adiposos, dando como resultado un alto consumo de energía. Al mismo tiempo, BA activa la DPP-4 visceral, seguido de un aumento de GLP-1, contribuyendo de este modo a la homeostasis de la glucosa. Los ácidos biliares, el colato y la taurina contribuyen a la actividad de GLP-1 a través de un receptor TGR5 y mejoran la sensibilidad a la insulina.

Por consiguiente, el *Bacteroides acidifaciens* de la presente divulgación puede usarse como composición farmacéutica para su uso en un método de prevención o tratamiento de enfermedades metabólicas.

El *Bacteroides acidifaciens* anterior es un concepto que incluye no solo las células microbianas en sí, sino también cultivos de la bacteria, por ejemplo, cultivos que contienen células microbianas o cultivos que excluyen células microbianas, materiales desecados, fragmentos, fracciones de los cultivos y similares.

La expresión "trastorno metabólico" usada en la presente memoria descriptiva se refiere a una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en obesidad, diabetes, complicaciones diabéticas, esteatosis hepática, hipertensión, vasculopatía periférica, dislipidemia, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular, arterioesclerosis, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlipidemia, anomalías del metabolismo de carbohidratos y similares.

La obesidad es un ejemplo de enfermedad metabólica. El término "obesidad" en la presente divulgación es una enfermedad definida como un aumento en el número de adipocitos y una expansión del volumen celular y puede ser una causa principal de enfermedades metabólicas, tales como diabetes, hipertrigliceridemia, hipertensión, enfermedad cardiovascular, defectos de la coagulación sanguínea, enfermedad renal, enfermedad de los ojos e infección del pie, etc.

Además, como otro ejemplo de enfermedades metabólicas, la "diabetes" es una enfermedad en la que hay deficiencia de insulina o se reduce la sensibilidad a la insulina, dando como resultado anomalías en el metabolismo de los carbohidratos y se divide en diabetes de tipo 1, que es el resultado de una afección en la que el páncreas produce poca cantidad de insulina (diabetes mellitus insulino dependiente: IDDS) y diabetes de tipo 2, que comienza con un rechazo del tejido a la insulina (diabetes mellitus no insulino dependiente: NIDDM).

Más de un 90 % de todos los casos de diabetes es de diabetes de tipo 2. Se sabe que la diabetes de tipo 2 está estrechamente asociada con la herencia y la obesidad, especialmente la obesidad abdominal (un estado en el que la relación de la circunferencia de la cintura: circunferencia de la cadera es de 85:100 o más). Por consiguiente, en la presente divulgación, la diabetes significa preferentemente diabetes de tipo 2. Las enfermedades metabólicas pueden incluir complicaciones de la diabetes. Las complicaciones agudas de la diabetes (hipoglucemia, cetoacidosis o coma hiperosmolar no cetónico) pueden producirse cuando la diabetes no se controla de manera adecuada. Las complicaciones graves prolongadas incluyen enfermedad cardiovascular (doble riesgo), insuficiencia renal crónica, daño retinal que puede desembocar en ceguera, muchos tipos de daño nervioso y daño microvascular, que provoca disfunción eréctil y mala cicatrización. La lenta cicatrización de heridas (especialmente en los pies) puede provocar gangrena, que puede acabar en amputación.

En la presente memoria descriptiva, la expresión "esteatosis hepática" se refiere a un fenómeno en el que la grasa neutra, que no está presente en células normales, se muestra anormalmente depositada en células hepáticas.

En la presente memoria descriptiva, la hipertensión se refiere a un estado en el que la presión arterial está crónicamente elevada y un adulto de más de 18 años tiene una presión sanguínea sistólica de 140 mmHg o más o una presión sanguínea diastólica de 90 mmHg o más y puede estar causada por obesidad.

La expresión "vasculopatía periférica (PVD)" se refiere al daño, disfunción y similares de las arterias y venas periféricas.

En la presente divulgación, dislipidemia se refiere a una combinación de bajo colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDLc), alta concentración de triglicéridos y una concentración ligeramente elevada o normal de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDLc).

Además, en la presente divulgación, resistencia a la insulina significa una afección metabólica en la que la acción de

la insulina, que es la hormona biológica más importante para controlar el metabolismo total de la energía, tal como de carbohidratos, lípidos y proteínas, a una concentración fisiológica de insulina, es más reducida de lo normal.

5 En la presente divulgación, arterioesclerosis se refiere a una afección en la que se produce una acumulación de sustancias grasas (placa) que contiene colesterol, fosfolípidos, calcio, etc. en el interior de los vasos sanguíneos y las arterias se endurecen, pierden elasticidad y se estrechan, lo que provoca obstrucción del riego sanguíneo y causa ruptura arterial, disección arterial, etc. a causa de la alta presión.

10 En la presente divulgación, hiperglucemia se refiere a una afección en la que aumenta de manera anormal el nivel de azúcar en sangre y puede deberse a una anomalía en la producción de insulina o a una disfunción de la insulina.

15 En la presente divulgación, hiperlipidemia se refiere a una afección en la que aumentan los componentes lipídicos, tales como colesterol, la sangre no circula de manera fluida, los componentes lipídicos se adhieren a las paredes arteriales, lo que da como resultado una respuesta inflamatoria crónica y el estrechamiento de la pared arterial provoca aterosclerosis, lo que desemboca en un endurecimiento de los vasos sanguíneos. A largo plazo, la trombosis producida causa infarto cardíaco, ictus o infarto cerebral, etc. mediante la oclusión de las arterias coronarias y los vasos sanguíneos cerebrales.

20 Hiperinsulinemia significa una afección en la que los niveles de insulina en sangre son mayores de lo normal y existe hiperinsulinemia orgánica e hiperinsulinemia funcional. La hiperinsulinemia orgánica está provocada por la proliferación (adenoma, hipertrofia) de los islotes de Langerhans, lo que da como resultado una secreción excesiva de insulina por el páncreas que causa hipoglucemia espontánea. La hiperinsulinemia funcional está causada por el sistema nervioso autónomo y una disfunción del sistema digestivo sin adenoma de islotes de Langerhans. Esto significa que el nivel de insulina de la dieta postprandial está aumentado principalmente a causa de ictus y hepatitis tras una gastrectomía y se produce hipoglucemia de 2 a 4 horas después de comer.

30 De acuerdo con la presente divulgación, un trastorno metabólico de los carbohidratos es una enfermedad metabólica provocada por un problema en el proceso de biosíntesis de la glucosa a la hora de producir glucosa a partir de ácido pirúvico o un problema en el circuito de TCA y el proceso de fosforilación oxidativa para producir dióxido de carbono y agua a partir del ácido pirúvico. Son ejemplos de este, pero sin limitación, la enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo 1, una deficiencia de fructosa-1,6-bisfosfatasa, una deficiencia del complejo de piruvato deshidrogenasa, una deficiencia de piruvato carboxilasa, una glucogenosis, una galactosemia y similares.

35 Además, como ejemplo de enfermedad metabólica, puede nombrarse el síndrome metabólico. El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos que incluyen los siguientes para los expertos en la materia: obesidad abdominal (exceso de tejido adiposo alrededor del abdomen); dislipidemia aterosclerótica (enfermedad de grasas en sangre aumentadas - triglicéridos elevados, bajo colesterol asociado a HDL y alto colesterol asociado a LDL - formación de placas en las paredes arteriales); aumento de la presión arterial; resistencia a la insulina o hipersensibilidad a la glucosa; una afección protrombótica (por ejemplo, fibrinógeno o PAI-1 (inhibidor-1 de activador del plasminógeno) aumentado en sangre); y una afección proinflamatoria (por ejemplo, un aumento en la proteína C-reactiva en sangre). Las personas que padecen síndrome metabólico tienen un riesgo aumentado de cardiopatía coronaria y otras enfermedades asociadas con la acumulación de placa en las paredes arteriales (tales como ictus y vasculopatía periférica) y diabetes de tipo 2.

