

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 471**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23L 33/21 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014** **PCT/IB2014/064285**
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015** **WO15033305**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014** **E 14790323 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020** **EP 3041489**

54 Título: **Uso de una composición que comprende microorganismos para aumentar la producción intestinal de ácido butírico, ácido fólico o niacina y/o disminuir la producción intestinal de ácido succínico**

30 Prioridad:

06.09.2013 IT MI20131467

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2021

73 Titular/es:

SOFAR SPA (100.0%)
Via Firenze 40
20060 Trezzano Rosa (MI), IT

72 Inventor/es:

BIFFI, ANDREA;
ROSSI, RUGGERO;
FIORE, WALTER y
GUGLIELMETTI, SIMONE DOMENICO

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 805 471 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de una composición que comprende microorganismos para aumentar la producción intestinal de ácido butírico, ácido fólico o niacina y/o disminuir la producción intestinal de ácido succínico

La presente divulgación se refiere al uso de una composición que comprende bacterias con el fin de aumentar la producción intestinal de ácido butírico, ácido fólico o niacina y/o disminuir la producción intestinal de ácido succínico. Además, la presente divulgación se refiere al uso de dicha composición para el tratamiento y/o la prevención de un proceso patológico intestinal dependiente de butirato y/o succinato, en particular, para el tratamiento y/o la prevención de inflamación intestinal, diarrea, colitis ulcerosa o colopatías intestinales.

La microbiota intestinal, también conocida por el término ya obsoleto flora intestinal, es el conjunto de los microorganismos, que consiste predominantemente en bacterias que residen en el intestino y en simbiosis con el organismo del huésped.

La microbiota intestinal es un ecosistema altamente complejo, y la condición de equilibrio entre los diferentes microorganismos que componen el intestino es fundamental con el fin de garantizar la salud y el bienestar del organismo, dado que la microbiota condiciona significativamente el desarrollo y la homeostasis de la mucosa intestinal del individuo huésped.

Dicho de otro modo, la microbiota intestinal representa un verdadero órgano. De hecho, modificaciones cualitativas y/o cuantitativas en la microbiota intestinal de un individuo, o la denominada disbiosis o dismicrobismo, puede dar como resultado la pérdida de la homeostasis intestinal, que a su vez puede condicionar la etiopatogénesis de un gran número de patologías.

Con el fin de tratar un estado de disbiosis intestinal o, en cualquier caso, con el fin de mantener la homeostasis de la microbiota intestinal, las personas a menudo toman sustancias que se definen como probióticos o, según la definición de la FAO/OMS, "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud en el huésped". De manera similar, la eficacia de los paraprobióticos para la salud también se ha demostrado; estos se definen como "células microbianas no viables (intactas o no) o extractos celulares en bruto que, cuando se administran en cantidades adecuadas (por vía oral o tópica), confieren un beneficio de salud en el huésped" (Taverniti y Guglielmetti, 2011).

Resulta claro que las actividades beneficiosas de un microorganismo variarán dependiendo de la composición del mismo y, de hecho, estas son a menudo actividades específicas de la cepa.

Basándose en las consideraciones anteriores, sigue existiendo una fuerte necesidad de determinar posibles nuevos efectos terapéuticos y/o que fomentan la salud de microorganismos, en particular aquellos incluidos en un probiótico o en un paraprobiótico, con el fin de ampliar las aplicaciones de uso.

Por ejemplo, sigue existiendo una fuerte necesidad en la técnica de identificar microorganismos capaces de modular la cantidad de sustancias en el intestino que sean particularmente beneficiosas y terapéuticas para el organismo, tales como ácido butírico, ácido fólico y ácido nicotínico.

El ácido butírico es un ácido graso de cadena corta que se forma fisiológicamente en el colon de humanos como resultado de la fermentación de fibra vegetal por la microbiota.

El ácido butírico es la principal fuente de energía para las células del colon (colonocitos) y, por tanto, es un nutriente que es esencial para el organismo humano.