45 Otro ejemplo de enfermedades metabólicas incluye trastorno cardiovascular o cardíaco.

50 Enfermedad cardíaca es una expresión genérica que puede usarse indistintamente con términos tales como cardiopatía y enfermedad cardiovascular. En la presente memoria descriptiva, enfermedad cardíaca significa cualquier tipo de enfermedad que altere el normal funcionamiento del corazón. Más específicamente, las enfermedades incluidas como enfermedad cardíaca en la presente memoria descriptiva incluyen cardiopatía coronaria, cardiomiopatía, enfermedad cardiovascular, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía hipertensiva, cardiopatía inflamatoria y cardiopatía valvular, pero no se limitan a las mismas.

55 Además, la presente divulgación proporciona una composición para oxidar grasas o una composición para prevenir o tratar enfermedades asociadas con las mismas, incluyendo la composición *Bacteroides acidifaciens* como principio activo. La presente divulgación proporciona un método para promover la oxidación de grasas o prevenir o tratar enfermedades asociadas con las mismas, incluyendo el método administrar *Bacteroides acidifaciens* a un sujeto que necesite promover la oxidación de grasas o prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con las mismas. El método puede incluir además, antes de la administración, identificar a un sujeto en el que se necesite promover la oxidación de grasas o la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con las mismas. La presente divulgación proporciona un uso de *Bacteroides acidifaciens* para la producción de una composición farmacéutica para promover la oxidación de grasas o prevenir o tratar enfermedades asociadas con las mismas.

65 La composición para la oxidación de grasas puede ser una composición farmacéutica para su uso en un método de prevención o tratamiento de una afección fisiológica o patológica inducida por estrés oxidativo. Además, la composición puede ser una composición farmacéutica para prevenir o tratar el estrés físico o mental. La composición puede ser

una composición farmacéutica para prevenir o tratar una o más enfermedades seleccionadas entre el grupo que consiste en envejecimiento, cáncer, aterosclerosis múltiple, artritis, enfermedad de Parkinson, ictus, conmoción cerebral, enfermedad de Alzheimer, trastornos vasculares, hiperlipemia, infarto de miocardio e infarto cerebral.

- 5 La composición para la oxidación de grasas puede usarse no solo para enfermedades metabólicas, sino también para el tratamiento de enfermedades musculares y enfermedades relacionadas, tales como sarcopenia, caquexia, daño muscular, distrofia muscular y fatiga muscular, la mejora de la función y resistencia muscular, la mejora del rendimiento corporal, el aumento de la capacidad de resistencia, el aumento de la masa muscular, la prevención de la pérdida de músculo, el aumento de la recuperación muscular, la reducción de la fatiga muscular, la mejora del equilibrio energético, el mantenimiento del rendimiento muscular y/o la fuerza muscular y/o la masa muscular y/o la función muscular, la mejora de la forma corporal o la mejora de la relación músculo:grasa.

Además, un aspecto de la presente divulgación proporciona una composición para su uso en un método para inhibir a DPP-4 o una composición para la hipoglucemia, incluyendo la composición *Bacteroides acidifaciens* como principio activo. Otro aspecto proporciona un método para inhibir a DPP-4 o la hipoglucemia, incluyendo el método administrar *Bacteroides acidifaciens* a un sujeto que necesite inhibición de DPP-4 o de la hipoglucemia. El método puede incluir además, antes de la administración, identificar a un sujeto que necesite inhibición de DPP-4 o de la hipoglucemia. Otro aspecto proporciona el uso de *Bacteroides acidifaciens* para su uso en la preparación de una composición farmacéutica para inhibir a DPP-4 o la hipoglucemia.

Un inhibidor de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) es un medicamento que tiene un nuevo mecanismo para la regulación de la glucosa en sangre. El péptido-1 similar a glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) se secretan en el tracto gastrointestinal durante la ingesta de alimento. Se denomina incretina, secretada en las células K y L del intestino y se degrada en la sangre por la enzima DPP-4 en un espacio de tiempo muy corto.

Los inhibidores de DPP-4 aumentan en nivel de incretina en sangre inhibiendo la enzima DPP-4 responsable de la degradación de incretina. Además, se ha demostrado que el uso de inhibidores de DPP-4 regula la glucosa en sangre estimulando la síntesis y secreción de insulina, inhibiendo el glucagón e inhibiendo la síntesis de glucosa en el hígado.

30 Cuando la composición se prepara como una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades metabólicas o enfermedades relacionadas con la oxidación de grasas, la composición puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluidos en la composición se usan comúnmente para la preparación e incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábiga, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral, pero no se limitan a los mismos. La composición farmacéutica puede incluir además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente aromatizante, un agente emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, etc. además de los ingredientes anteriores.

40 La composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir o tratar enfermedades metabólicas o enfermedades relacionadas con la oxidación de grasas puede administrarse por vía oral o parenteral. En el caso de administración parenteral, puede administrarse por inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, administración endotelial, administración tópica, administración intranasal, administración intrapulmonar y administración intrarrectal. En el caso de administración oral, la proteína o el péptido se digiere y la composición oral ha de formularse para recubrir el principio activo o para protegerlo frente a la degradación en el estómago. Además, la composición también puede administrarse mediante cualquier dispositivo capaz de transferir el material activo a la célula diana.

El sujeto de administración de la composición farmacéutica puede ser un animal, tal como un mamífero, tal como un ser humano o una célula, tejido o cultivo del mismo aislado a partir del mismo.

Puede prescribirse de varias maneras la dosis adecuada de la composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir o tratar enfermedades metabólicas o enfermedades relacionadas con la oxidación de grasas dependiendo de factores tales como el método de preparación, el método de administración, la edad, el peso corporal, el género, los procesos patológicos de un paciente, el alimento, el momento de administración, la vía de administración, la velocidad de excreción y la sensibilidad. La dosis preferida de la composición se encuentra en el intervalo de 100 a 100.000.000 (de  $10^2$  a  $10^8$ ) células/kg para un adulto. La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para prevenir o tratar una enfermedad metabólica o una enfermedad relacionada con la oxidación de grasas.

La composición puede prepararse en forma de dosis unitaria usando un portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con un método que puede llevarse a cabo fácilmente por un experto en la materia o puede prepararse insertándola en un recipiente multidosis. En ese momento, las formulaciones pueden encontrarse en forma de soluciones, suspensiones, jarabes o emulsiones en aceites o medios acuosos o en forma de extracto, polvos, polvos, gránulos, comprimidos o cápsulas y además pueden contener agentes de dispersión o estabilizantes. Además, la composición puede administrarse como un agente terapéutico individual o en combinación con otro agente

terapéutico y puede administrarse secuencialmente o simultáneamente con un agente terapéutico convencional. También puede administrarse una o más veces, en caso necesario.

5 El *Bacteroides acidifaciens* de acuerdo con la presente divulgación puede utilizarse como una composición alimentaria. La composición alimentaria de la presente divulgación puede usarse fácilmente como un alimento, por ejemplo, materias primas principales y materias primas complementarias de alimentos, aditivos alimentarios, alimentos o bebidas funcionales, que son eficaces para prevenir y mejorar los síntomas de enfermedades metabólicas o para la oxidación de grasas.

10 El término "alimento" en la presente divulgación significa un producto natural o un producto procesado que contiene uno o más nutrientes, preferentemente en un estado que puede comerse directamente mediante un cierto grado de procesado y en un sentido general, incluye todos los alimentos, aditivos alimentarios, alimentos y bebidas funcionales.

15 Los alimentos para los que es útil la composición para su uso en un método para prevenir o mejorar los síntomas de enfermedades metabólicas o para oxidar grasas de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir, por ejemplo, diversos alimentos, bebidas, gomas, infusiones, complejos de vitaminas y alimentos funcionales. Además, en la presente divulgación, el alimento puede incluir cualquier alimento nutricional especial (por ejemplo, preparados para lactantes, alimento para bebés), productos cárnicos, productos piscícolas, tofu, alimentos en gelatina, tallarines (por ejemplo, ramen, tallarines), panes, suplementos dietéticos, sazónadores alimentarios (por ejemplo, salsa de soja, pasta de soja, pasta de chile rojo y pasta de soja mixta), salsas, artículos de confitería (por ejemplo, aperitivos), caramelo, chocolate, chicle, helado, productos lácteos (por ejemplo, leche fermentada, queso, etc.), otros alimentos procesados, kimchi, alimentos encurtidos (diversos tipos de kimchi, vegetales encurtidos, etc.), bebidas (por ejemplo, bebidas de frutas, bebidas vegetales, leche de soja, bebidas fermentadas, etc.) y sazónadores naturales (por ejemplo, sopa de ramen), pero no se limitan a los mismos. El alimento, bebida o aditivo alimentario puede prepararse mediante un método de preparación convencional.