A nivel intestinal, el ácido butírico realiza diversas funciones importantes, por ejemplo: estimula la renovación y la maduración fisiológica de los colonocitos; desempeña un papel clave en el mantenimiento de la integridad de la mucosa y en procesos de reparación de lesiones intestinales; estimula la reabsorción de agua y sodio en el colon; y contribuye a reducir el pH intestinal, creando un entorno que es desfavorable para el desarrollo de bacterias patógenas.

Una deficiencia de ácido butírico puede provocar colitis inflamatoria en humanos.

El ácido succínico es, del mismo modo, un ácido orgánico de cadena corta, del tipo bicarboxílico. Se considera ulcerógeno y puede provocar un daño grave a la mucosa. Por tanto, un aumento de la cantidad de ácido succínico (succinato) es perjudicial para la salud humana.

El ácido fólico (vitamina B9 o M o folacina) es una vitamina muy importante para toda la población, en particular en adultos mayores de 50 años de edad y en mujeres en edad de procrear, ya que interviene (directamente, o la mayoría del tiempo, disminuyendo los niveles en plasma de homocisteína) en muchos procesos vitales tales como la síntesis, reparación y metilación del ADN.

Una deficiencia de ácido fólico puede conducir a anemia macrocítica, que puede estar acompañada por leucocitopenia y trombocitopenia, alteraciones de la piel y la mucosa y trastornos gastrointestinales (absorción insuficiente y diarrea).

5 La niacina (o vitamina PP o vitamina B3), es decir, ácido nicotínico y nicotinamida, es importante porque, entre otras cosas, es el componente esencial de las coenzimas NAD y NADH, y una deficiencia de la misma provoca una patología conocida como pelagra. En general, esta patología comienza con problemas en el aparato digestivo, que luego se agravan por una dermatitis por fotosensibilización, trastornos mentales con cansancio, depresión y trastornos de la memoria.

10 La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La presente divulgación responde a las necesidades de la técnica anterior descrita anteriormente con una composición que comprende microorganismos, preferiblemente bacterias del género especie *Lactobacillus paracasei*, capaz de aumentar (directa y/o indirectamente), en un individuo que la toma, la producción intestinal de ácido butírico, ácido fólico, niacina y/o sales de los mismos.

Además, el solicitante ha descubierto, de manera completamente inesperada, que una composición que comprende microorganismos, preferiblemente del género *Lactobacillus* especie *paracasei*, es capaz de disminuir (directa y/o indirectamente) la producción intestinal de ácido succínico y/o sales del mismo.

20 Por tanto, la composición de la presente divulgación es particularmente ventajosa para el tratamiento y/o la prevención de procesos patológicos intestinales dependientes de butirato y/o succinato.

25 Ventajas adicionales de la presente invención serán más evidentes a partir de la descripción detallada que sigue y a partir de los ejemplos que, sin embargo, sólo tienen un fin no limitativo de demostración.

Para permitir una mejor comprensión de la descripción detallada, se han adjuntado las figuras 1-4 a la misma:

30 - la figura 1.1 muestra el resultado del análisis estadístico que demuestra el aumento en la población de bacterias del género *Coprococcus* antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención (A) y, por el contrario, la disminución de la misma antes y después del tratamiento con el placebo (B);

35 - la figura 1.2 muestra el resultado del análisis estadístico que demuestra la disminución en la población de bacterias del género *Blautia* antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención (A) y, por el contrario, el aumento de la misma antes y después del tratamiento con el placebo (B);

40 - la figura 2.1 muestra el aumento en la población de bacterias del género *Coprococcus* (gris oscuro) y la disminución en la población de bacterias del género *Blautia* (gris claro) antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención;

45 - la figura 2.2 muestra el aumento en porcentaje en la población de bacterias del género *Coprococcus* (gris oscuro) y la disminución en porcentaje en la población de bacterias del género *Blautia* (gris claro) antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención (A) y la disminución en porcentaje en la población de bacterias del género *Coprococcus* (gris oscuro) y el aumento en porcentaje en la población de bacterias del género *Blautia* (gris claro) antes y después del tratamiento con el placebo (B);

50 - la figura 3 muestra el resultado del análisis estadístico que demuestra el aumento en el metabolismo de ácido nicotínico antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención y la disminución del mismo antes y después del tratamiento con el placebo;

- la figura 4 muestra el resultado del análisis estadístico que demuestra el aumento en la biosíntesis de ácido fólico antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención y, por el contrario, una ausencia de cualesquiera modificaciones antes y después del tratamiento con el placebo.