25 Además, "alimento funcional" significa un grupo de alimentos a los que se confiere un valor añadido a su función o que expresan la función del alimento correspondiente para un fin específico usando técnicas físicas, bioquímicas o biotecnológicas en el alimento o para controlar el ritmo de biodefensa de la composición alimentaria o un alimento que se diseña y procesa para que exprese una función de control del organismo, tal como la prevención y la recuperación de enfermedades y similares y específicamente, puede ser un alimento funcional para la salud. El alimento funcional puede incluir un aditivo alimentario aceptable y puede incluir portadores, excipientes y diluyentes adecuados comúnmente usados en la preparación de alimentos funcionales.

30 En la presente divulgación, el término "bebida" es un término genérico para líquidos que calman la sed o refrescantes e incluye una bebida funcional. La bebida incluye una composición para prevenir o mejorar los síntomas de enfermedad metabólica como ingrediente esencial a la relación indicada y no hay una limitación particular en cuanto a otros ingredientes. Puede contenerse como ingredientes adicionales diversos aromas o carbohidratos naturales, tales como bebidas convencionales.

35 Además de los descritos anteriormente, el alimento es para su uso en un método para prevenir o mejorar síntomas de enfermedades metabólicas o para contener la composición para la oxidación de grasas de la presente divulgación y puede contener diversos nutrientes, vitaminas, minerales (electrolitos), aromas, tales como aromas sintéticos y aromas naturales, agentes colorantes y rellenos (queso, chocolate, etc.), ácidos pécticos y sus sales, ácidos algínicos y sus sales, ácidos orgánicos, espesantes coloidales protectores, agentes de ajuste del pH, estabilizantes, conservantes, glicerina, alcohol y agentes de carbonación usados para bebidas carbonatadas y estos ingredientes pueden usarse de manera independiente o en combinación.

40 En el alimento que contiene la composición para su uso en un método para prevenir o mejorar los síntomas de la enfermedad metabólica de la presente divulgación o para la oxidación de grasas, la cantidad de la composición de acuerdo con la presente divulgación puede encontrarse en el intervalo del 0,001 % en peso al 90 % en peso, basándose en el peso total del alimento completo y puede incluir preferentemente de un 0,1 a un 40 % en peso. En el caso de las bebidas, pueden incluirse en una relación de 0,001 a 2 g, preferentemente de 0,01 a 0,1 g basándose en 100 ml. Sin embargo, por motivos de salud e higiene, durante una administración a largo plazo con el fin de ajustar la salud, la cantidad puede ser menor que el intervalo anterior. Debido a que el principio activo no tiene problemas en cuanto a su seguridad, puede usarse en una cantidad que supere el intervalo anterior, pero no se limita al intervalo anterior.

45 Además, la presente divulgación proporciona un transformante que expresa un fenotipo delgado, en el que se elimina el gen *Atg7* en células dendríticas. Además, la presente divulgación proporciona un método para producir un transformante que expresa un fenotipo delgado, incluyendo el método eliminar un gen *Atg7* en células dendríticas.

60 Además, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades metabólicas, incluyendo la composición farmacéutica *Atg7* y un inhibidor de la expresión o un inhibidor de la actividad de un gen que codifica los mismos como principios activos.

El inhibidor de la expresión del gen que codifica Atg7 puede ser ARNpi (ARN pequeño de interferencia) específico para el gen, ARNhc (ARN en horquilla corta), miARN (microARN), ribozima, ADNzima, PNA (ácidos nucleicos peptídicos) y oligonucleótidos antisentido.

- 5 El inhibidor de la actividad de Atg7 puede ser un anticuerpo, un aptámero, un extracto natural y agentes químicos específicos para Atg7. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

10 El término "transformación" en la presente divulgación significa un fenómeno en el que se cambian las propiedades genéticas de un organismo por medio de ADN suministrado desde el exterior, es decir, cuando el ADN, que es un tipo de ácido nucleico extraído de células de cualquier sistema de un organismo, se administra a células vivas de otro sistema, el ADN entra en las células para cambiar rasgos genéticos.

15 En la presente divulgación, el término "transformante" significa un individuo producido mediante transformación y no se limita al individuo, pero significa preferentemente un animal transformante.

Además, otro aspecto de la presente divulgación puede proporcionar una composición alimentaria para prevenir o mejorar enfermedades metabólicas, en donde la composición alimentaria incluye Atg7, un inhibidor de la expresión o un inhibidor de la actividad de un gen que codifica el mismo como principios activos.

20 Además, la presente divulgación proporciona un método para detectar sistemáticamente microorganismos intestinales útiles, incluyendo el método comparar los microorganismos intestinales de un individuo con fenotipo obeso o general con el transformante. El método de detección sistemática puede incluir además, después de comparar, seleccionar (determinar) un microorganismo que tiene un gran número de individuos en el transformante como microorganismos intestinales útiles, en comparación con microorganismos intestinales de un individuo con fenotipo obeso o general.

25 El microorganismo intestinal útil puede ser un microorganismo intestinal útil para enfermedades metabólicas o la oxidación de grasas, preferentemente un microorganismo útil para enfermedades metabólicas de los lípidos.

**[Efectos ventajosos]**

30 El *Bacteroides acidifaciens* (BA) de acuerdo con la presente divulgación da como resultado la activación de la oxidación de grasas a través del eje de ácido biliar-TGR5-PPAR $\alpha$  en el tejido adiposo, dando como resultado un alto consumo de energía. Al mismo tiempo, BA activa la DPP-4 visceral, seguido de un aumento de GLP-1, contribuyendo de este modo a la homeostasis de la glucosa. Los ácidos biliares, el colato y la taurina también contribuyen a la actividad de GLP-1 a través de un receptor TGR5 y mejoran la sensibilidad a la insulina. Por consiguiente, puede usarse como un agente terapéutico muy eficaz o como agente preventivo de enfermedades metabólicas.

**[Descripción de los dibujos]**

40 La FIG. 1 es un diagrama que muestra un fenotipo delgado en un ratón *Atg7 $\Delta$ CD11c*.

(A) Se monitorizó el cambio de peso corporal de los ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c* durante 23 semanas (panel izquierdo). Peso corporal y masa grasa (panel derecho) de ratones macho *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c* de 24 semanas de edad con una dieta de pienso normal (NCD). (n = 8).

45 (B) Fotografías de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c* de 24 semanas de edad.

(C) IRM del tejido adiposo abdominal de ratones macho *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c* de 24 semanas de edad alimentados con NCD.

50 (D) Cambios histológicos (panel izquierdo) y tamaño de adipocitos (panel derecho) en el tejido adiposo de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c*. Barras de escala = 50  $\mu$ m.

55 (E) Niveles de glucosa e insulina en el suero de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c* alimentados con NCD en condiciones sin ayuno.

(F) Resultados de la GTT (prueba de tolerancia a la glucosa) y la ITT (prueba de tolerancia a la insulina) para ratones macho *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c*.

60 Todos los datos mostrados son la media  $\pm$  e.e.m. \*P < 0,05, < 0,01 y \*\*\*P < 0,001.

La FIG. 2 es un diagrama que muestra que se origina un fenotipo delgado a partir de bacterias simbióticas viscerales.

65 (A) Fotografías de ratones macho alojados juntos (CH; parte media) y separados (extremos izquierdo y derecho) de 24 semanas de edad *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7 $\Delta$ CD11c*.

(B) Peso corporal y masa grasa de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7<sup>ΔCD11c</sup>* macho de 24 semanas de edad alojados juntos y en una jaula separada, (n = 3 o 4).

5 (C) Resultados de la monitorización del peso corporal de cada ratón después de alojarlos juntos (CH) durante 10 semanas adicionales (n = 3 a 9).

(D) Peso corporal y masa grasa de ratones B6 no tratados después de 18 semanas de movimiento de las heces en un ratón *Atg7<sup>fl/fl</sup>* o *Atg7<sup>ΔCD11c</sup>* (n = 5).

10 (E) Niveles de glucosa e insulina en el suero después del movimiento de extracto fecal de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* o *Atg7<sup>ΔCD11c</sup>* en condiciones sin ayuno (n = 5).

Todos los datos son valores de media ± e.e.m. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001; ns, no significativo.

15 La FIG. 3 es un diagrama que muestra que *B. acidifaciens* (BA) se expande en las heces de un ratón *Atg7<sup>ΔCD11c</sup>* en las bacterias simbióticas viscerales.

(A) Nivel de filos y (B) datos de pirosecuenciación (n = 6) de la clase al género.

20 (C) Diagramas de sectores representativos de las especies que representan la distribución de BA en las heces detectadas mediante pirosecuenciación. Flecha roja = BA.

25 (D) IEC (células epiteliales intestinales) de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7<sup>ΔCD11c</sup>* determinadas mediante una sonda FISH (hibridación in situ de fluorescencia) específica de BA y el número de BA aumentado en la luz del colon (n = 3). Barra de escala = 100 μm. Todos los datos son valores de media ± e.e.m. \*P < 0,05; ns, no significativo.

La FIG. 4 es un diagrama que muestra que *B. acidifaciens* (BA) regula el peso corporal y la masa grasa de ratones B6 con obesidad inducida por la dieta.

30 (A) Fotografías de ratones alimentados con dieta alta en grasas (HFD, panel izquierdo) y a los que se administra PBS y BA. Se monitorizó el peso corporal de cada grupo durante 10 semanas (panel derecho). Se administró BA por vía oral (5 x 10<sup>9</sup> UFC/100 μl) (n = 5).

35 (B) Ingesta dietaria oral con PBS o BA (n = 5).

(C) IRM de ratones a los que se administra PBS y BA.

40 (D) Cambios histológicos en el tejido adiposo (panel izquierdo) y el tamaño de adipocitos (panel derecho) de ratones a los que se administra PBS y BA en una HFD.

Todos los datos mostrados son la media ± e.e.m de ≥ 2 experimentos independientes.

45 (E) Resultados de la GTT (prueba de tolerancia a la glucosa; panel izquierdo, n = 8 o 9) y la ITT (prueba de tolerancia a la insulina; panel derecho, n = 7-12) usando el suero de ratones a los que se administra PBS y BA en un determinado momento después de la inyección intraperitoneal de glucosa o insulina.

50 (F) Consumo de energía, actividad total y RER (relación de intercambio respiratorio) (n = 5) de ratones a los que se administra PBS o BA. Todos los datos se expresan como media ± e.e.m. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001; ns, no significativo.

La FIG. 5 es un diagrama que muestra que *B. acidifaciens* (BA) induce la oxidación de grasas en el tejido adiposo mediante la actividad de PPARα.

55 Al final de cada experimento, se determinaron los niveles de expresión de ARNm de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (Fasn, HSL, PEPCk, SCD1 y PPARγ), la β-oxidación (PPARα), la termogénesis (PRDM16, PGC1a, Cidea y GLUT4) mediante PCR en tiempo real usando tejidos adiposos del epidídimo de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7<sup>ΔCD11c</sup>* (A; n = 5), ratones sometidos a trasplante de microorganismos fecales (B; n = 5) y ratones a los que se administra BA (C; n = 5).

60 Se analizaron los niveles de expresión de PPARα (D) y TGR5 (E) en tejido adiposo después de 1, 7 y 14 días de administración diaria de BA mediante RT-PCR.

Todos los datos son la media ± e.e.m de ≥ 2 experimentos independientes. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001; ns, no significativo.

65 La FIG. 6 es un diagrama que muestra que *B. acidifaciens* (BA) regula la secreción de DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4)

para inducir la producción de GLP-1.

(A) Niveles de glucosa e insulina en el suero de ratones a los que se administra PBS y BA y (B) GLP-1 activado (B) (dieta de pienso normal, NCD; dieta alta en grasas, HFD; n = 5).

5 (C) Una hora después de la administración de BA o de sobrenadante de cultivo de BA o solo medio a ratones B6 no tratados, se confirmó el nivel de DPP-4 en el intestino delgado mediante análisis de emisión de luz.

10 (D) Cuantificación de colatos y taurinas en las heces de ratones a los que se administra PBS y BA (n = 5) usando EC-EM (electroforesis capilar-espectrometría de masas).

Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m de  $\geq 2$  experimentos independientes. \*P < 0,05, <0,01, \*\*\*P < 0,001; ns, no significativo.

15 La FIG. 7 es un diagrama que muestra un mecanismo mediante el cual *B. acidifaciens* (BA) puede prevenir o tratar la sensibilidad a la insulina y la obesidad.

20 Se identificaron bacterias simbióticas viscerales específicas (es decir, BA) expandidas en un ratón con fenotipo delgado Atg7 $\Delta$ CD11c. La administración de BA da como resultado la activación de la oxidación de grasas a través del eje de ácido biliar-TGR5-PPAR $\alpha$  en el tejido adiposo, dando como resultado un alto consumo de energía. Al mismo tiempo, BA activa la DPP-4 visceral, seguido de un aumento de GLP-1, contribuyendo de este modo a la homeostasis de la glucosa. Los ácidos biliares, el colato y la taurina también contribuyen a la actividad de GLP-1 a través de un receptor TGR5 y mejoran la sensibilidad a la insulina.

25 PPAR $\alpha$ , receptor  $\alpha$  activado por proliferador de peroxisomas; SCFA, ácidos grasos de cadena corta.

La FIG. 8 es un diagrama que muestra que un ratón Atg7 $\Delta$ CD11c muestra un fenotipo delgado independientemente del género.

30 Peso corporal de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  y Atg7 $\Delta$ CD11c machos (izquierda) y hembra (derecha) de entre 7 y 23 semanas de edad alimentados con NCD.

35 La FIG. 9 es un diagrama que muestra que el fenotipo delgado de los ratones Atg7 $\Delta$ CD11c de 24 semanas de edad no está asociado con inflamación.

(A) Niveles de citocinas proinflamatorias en el suero de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  y Atg7 $\Delta$ CD11c (n = 7) medidos usando un kit para inflamación en ratón de matriz de perlas citométricas (BD Biosciences).

40 (B) Niveles de expresión de ARNm de F4/80 (izquierda) y TNF $\alpha$  (derecha) mediante PCR en tiempo real.

(C) Resultados de la tinción de hematoxilina-eosina del intestino delgado y el colon. Barra de escala = 100  $\mu$ m.

Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m en  $\geq 2$  experimentos independientes. \*P < 0,05; ns, no significativo.

45 La FIG. 10 es un diagrama que muestra el OPLS-DA (análisis de discriminación ortogonal por mínimos cuadrados parciales) de metabolitos fecales de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  y Atg7 $\Delta$ CD11c.

50 (A) Gráficas de puntuación con validación cruzada del OPLS-DA de RMN 1H (resonancia magnética nuclear) en las heces de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  y Atg7 $\Delta$ CD11c (n = 7).

(B) Gráfica S para los componentes predichos del OPLS-DA de los datos de RMN 1H en las heces de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  y Atg7 $\Delta$ CD11c (n = 7).

55 (C) Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en las heces de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  y Atg7 $\Delta$ CD11c (n = 5) usando cromatografía de gases-espectrometría de masas (por ejemplo, acetatos, butiratos y propionato) y lactato. Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01.

60 La FIG. 11 es un diagrama que muestra los cambios de peso corporal compensados de un ratón del mismo tipo en una jaula de alojamiento conjunto (CH) y microorganismos fecales.

Se muestran el peso corporal de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  (n = 5) y Atg7 $\Delta$ CD11c (n = 4) en una jaula de CH y el peso corporal de ratones Atg7 $^{fl/fl}$  y Atg7 $\Delta$ CD11c (S) criados por separado mediante una gráfica lineal basada en círculos grises y azules, respectivamente.

65 La FIG. 12 es un diagrama que muestra que los datos de pirosecuenciación a nivel de especie en las heces de un ratón Atg7 $\Delta$ CD11c mostrados en la FIG. 3C muestran una leyenda de colores.

La FIG. 13 es un diagrama que muestra la disposición biológica de cóntigos de *Bacteroides* en el ADN metagenómico.