55 La presente divulgación se refiere al uso de una composición que comprende microorganismos, preferiblemente al menos una bacteria del género *Lactobacillus* especie *paracasei*, para aumentar la producción intestinal directa y/o indirecta de ácido butírico y/o sales del mismo, y/o ácido fólico y/o sales del mismo, y/o niacina y/o sales de la misma, y/o disminuir la producción intestinal directa y/o indirecta de ácido succínico y/o sales del mismo.

60 En el contexto de la presente invención, producción intestinal significa la liberación, en el entorno, de cualquier molécula producida mediante el metabolismo primario o secundario por cualquier microorganismo intestinal en cualquier región del intestino.

65 Además, la composición de la presente invención también puede usarse para reducir la proliferación intestinal de microorganismos patógenos, y/o fomentar la integridad de la mucosa intestinal, y/o fomentar los procesos de reparación de lesiones intestinales, preferiblemente aumentando la producción intestinal directa y/o indirecta de ácido

butírico y/o sales del mismo, y/o disminuyendo la producción intestinal directa y/o indirecta de ácido succínico y/o sales del mismo.

5 Algunos microorganismos patógenos particularmente sensibles a la composición de la presente invención son, por ejemplo, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.*

10 Los usos descritos anteriormente de la composición de la presente invención están destinados tanto a un individuo sano como a un individuo con un proceso patológico intestinal. En particular, en el caso de un individuo sano, la composición de la invención realiza en ese individuo, tras su ingesta, una acción de mantenimiento de la homeostasis de la microbiota y/o de prevención de una alteración de la misma y, por tanto, también puede definirse como una composición probiótica (o probiótico).

15 Un aspecto adicional de la presente divulgación se refiere al uso médico de la composición que comprende microorganismos, preferiblemente al menos una bacteria del género *Lactobacillus* especie *paracasei*, para el tratamiento y/o la prevención de un proceso patológico intestinal dependiente de butirato y/o succinato.

20 En el contexto de la presente invención, proceso patológico intestinal dependiente de butirato y/o succinato significa un proceso patológico que es sensible al tratamiento con ácido butírico y/o sales del mismo y/o al tratamiento con ácido succínico y/o sales del mismo. Los ejemplos de dichas patologías son: diarrea, inflamación intestinal, colitis ulcerosa, atrofia gástrica, divertículos intestinales, estenosis, obstrucciones y neuropatía diabética.

25 En una realización particularmente preferida de la presente invención, la composición comprende la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* DG.

La cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* DG se depositó por SOFAR S.p.A. ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur en París el 05/05/1995, con el número de depósito CNCM I-1572. Inicialmente, el nombre de la cepa depositada era *Lactobacillus casei* DG *sub.casei*.

30 En una realización adicional de la divulgación, el aumento directo y/o indirecto en la producción intestinal de ácido butírico y/o sales del mismo, y/o de ácido fólico y/o sales del mismo, y/o de niacina y/o sales de la misma, y/o la disminución directa y/o indirecta en la producción intestinal de ácido succínico es atribuible a la microbiota intestinal, preferiblemente bacterias del género *Coprococcus* y/o *Blautia*.

35 En la realización particularmente preferida de la divulgación, el aumento directo y/o indirecto en la producción intestinal de ácido butírico y/o sales del mismo es atribuible a bacterias del género *Coprococcus*, y/o la disminución directa y/o indirecta en la producción intestinal de ácido succínico es atribuible a bacterias del género *Blautia*.

40 Por tanto, la composición que comprende microorganismos, preferiblemente al menos una bacteria del género *Lactobacillus* especie *paracasei*, más preferiblemente la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* DG, también puede usarse para modificar la densidad de la población bacteriana del género *Coprococcus* y/o *Blautia* en la microbiota intestinal, preferiblemente para inducir un aumento en la población bacteriana del género *Coprococcus* y/o una disminución en la población bacteriana del género *Blautia*. Dicho de otro modo, la ingesta de la composición de la presente divulgación modifica la cantidad de bacterias del género *Coprococcus* y/o *Blautia* dentro de la microbiota intestinal. En particular, las bacterias del género *Coprococcus* aumentan y/o las bacterias del género *Blautia* disminuyen tras la ingesta de dicha composición.

45 La composición usada en la presente invención comprende dicho microorganismo, preferiblemente dicha al menos una bacteria del género *Lactobacillus* especie *paracasei*, en forma viva o muerta, como un lisado o extracto.

50 En una realización de la invención, la composición comprende aproximadamente 15-30 mil millones de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias, preferiblemente 20-25 mil millones de UFC de bacterias.

55 Preferiblemente, la composición se formula para administración oral. En particular, la composición se formula en forma sólida, preferiblemente en forma de pastillas, cápsulas, comprimidos, polvo granular, cápsulas duras, gránulos solubles en agua, sobres o microgránulos.

60 Alternativamente, la composición de la invención se formula en forma líquida, por ejemplo, como un jarabe o una bebida, o se añade a un alimento, por ejemplo, a un yogur, queso o zumo de frutas.

Alternativamente, la composición de la invención se formula en una forma capaz de ejercer una acción de manera tópica, por ejemplo, como un enema.

65 En una realización de la invención, la composición comprende además excipientes aceptados, en general, para la producción de productos probióticos y/o farmacéuticos.

En una realización adicional de la invención, la composición de la invención puede enriquecerse con vitaminas, oligoelementos tales como zinc y selenio, enzimas, sustancias prebióticas tales como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), inulina, goma guar, o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, para los fines de los usos de la presente invención, la composición se toma una vez al día, más preferiblemente después de despertarse.

Alternativamente, también puede tomarse por la tarde-noche, preferiblemente después de las comidas.

Ejemplo

Tratamiento.

Se llevó a cabo un estudio aleatorio, doblemente enmascarado, controlado con placebo, con grupos cruzados de intervención alimentaria en individuos sanos.

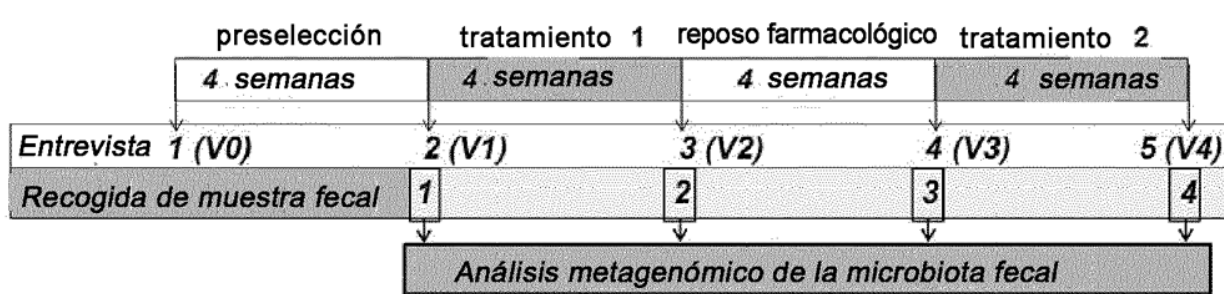
Los voluntarios se seleccionaron según los siguientes criterios:

- criterios de inclusión: hombres y mujeres sanos, con edades comprendidas entre 18 y 55 años que dieron su consentimiento informado;

- criterios de exclusión: tratamiento con antibióticos en el mes anterior al primer examen; episodios de enteritis viral o bacteriana en los 2 meses anteriores al primer examen; úlceras gástricas o duodenales en los 5 años anteriores al primer examen; embarazo o lactancia; casos recientes o presuntos de alcoholismo y consumo de drogas; otras condiciones de incumplimiento con el protocolo del estudio.

- La intervención alimentaria con probióticos se llevó a cabo según un diseño de grupos cruzados, tal como se representa esquemáticamente en la tabla I a continuación.

Tabla I



En la fase previa a la inclusión (4 semanas), los voluntarios siguieron su dieta habitual, sin consumir productos lácteos fermentados probióticos (por tanto, se permitió el yogur tradicional), suplementos alimenticios probióticos o suplementos alimenticios prebióticos.