5 Se compara la abundancia relativa del número de cóntigos en las heces de ratones Atg7<sup>fl/fl</sup> y Atg7<sup>ΔCD11c</sup>. Todos los datos mostrados son la media ± e.e.m. \* P < 0,05; \*\*\*P < 0,001; ns, no significativo.

La FIG. 14 es un diagrama que muestra que el *B. acidifaciens* (BA) que se administra por vía oral permanece en el colon temporalmente.

10 Se obtuvieron los colonos y las heces en tiempo cero y después de 1-5 días después de la administración oral de BA (5 x 10<sup>9</sup> UFC/100 μl) y se tiñeron con sondas de FISH (hibridación in situ de fluorescencia) específicas para BA.

(A) Imagen confocal del BA (flecha de color amarillo).

15 (B) Cuantificación de BA en las heces en un punto de tiempo específico. El número se contó en ≥ 20 sitios por portamuestras. Todos los datos mostrados son la media ± e.e.m de tres experimentos independientes. \*\*\*P < 0,001; N.D., no detectado.

20 La FIG. 15 es un diagrama que muestra la función efectiva en el peso corporal y la masa grasa de *B. acidifaciens* (BA) en ratones B6 alimentados con NCD a los que se proporciona BA o PBS.

(A) Fotografías y peso corporal después de 10 semanas (paneles izquierdo y derecho, respectivamente). Se administró BA a diario por vía oral (5 x 10<sup>9</sup> UFC/100 μl).

25 (B) Ingesta dietaria oral de PBS o BA.

(C) Análisis por IRM.

30 (D) Cambios histológicos de los tejidos adiposos (panel izquierdo) y cambios en el tamaño de adipocitos (panel derecho).

35 (E) Resultados de la GTT (prueba de tolerancia a la glucosa) (panel izquierdo, n = 8 o 9) y la ITT (prueba de tolerancia a la insulina) (panel derecho, n = 7-12) en un punto de tiempo específico después de la inyección intraperitoneal de glucosa o insulina.

(F) Consumo de energía, actividad total y RER (relación de intercambio respiratorio) de ratones a los que se administró PBS o BA (n = 5).

40 Todos los datos mostrados son la media ± e.e.m. \*P < 0,05, < 0,01, \*\*\*P < 0,001; ns, no significativo.

La FIG. 16 es un diagrama que muestra que los ratones alimentados con NCD o HFD y *B. sartorii* (BS) tienen un peso corporal y una ingesta de dieta similares.

45 (A) Peso corporal durante 10 semanas después de la administración oral de BS (n = 5) (5 x 10<sup>9</sup> UFC/100 μl).

(B) Ingesta de dieta.

Los datos son la media ± e.e.m de dos experimentos independientes, ns, no significativo.

50 La FIG. 17 es un diagrama que muestra que la administración de *B. acidifaciens* (BA) mejora la sensibilidad a la insulina hepática y periférica.

Es el resultado de llevar a cabo un pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico para ratones a los que se administra BA, BA inactivado por calor y ratones de control a los que se alimenta con NCD (n = 3) durante 6 semanas.

55 Durante el experimento de pinzamiento, se determinó que la cantidad de insulina en solución era de 3 mU, basándose en el primer experimento. Aumentaron significativamente la inhibición de la captación sistémica de glucosa (sensibilidad periférica a la insulina, A) y de la producción de glucosa hepática mediada por insulina (sensibilidad a la insulina hepática, B) en los ratones a los que se administró BA en comparación con el grupo al que se administró BA inactivado por calor. Todos los datos mostrados son la media ± e.e.m. \*P < 0,05; ns, no significativo.

65 La FIG. 18 es un diagrama que muestra los niveles de SCFA (ácidos grasos de cadena corta) y los niveles de lactato en las heces después de la administración oral de *B. acidifaciens* (BA) durante 10 semanas. Los niveles de acetato, butirato, propionato y lactato en las heces de ratones con NCD (A; n = 5) y HFD (B; n = 6) se midieron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m. \*P < 0,01; ns, no significativo.

La FIG. 19 es un diagrama que muestra los niveles similares de metabolismo de lípidos en el hígado e intestino delgado en ratones Atg7<sup>fl/fl</sup> y Atg7 <sup>$\Delta$ CD11c</sup>.

5 Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de genes relacionados con la síntesis de ácidos grasos (FasN, HSL, PEPCCK, SCD1 y PPAR $\gamma$ ), la  $\beta$ -oxidación (PPAR $\alpha$ ) y la termogénesis (PRDM16, PGC1a, Cidea y GLUT4) mediante PCR en tiempo real usando hígado (A) e intestino delgado (B) de ratones Atg7<sup>fl/fl</sup> y Atg7 <sup>$\Delta$ CD11c</sup> (A; n = 5).

10 Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m.

La FIG. 20 es un diagrama que muestra que *B. acidifaciens* (BA) no induce hiperpolarización de células  $\beta$ .

15 Se obtuvieron tejidos pancreáticos de ratones (n = 5) a los que se administraron (5 x 10<sup>9</sup> UFC/100  $\mu$ l) durante 10 semanas.

(A) Imagen confocal de islotes pancreáticos (las células  $\alpha$  están marcadas en rojo, las células  $\beta$  están marcadas en verde). Barra de escala = 50  $\mu$ m. Se hizo reaccionar de manera continua las secciones con Ab IgG de ratón dirigido contra glucagón (K79bB10; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.) y Ab policlonal de conejo anti-insulina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), se hicieron reaccionar con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a PE (eBioscience, San Diego, CA) y anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a FITC (eBioscience, San Diego, CA), respectivamente.

(B) Se cuantificó el tamaño de una región de células  $\beta$  usando el programa informático ImageJ. Los islotes pancreáticos se seleccionaron aleatoriamente como 10 sitios por portamuestras. Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m. \*\*\*P < 0,001; ns, no significativo.

La FIG. 21 es una gráfica que muestra los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma de ratones Atg7 <sup>$\Delta$ CD11c</sup>, con trasplante de microbiota fecal (FMT) y a los que se administró *B. acidifaciens* (BA).

30 Se analizaron las concentraciones de triglicéridos en plasma y de colesterol total usando un kit de ensayo enzimático en ratones Atg7 <sup>$\Delta$ CD11c</sup> (A; n = 3), ratones FMT (B; n = 5) y ratones a los que se administró BA (C; n = 5). Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m. ns, no significativo. NCD, dieta de pienso normal; HFD, dieta alta en grasas.

La FIG. 22 es un diagrama que muestra que *B. acidifaciens* (BA) puede regular la autodigestión de células CD11c<sup>+</sup>.

35 Se determinó el número de BA en células CD11c<sup>+</sup> derivadas de médula ósea después de 6 y 24 horas de coincubación con BA en placas de EG agar (MOI = 10). Se obtuvo médula ósea de ratones Atg7<sup>fl/fl</sup> y Atg7 <sup>$\Delta$ CD11c</sup>. Todos los datos son la media  $\pm$  e.e.m de tres experimentos independientes. \* P < 0,05; N.D., no detectado.

40 [Modos de la invención]

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá en más detalle la presente divulgación por medio de ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos tienen un fin únicamente ilustrativo y el alcance de la presente divulgación no se limita a estos ejemplos.

45 **Ejemplo 1: Experimentación con animales**

Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación con Animales de Asan (número de permiso: PN 2014-13-069). Todos los experimentos se efectuaron bajo anestesia con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (20 mg/kg).

**Ejemplo 2: Ratones y cepas bacterianas**

55 Se adquirieron ratones C57BL/6 (B6) y CD11c-Cre, Villine-Cre y LysM-Cre de Charles River Laboratories (Orient Bio Inc., Sungnam, Corea) y Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Los ratones ATG7<sup>fllox/fllox</sup> fueron proporcionados por Masaaki Komatsu (Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japón). Los ratones Atg7 <sup>$\Delta$ CD11c</sup> se prepararon cruzando ratones CD11c<sup>cre</sup> y ratones ATG7<sup>fl/fl</sup> en el laboratorio animal del Seoul Asan Medical Center. Se alimentó a todos los ratones con alimento y agua de bebida estériles en condiciones libres de patógenos. Se adquirieron *B. acidifaciens* (JCM10556) y *B. sartorii* (JCM17136) de la Colección Japonesa de Microorganismos (JCM) del RIKEN BioResource Center.