Al final del periodo previo a la inclusión, los voluntarios se aleatorizaron para recibir una cápsula al día de un probiótico o placebo durante 4 semanas.

A modo de ejemplo, se usó Enterolactis Plus como probiótico que iba a administrarse; consiste en cápsulas de 420 mg que contienen 24 mil millones de UFC (unidades formadoras de colonias) de la cepa de *Lactobacillus paracasei* DG.

El placebo consistió en cápsulas idénticas en aspecto a las del probiótico, obviamente desprovistas del agente probiótico.

El sabor y el color del principio activo (es decir, el probiótico) y el placebo eran idénticos.

El producto se tomó por la mañana en ayunas, al menos diez minutos antes del desayuno o, si se olvida, por la tarde-noche antes de irse a dormir y, en cualquier caso, al menos dos horas después de la última comida.

Después de las primeras cuatro semanas de tratamiento, los voluntarios pasaron por un periodo de reposo farmacológico de cuatro semanas idéntico al periodo previo a la inclusión.

Al final del periodo de reposo farmacológico, los voluntarios tomaron una cápsula al día de Enterolactis Plus o placebo durante cuatro semanas según el diseño de grupos cruzados descrito anteriormente.

En resumen, el estudio incluyó 4 fases, cada una de las cuales duró 4 semanas:

- *Fase de preselección*: los individuos no se sometieron ni al tratamiento A ni al tratamiento B.
- *Tratamiento 1*: los individuos se sometieron al tratamiento A o al tratamiento B.
- *Reposo farmacológico*: los individuos no se sometieron ni al tratamiento A ni al tratamiento B.
- *Tratamiento 2*: los individuos se sometieron al tratamiento B o al tratamiento A.

Los tratamientos A y B pueden ser la composición de la presente invención, en el ejemplo específico Enterolactis plus, o bien el placebo. Al inicio del tratamiento, no se sabía qué estaba tomando el individuo; sólo al final del tratamiento, cuando se desenmascaró, se supo la secuencia de ingesta.

Exámenes y recogida de muestras.

Inicialmente, cada voluntario recibió instrucciones sobre el procedimiento completo a seguir, que incluyó un total de 5 visitas por voluntario.

Durante la primera visita, se obtuvo el consentimiento informado junto con los datos personales del voluntario. El voluntario también recibió información general sobre cómo iba a llevarse a cabo el estudio y recibió instrucciones sobre los cambios en la dieta que se iban a aplicar en las 4 semanas posteriores previas a la inclusión (prohibición de consumo de los productos especificados previamente).

Después de 4 semanas, el voluntario acudió a la segunda visita con una muestra fecal (muestra T0), recogida durante las 24 horas anteriores en un recipiente especial entregado durante la primera visita.

Para garantizar la óptima conservación, las muestras fecales se almacenaron a temperatura ambiente y se entregaron al laboratorio en un plazo de 24 horas.

Además, durante la segunda visita, se le dio al voluntario el producto probiótico (o placebo) que iba a tomarse durante las siguientes 4 semanas. Además, el voluntario recibió instrucciones de cómo tomar el producto.

Al final de las 4 semanas tomando el producto (o placebo), el voluntario acudió a la tercera visita con otra muestra fecal (muestra T1) recogida durante las 24 horas anteriores.

Durante la tercera visita, el voluntario completó un cuestionario sobre los posibles efectos, tanto positivos como indeseables, derivados del consumo del producto.

Después, el voluntario recibió instrucciones sobre las siguientes 4 semanas, durante las que, de nuevo, no tomó los productos mencionados previamente.

Al final de estas 4 semanas, el voluntario acudió a la cuarta visita con una muestra fecal (muestra T2) y recibió el producto probiótico (o placebo) que iba a tomarse durante las siguientes 4 semanas.

Finalmente, después de 4 semanas tomando el producto (o placebo), el voluntario acudió a la quinta visita para entregar la última muestra fecal (muestra T3).

Durante esta última visita, el voluntario ha completado un cuestionario análogo al recibido durante la tercera visita.

Todas las muestras fecales recogidas se almacenaron a -20°C durante no más de 7 días antes de someterse al análisis de la microbiota.

Análisis de la microbiota fecal

La microbiota fecal se evaluó analizando la secuencia de nucleótidos de porciones del gen que codifica para la subunidad ribosómica bacteriana ARNr 16S. Más específicamente, se adoptó una estrategia metagenómica; en resumen, consiste en las siguientes etapas:

1. extraer, cuantificar y normalizar el ADN metagenómico de las muestras fecales;
2. amplificar la región hipervariable V3 del gen bacteriano que codifica para el ARNr 16S mediante PCR;
3. cuantificar los productos de PCR;
4. secuenciar los productos de amplificación;

5. analizar de manera bioinformática las secuencias.

Los procedimientos según las etapas 1 y 3 son técnicas que se conocen bien en la técnica y, por tanto, se realizan con los protocolos usados comúnmente en este campo. Por ejemplo, los métodos descritos en manuales de laboratorio tales como aquellos de Sambrook *et al.*, 2001 o Ausubel *et al.*, 1994.

La etapa 2 de amplificar la región V3 de los genes del ARN ribosómico 16S se realizó por medio de la técnica de amplificación de ADN conocida como PCR, usando Probio_Uni 5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 1) y Probio_Rev 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3' (SEQ ID NO: 2) como oligonucleótidos (cebadores).

En particular, el par de cebadores de SEQ ID NO: 1 y 2 amplifica la región V3 del gen de ARNr 16S.

La etapa 4 puede realizarse con las técnicas conocidas en la técnica para este fin, por ejemplo, técnicas basadas en el método de Sanger, pirosecuenciación o el método de secuenciación de cebadores de fusión de Ion Torrent usado en el ejemplo específico de la presente invención según el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos del artículo científico de Milani *et al.* (2013).

En el caso de la técnica de Ion Torrent, los cebadores se diseñan y sintetizan de tal modo que incluyan, en el extremo 5', una de las dos secuencias adaptadoras usadas en la técnica de secuenciación de ADN específica. En este caso, las secuencias adaptadoras fueron SEQ ID NO: 1 y 2.

Las condiciones en las que se realizó la PCR son las siguientes:

- 5 minutos a 95°C;
- 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 90 segundos a 72°C durante 35 ciclos;
- 10 minutos a 72°C.

Al final de la PCR, se verificó la integridad del producto amplificado mediante electroforesis.

La etapa 5 del método, necesaria para caracterizar las poblaciones microbianas, puede llevarse a cabo con numerosas técnicas que se conocen actualmente para este fin. Más específicamente, se hizo uso de: agrupamiento jerárquico, análisis taxonómico y construcción de dendrogramas filogenéticos con matrices cromáticas según el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos del artículo científico de Milani *et al.* (2013); más específicamente, el análisis de los datos de secuencia se llevó a cabo usando el software QIIME.

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software STATISTICA (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EE.UU.).

Con el fin de revelar diferencias significativas, los datos se analizaron usando métodos estadísticos tanto paramétricos (ANOVA multivariante y univariante con medidas repetidas) como no paramétricos (Wald-Wolfowitz y Mann-Whitney).

La normalidad de las series de datos (suposición importante para ANOVA) se evaluó por medio de las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov.

Resultados del tratamiento

Un total de 22 individuos completaron el estudio (11 mujeres y 11 hombres).

Inicialmente, se incluyeron treinta y tres individuos, pero 11 de ellos abandonaron pronto por diversos motivos: ingesta de antibióticos (4), negativa a continuar el estudio (1), episodios frecuentes de diarrea (1), ingesta de otros probióticos durante el periodo de estudio (3), cambio drástico en los hábitos alimenticios (1) y gripe estacional con episodios de diarrea (1).

Tras finalizar el estudio y completar el análisis de los resultados de los dos tratamientos, se desenmascaró y se observó que: el tratamiento A es el tratamiento activo, que contiene *Lactobacillus paracasei* DG; el tratamiento B es el placebo, idéntico en el exterior al tratamiento activo, pero desprovisto de *Lactobacillus*.