**Ejemplo 3: Análisis de pirosecuenciación 454**

65 Se extrajo ADNc de las heces usando kits QIAamp DNA stool mini (Qiagen, Valencia, CA). La amplificación por la PCR se llevó a cabo usando cebadores dirigidos a los sitios V1 a V3 del gen de ARNr 16S. Para la amplificación de bacterias, se usaron el cebador 9F (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-

AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; la secuencia subrayada significa cebador en el sitio diana) al que se adjunta un código de barras y 541R (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-X-AC-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'; 'X' significa un código de barras específico de cada objeto) (<http://oklbb.ezbiocloud.net/content/1001>).

5 La amplificación se llevó a cabo en las siguientes condiciones: inicio de la desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, hibridación del cebador a 55 °C durante 30 segundos y amplificación a 72 °C durante 30 segundos y extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Se reunieron las mismas concentraciones de los supuestos productos y se retiraron los trozos pequeños (objetos no diana) usando un kit en perlas AMPure (Agencourt Bioscience, Beverly, MA). Se midió la calidad y el tamaño de los productos en un dispositivo  
10 Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA) usando un chip DNA 75001. La secuenciación de las amplificaciones mixtas se llevó a cabo mediante PCR en emulsión y después se colocó en una placa de picrovaloración. La secuenciación se llevó a cabo en Chunlab (Seúl, Corea) en el sistema de secuenciación GS Junior (Roche, Branford, CT). El análisis de datos de pirosecuenciación se llevó a cabo de acuerdo con la técnica anterior (Lim Y. W. *et al.*).

#### 15 **Ejemplo 4: Medición de CE-TOF-EM (electroforesis capilar (CE)-espectrometría de masas de tiempo de vuelo)**

El análisis cuantitativo de los metabolitos cargados usando CE-TOF-EM se llevó a cabo del siguiente modo. Se molieron 10 mg de muestras fecales liofilizadas usando perlas de zirconita-sílice de 3 mm (BioSpec Products, Bartlesville, OK) y como patrón interno, se homogeneizaron usando 400 µl de MeOH que contenía 20 µM de cada uno de metionina sulfona (Wako, Osaka, Japón) como catión, MES (Dojindo, Kumamoto, Japón) como anión y CSA (ácido D-canfor-10-sulfónico; Wako). Posteriormente, se añadieron 200 µl de agua desionizada y 500 µl de cloroformo. Usando un dispositivo Shakemaster neo (Bio Medical Science, Tokio, Japón), se agitaron a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos, se centrifugó la solución a 4.600 g durante 15 minutos a 4 °C y la proteína se retiró por filtrado usando un filtro con un corte de 5.000 Da (Millipore, Billerica, MA). El filtrado se liofilizó y disolvió en 25 µl de agua que contenía  
25 200 µM de cada uno de 3-aminopirrolidina (Sigma-Aldrich) y trimesato (Wako) como compuestos de referencia. Todos los experimentos de CE-TOF-EM se llevaron a cabo usando equipos de Agilent Technologies: sistema de electroforesis capilar CE, sistema de CL/MSD TOF G3250AA, bomba de HPLC binaria 1100 series, adaptador de EC-EM G1603A y kit de pulverizador de CE-IEN-EM G1607A. Los datos se trataron (MasterHands) usando un programa informático interno (Sugimoto M *et al.*) para determinar la anotación y cuantificación de picos.

30

#### **Ejemplo 5: Medición de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM)**

Se determinó la concentración orgánica en las heces mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se mezcló una muestra parcial (80 ml) del extracto en éter de las heces con N-*terc*-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida. El vial se cerró herméticamente, se calentó en agua hirviendo hasta 80 °C durante 20 minutos  
35 y después se dejó a temperatura ambiente durante 48 horas para su derivatización. Las muestras derivatizadas se trataron con un sistema de CG 6890N Network (Agilent Technologies) equipado con una columna HP-5MS (0,25 mm x 30 m x 0,25 mm) y un detector de masas selectivo 5973 Network (Agilent Technologies).

40 Como gas portador se usó helio puro (99,9999 %) y se suministró a un caudal de 1,2 ml min<sup>-1</sup>.

La presión de salida se ajustó a 97 dividida a 20:1. Las temperaturas de la entrada y la línea de viaje fueron de 250 y 260 °C, respectivamente. EL programa de temperatura usado fue el siguiente: 60 °C (3 minutos), 60-120 °C (5 °C/min), 120-300 °C (20 °C/min). Posteriormente, se inyectó 1 µl de cada muestra para un tiempo de reacción de 30 minutos.  
45 Se cuantificó la concentración de ácido orgánico comparando el área del pico con el patrón.

#### **Ejemplo 6: Medición de GLP-1 (péptido-1 similar a glucagón)**

Se obtuvieron muestras de sangre de un grupo de control y de ratones a los que se administró BA y se centrifugaron  
50 a 1800 g a 4 °C durante 30 minutos. Se añadió inhibidor de DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4) y se determinó la concentración de GLP-1 usando un kit de ELISA para GLP-1 (Shibayagi).

#### **Ejemplo 7: Medición de DPP-4**

55 Se midieron los niveles de DPP-4. Después de 6 horas de ayuno en ratones B6 de tipo silvestre, se administró BA (5 x 10<sup>9</sup> UFC/100 µl) o su sobrenadante de cultivo (100 µl/cabeza) o solo medio de cultivo con el inhibidor de DPP-4 sitagliptina (40 mg/ratón; Merck Sharp Dohme y Chibret Laboratories, Rahway, NJ) seguido de glucosa durante 30 minutos. Después de 15 minutos, se recuperaron las células epiteliales intestinales del íleon de ratones pretratados y se lavaron con PBS para retirar los materiales lumbinales. Se retiró el moco por raspado, el epitelio se cortó en secciones  
60 de 1-2 mm de longitud y se colocó en 1 ml de PBS. Los tejidos seccionados se centrifugaron (6.000 g, 4 °C, 5 min) y se incubaron 50 µl de sobrenadante usando el ensayo de proteasa Glo para DPP-4 (Promega, Madison, WI) a 37 °C durante 2 horas junto con los reactivos del kit. La actividad de DPP-4 se calculó como el valor de una muestra de control en ausencia de sitagliptina.

#### 65 **Ejemplo 8: Estadística**

Para el análisis estadístico se usó el programa informático GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA). Se analizaron las diferencias significativas entre los dos grupos mediante la prueba de la t emparejada de dos colas o la prueba de la t de Mann-Whitney. Se analizó una pluralidad de grupos usando ANOVA de dos vías seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni (\*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01; \*\*\*, P < 0,001).

5

### Ejemplo 9: Identificación de peso corporal y masa grasa reducidos en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>*

Para identificar el papel de la acción de la autodigestión de células inmunitarias en la aparición de enfermedades metabólicas, se observaron el peso corporal y la acción en células dendríticas (*Atg7<sup>ACD11c</sup>*), células epiteliales del canal alimentario (*Atg7<sup>Avilin</sup>*) y macrófagos (*Atg7 $\Delta$ LysM*) de ratones con supresión génica condicional de *Atg7*. Se alimentó a los ratones con NCD (dieta de pienso normal). Posteriormente, se confirmó que la aumentó la diferencia en el peso corporal entre los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* y los ratones del grupo de control de su misma camada (*Atg7<sup>flox/flox(f/f)</sup>*) (FIG. 1A).

10

De manera importante, se confirmó que los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* de 24 semanas de edad tenían un peso corporal y una masa grasa muy baja en comparación con los ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (FIG 1, A y B). Se muestra un fenotipo delgado (*Atg7<sup>ACD11c</sup>*; FIG. 8) en machos y hembras.

15

En el análisis por IRM (imagen por resonancia magnética), se confirmó la notable reducción en los tejidos adiposos abdominales en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* en las direcciones tanto axial como coronal en comparación con los ratones compañeros de camada *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (Fig. 1C). Además, el tamaño de los adipocitos individuales del tejido adiposo visceral obtenido de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* fue significativamente pequeño en comparación con ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (Fig. 1D).

20

Para confirmar la implicación de la inflamación sistémica o mucosa en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* de un fenotipo delgado, se confirmó el nivel de citocinas proinflamatorias en suero y la expresión de ARNm de F4/80 y TNF $\alpha$  en el tejido adiposo visceral y se analizaron los tejidos del intestino delgado y el colon. Se confirmó que los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* mostraban niveles similares o reducidos de múltiples marcadores de inflamación sistémica y mucosa que indicaron que el fenotipo delgado de los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* no estaba relacionado con la inflamación (FIG. 9).

25

De manera importante, se identificaron mayores niveles de insulina y consecuentemente bajos niveles de glucosa en condiciones sin ayuno en el suero de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* en comparación con ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (FIG. 1E). Se confirmó que la resistencia a la insulina determinada mediante la GTT (prueba de tolerancia a la glucosa) y la ITT (prueba de tolerancia a la insulina) en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* en comparación con el grupo de *Atg7<sup>fl/fl</sup>* mejoró en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* en comparación con el grupo *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (FIG. 1F). En resumen, estos datos indican que los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* tienen una masa grasa reducida y una homeostasia reducida de la glucosa.

30

35

### Ejemplo 10: Identificación de bajos niveles de SCFA en las heces de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>*

Ya que los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* envejecidos tienen un peso corporal y una masa corporal reducidos, se confirmó la relevancia entre un fenotipo delgado y el uso de energía usando EC-TOF-EM (electroforesis capilar-espectrometría de masas de tiempo de vuelo) del ejemplo 4 y CG-EM (cromatografía de gases-espectrometría de masas) del ejemplo 5 en las heces.

40

Las gráficas individuales de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* en el OPLS-DA (análisis de discriminación ortogonal por mínimos cuadrados parciales) son claramente distintas respecto de ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (FIG. 10A).

45

Además, algunos SCFA, tales como acetato, butirato, propionato y lactato están ubicados en el punto distante del eje (FIG. 10B), lo que indica que estos factores contribuyen a distinguir ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* y *Atg7<sup>ACD11c</sup>*. En realidad, la cantidad de acetato, butirato y propionato en los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* estaba notablemente reducida en comparación con ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>*, mientras que la cantidad de lactato fue mayor (FIG. 10C).

50

### Ejemplo 11: Identificación de que las bacterias simbióticas están relacionadas con un fenotipo delgado de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* envejecidos

A fin de confirmar si un fenotipo delgado de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* está relacionado con bacterias simbióticas, se llevaron a cabo experimentos de alojamiento conjunto (CH) y de FMT (trasplante de microbiota fecal). Desde el nacimiento, los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* y *Atg7<sup>fl/fl</sup>* compartieron jaula y estuvieron expuestos a las heces.

55

Como resultado, los ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* que compartieron la jaula con *Atg7<sup>ACD11c</sup>*, perdieron más peso corporal y grasa en comparación con los ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (FIG. 2, A y B; FIG. 11). Además, Los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* que compartieron jaula con ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* tuvieron un aumento del peso corporal y de grasa en comparación con los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* (FIG. 2, A y B; FIG. 11). Para confirmar si el fenotipo de los ratones CH se debía a microorganismos simbióticos, se transfirió a los ratones a sus jaulas respectivas después de los experimentos de alojamiento conjunto. Como se muestra en la FIG. 2C, los ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* perdieron peso corporal cuando fueron criados solos, mientras que los ratones *Atg7<sup>fl/fl</sup>* no. Además, la administración oral del extracto fecal de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* a ratones B6 de tipo silvestre durante 12 semanas dio como resultado un peso corporal y una masa grasa significativamente menores que las heces de los ratones B6 de tipo silvestre o *Atg7<sup>fl/fl</sup>* (Fig. 2D). Además, notablemente, los ratones B6 de tipo silvestre a los que se

60

65

administró el extracto fecal de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* mostraron mayores niveles de insulina y niveles séricos de glucosa consiguientemente menores en comparación con los ratones a los que se administró el extracto de *Atg7<sup>fl</sup>* (Fig. 2E).

En resumen, estos resultados indican que desempeñan un papel esencial en el fenotipo delgado de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>*.

**Ejemplo 12: Expansión de *Bacteroides acidifaciens* (BA) en las heces de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>***

Se usó un análisis metagenómico para confirmar la diversidad y la composición de las bacterias simbióticas intestinales. En el análisis de pirosecuenciación, se confirmó que las heces de los ratones *Atg7<sup>fl</sup>* y *Atg7<sup>ACD11c</sup>* eran mutuamente similares en la distribución primaria de microorganismos intestinales en las relaciones de *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* y a nivel de filo (Fig. 3A). No hubo una diferencia similar o significativa en la distribución de *Bacteroidia* (clase), *Bacteroidales* (orden), *Bacteroidaceae* (familia) y *Bacteroides* (género) (Fig. 3B). Sin embargo, a nivel de especie, se confirmó que la relación de BA estaba significativamente extendida en las heces de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* en comparación con ratones *Atg7<sup>fl</sup>* ( $5,48 \pm 1,76$  % frente a  $0,77 \pm 0,18$  %) (FIG. 3C, flecha roja; FIG. 12 y 13).

Por otra parte, no hubo diferencias en la relación de las otras especies de *Bacteroides*, incluyendo *B.sartorii* en las heces de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* o *Atg7<sup>fl</sup>* (FIG. 13).

En la diversidad alfa, la abundancia de especies de los microorganismos fecales de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* (índice de *Chao* 1) se redujo notablemente, mientras que la biodiversidad (índice de *Shannon/Simpson*) fue similar a la de los microorganismos fecales de ratones *Atg7<sup>fl</sup>* (tabla 1 a continuación).

[Tabla]

	Chao1	Shannon	Recíproca de Simpson
<i>Atg7<sup>fl</sup></i>	932,13 ± 109,72	4,39 ± 0,43	0,04 ± 0,02
<i>Atg7<sup>ACD11c</sup></i>	<b>604,14±203,83*</b>	4,28 ± 0,28	0,04 ± 0,03

El análisis *FISH* (hibridación de fluorescencia *in situ*) se llevó a cabo para confirmar la expansión de BA en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* de un fenotipo delgado. Como se muestra en la FIG. 3D, el número de BA aumentado se detectó en la luz del colon y se confirmó que se internalizó una pequeña cantidad de BA en las células epiteliales del colon de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>*.

En resumen, estos resultados indican que, en las bacterias simbióticas, BA se había expandido en los intestinos de fenotipo delgado.

**Ejemplo 13: Identificación de que la administración oral de BA a ratones B6 a los que se suministra dieta rica en grasa (HFD) induce un fenotipo delgado**

Para confirmar sin el aumento de BA regula el metabolismo de los lípidos, se obtuvo BA (JCM10556) y se cultivó para obtener grandes cantidades de microorganismos, que se administraron a ratones B6 no tratados.

Para determinar las condiciones óptimas de administración, se cuantificaron los tejidos colónicos y BA en ratones a los que se administró BA ( $5 \times 10^9$ UFC/100  $\mu$ l) mediante análisis *FISH*. Un día después de la administración oral, se detectó un gran número de BA en las células epiteliales de la luz del colon (FIG. 14A).

Después de 2 días de administración oral, el número de BA en el pico de heces desapareció posteriormente y se recuperó rápidamente (FIG. 14B). Se confirmó que la administración oral de BA redujo el peso corporal y la masa grasa de ratones B6 de tipo silvestre a los que se alimentó con NCD y HFD sin efectos en la dieta (Fig. 4, A-C; Fig. 15, A-C). Por el contrario, no se observó pérdida de peso corporal en ratones a los que se administró *B. sartorii* como grupos de control (FIG. 16). Además, el tamaño de los adipocitos individuales en el tejido adiposo de la pared epididimaria fue significativamente menor en ratones B6 a los que se suministró BA y HFD en comparación con ratones a los que se suministró PBS y HFD (Fig. 4D). Además, la resistencia a la insulina determinada mediante la GTT y la ITT mejoró considerablemente en ratones a los que se suministró BA y HFD en comparación con ratones a los que se administró PBS y HFD (FIG. 4E).

Se empleó una técnica de pinzamiento hiperinsulinémico-normoglucémico usando BA inactivado por calor como grupo de control para confirmar el efecto del suministro de BA en el hígado y en la sensibilidad a la insulina periférica.

De manera interesante, el suministro de BA mejoró la sensibilidad a la insulina en el hígado y periférica (FIG. 17). Se confirmó que la administración oral de BA mostró una reducción en el butirato en las heces de ratones a los que se alimentó con NCD, pero se confirmó que los niveles de acetato, propionato y lactato no cambiaron (FIG. 18A). Se confirmó una tendencia similar en el grupo alimentado con HFD (FIG. 18B). Para medir el consumo de energía, la actividad y la utilización de sustrato, se monitorizó a los ratones a los que se proporcionó BA después de criarlos individualmente en una jaula CLAMS (un sistema de monitorización intensiva de animales de laboratorio) durante 5

días. Se confirmó que el grupo de ratones a los que se administró PBS o *BA* mostró una actividad locomotora y una relación de intercambio respiratorio similar, mientras que los ratones a los que se alimentó con *BA* y HFD consumieron más energía, en comparación con los ratones a los que se alimentó con PBS y HFD (FIG. 4F). Los ratones alimentados con NCD a los que se administró *BA* por vía oral mostraron un efecto similar (FIG. 15).

5 En resumen, la administración a largo plazo de *BA* induce el consumo de energía y por consiguiente, provoca un fenotipo delgado dominante en ratones con obesidad inducida por la dieta.

10 **Ejemplo 14: Identificación de que un ratón con fenotipo delgado muestra un aumento en la expresión de PPAR $\alpha$  (receptor  $\alpha$  activado por proliferador de peroxisomas) en tejidos adiposos**

Los niveles de expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en tejido adiposo, hígado e intestino delgado se analizaron basándose en la detección de un peso corporal y una masa grasa reducidas en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>*, FMT B6 y B6 a los que se administró *BA*. De manera importante, la expresión de genes relacionados con la  $\beta$ -oxidación de lípidos, en particular *PPAR $\alpha$* , aumenta únicamente en el tejido adiposo del epidídimo de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* (FIG. 5A). No pudo identificarse una diferencia significativa en el intestino delgado y el hígado (FIG. 19A y B). Para ser coherente con estos resultados, la expresión de *PPAR $\alpha$*  estaba regulada positivamente de manera significativa en el epidídimo de ratones B6 a los que se administró el extracto fecal de ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* y ratones alimentados con HFD y *BA* durante 10 semanas (FIG. 5, B y C).

20 Se midió el nivel de expresión de *PPAR $\alpha$*  en ratones B6 mediante la administración de *BA* mediante el método dependiente del tiempo para confirmar si el nivel de  $\beta$ -oxidación mejorado se activaba únicamente por la bacteria o no se activaba por el producto de un fenotipo delgado.

25 De manera interesante, el nivel de ARNm de *PPAR $\alpha$*  en el tejido adiposo epididimario de ratones B6 estaba significativamente aumentado después de 2 semanas de administración de *BA* (FIG. 5D).

Además, se midieron los niveles de expresión de *TGR5*, *GPBAR1* (receptor de ácidos biliares acoplado a proteína G), que pueden estimular el consumo de energía por medio de la actividad de *PPAR $\alpha$* .

30 Como resultado, se confirmó que la administración de *BA* aumentó el nivel de expresión de *TGR5* en tejido adiposo (FIG. 5E). Estos resultados indican que un fenotipo delgado causado por *BA* inicia la oxidación de grasas en tejido adiposo según la actividad de *TGR5-PPAR $\alpha$* .

35 **Ejemplo 15: Identificación de que *BA* media la producción de GLP-1 (péptido-1 similar a glucagón) mediante la regulación de DPP4 (dipeptidil peptidasa-4) y la producción de ácidos biliares**

Se confirmó el papel de *BA* en la homeostasia de la glucosa. Como cabía esperar, los ratones B6 a los que se administró *BA* mostraron mayores niveles de insulina y menores niveles de glucosa en el suero que los ratones B6 a los que se administró PBS (FIG. 6A).

Para confirmar si el aumento en los niveles plasmáticos de insulina se debía a la sobreestimulación de células  $\beta$ , se tiñeron las células  $\alpha$  y  $\beta$  en el tejido pancreático 10 semanas después del suministro de *BA*.

45 Como resultado, se confirmó que el suministro de *BA* no indujo hipersensibilidad de las células  $\beta$  (FIG. 20).

Para confirmar el mecanismo de los elevados niveles de secreción de insulina en ratones delgados a los que se administró *BA*, se midieron los niveles de GLP-1 que estimulan la liberación de insulina en la sangre.

50 Los niveles de GLP-1 en suero aumentaron notablemente en ratones alimentados con NCD y HFD (FIG. 6B).

Se confirmó que el nivel de DPP-4, una enzima bien conocida con actividad inhibitora de GLP-1, se redujo en el intestino delgado y el íleon después de la administración oral de *BA* o su sobrenadante de cultivo (FIG. 6C).

55 Además, se midió la actividad de DPP-4, reflejando la cantidad de proteína. Estudios previos han demostrado que los jugos biliares desempeñan un papel clave en la homeostasia de la glucosa mediante la estimulación de la secreción de GLP-1 mediante la actividad de *TGR5*.

60 Como resultado, se confirmó un nivel significativamente aumentado de colato, sal de ácido cólico y taurina desconjugados del ácido biliar primario en las heces de ratones B6 a los que se administró *BA* durante 10 semanas, pero no pudo confirmarse una pérdida significativa de colesterol (FIG. 6D; FIG. 21). Estos resultados indican que *BA* o sus metabolitos reducen la actividad de la enzima DPP-4 y por consiguiente, provocan la actividad de GLP-1, mejorando de este modo la sensibilidad a la insulina y la resistencia a la glucosa.

65 En resumen, los presentes inventores han confirmado que las bacterias simbióticas intestinales específicas (es decir, *BA*) se encuentran extendidas en ratones *Atg7<sup>ACD11c</sup>* con fenotipo delgado. La administración de *BA* da como resultado

la activación de la oxidación de grasas a través del eje de ácido biliar-TGR5-PPAR $\alpha$  en el tejido adiposo, dando como resultado un alto consumo de energía.

5 Al mismo tiempo, BA activa la DPP-4 visceral, seguido de un aumento de GLP-1, contribuyendo de este modo a la homeostasis de la glucosa. Los ácidos biliares, el colato y la taurina contribuyen a la actividad de GLP-1 a través de un receptor TGR5 y mejoran la sensibilidad a la insulina.

10 Por consiguiente, puede entenderse que BA desempeña un papel importante en la prevención o el tratamiento de enfermedades metabólicas, tales como la diabetes y la obesidad (FIG. 7).

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en un método para prevenir o tratar enfermedades metabólicas, comprendiendo la composición farmacéutica *Bacteroides acidifaciens* como principio activo.
- 10 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las enfermedades metabólicas son de uno o más tipos seleccionados entre el grupo que consiste en obesidad, diabetes, complicaciones diabéticas, esteatosis hepática, hipertensión, vasculopatía periférica, dislipidemia, resistencia a la insulina, enfermedad cardiovascular, arterioesclerosis, síndrome metabólico, hiperglucemia, hiperlipidemia y anomalía metabólica de carbohidratos.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el *Bacteroides acidifaciens* tiene una mayor relación de bacterias intestinales totales en un fenotipo delgado en comparación con obesidad o un fenotipo convencional.
- 20 4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el *Bacteroides acidifaciens* activa la oxidación de grasas en tejido adiposo, inhibe la actividad de DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4) intestinal y aumenta GLP-1.
- 25 5. Una composición para su uso en un método para promover la oxidación de grasas, comprendiendo la composición *Bacteroides acidifaciens* como principio activo.
- 30 6. Una composición para su uso en un método para regular la glucosa en sangre, comprendiendo la composición *Bacteroides acidifaciens* como principio activo.
- 35 7. Una composición para su uso en un método para inhibir la DPP-4 (dipeptidil peptidasa-4), comprendiendo la composición *Bacteroides acidifaciens* como principio activo.
8. Una composición alimentaria para su uso en un método para mejorar o prevenir enfermedades metabólicas, comprendiendo la composición alimentaria *Bacteroides acidifaciens* como principio activo.
9. *Bacteroides acidifaciens* para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades metabólicas.
10. *Bacteroides acidifaciens* para su uso en la promoción terapéutica de la oxidación de grasas o la regulación de la glucosa en sangre.