Cuando se analizaron los datos obtenidos del estudio, se observó una alta estabilidad, desde el punto de vista taxonómico, de la microbiota intestinal de los participantes del estudio.

De hecho, se descubrió que:

• Dos divisiones bacterianas de las 15 identificadas, concretamente, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, constituyen alrededor del 90% de las secuencias;

• 11 familias de las 131 identificadas constituyen alrededor del 90% de las secuencias; y

• 20 géneros de los 262 identificados constituyen alrededor del 90% de las secuencias.

Además, este estudio confirmó que la microbiota intestinal humana en los niveles taxonómicos más bajos (es decir, en los niveles de familia y género) es altamente variable de un individuo a otro.

Por tanto, las evidencias experimentales demostraron la necesidad de llevar a cabo, en una población sana, ensayos de intervención con grupos cruzados con el fin de evitar que la notable variabilidad entre individuos oculte los posibles efectos del tratamiento con probióticos o conduzca a falsos positivos estadísticos.

Cuando se evaluaron las modificaciones inducidas en la microbiota intestinal por los dos tratamientos, surgió una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a géneros sólo en el grupo que recibió el tratamiento con *Lactobacillus paracasei* DG (tratamiento activo). Más específicamente, se observó un aumento en el género *Coprococcus*. De hecho, tal como puede observarse en las figuras 1.1, 2.1 y 2.2, antes y después del tratamiento con *Lactobacillus paracasei* DG se observó un aumento estadísticamente significativo en *Coprococcus*. Por el contrario, se observó una reducción moderada de las mismas en el grupo que recibió el tratamiento con placebo.

Además, después del tratamiento con *Lactobacillus paracasei* DG, se observó una reducción estadísticamente significativa en las bacterias del género *Blautia*. Por el contrario, se observó un ligero aumento de las mismas en el grupo que recibió el tratamiento con placebo (figuras 1.2, 2.1 y 2.2)

Coprococcus se encuentra entre los principales productores de butirato a nivel intestinal.

El butirato es un compuesto fundamental a nivel intestinal, dado que, por un lado, contribuye a restaurar la integridad funcional de la mucosa intestinal y a mantenerla a lo largo del tiempo y, por otro lado, tiene efectos antiinflamatorios importantes, tanto que se usa como adyuvante para tratamientos alimentarios para colopatías intestinales (por ejemplo, enfermedades inflamatorias crónicas del intestino).

Además, un análisis de su genoma revela que estas bacterias pueden usar succinato como sustrato de fermentación.

Esta información es fundamental, teniendo en cuenta el hecho de que los miembros del género *Blautia* generan acetato y succinato como principales productos finales de la fermentación de glucosa.

El succinato se considera un factor ulcerógeno, capaz, por tanto, de exacerbar el estado de individuos con colitis ulcerosa, ya que probablemente sea el responsable del daño de la mucosa presente sobre todo en las fases activas de la enfermedad.

En conclusión, después del tratamiento con un probiótico, en este caso después de la administración de *Lactobacillus paracasei* DG, se observa un aumento en las bacterias pertenecientes al género *Coprococcus* y, por tanto, un aumento en la concentración de butirato en el intestino.

Al mismo tiempo, se observa una reducción en la concentración de succinato, que puede ser el responsable del daño de la mucosa en individuos con colitis ulcerosa, de manera directa, ya que después del tratamiento con el probiótico, en este caso después de la administración de *Lactobacillus paracasei* DG, se produce una reducción en las bacterias pertenecientes al género *Blautia* y, de manera indirecta, ya que el aumento de la población de *Coprococcus* es capaz de disminuir adicionalmente la concentración de succinato usándolo como sustrato en su proceso de fermentación.

En conclusión, después del tratamiento con el probiótico, en el ejemplo específico después de la administración de *Lactobacillus paracasei* DG, se produce un aumento de la concentración de ácido butírico en las heces de los individuos, con una reducción simultánea de otros ácidos orgánicos, tales como ácido succínico.

Los datos relacionados con la composición de microbiota fecal se usaron, finalmente, en un análisis bioinformático dirigido a una reconstrucción virtual del metagenoma basándose en el conocimiento de los genomas bacterianos (Okuda S, Tsuchiya Y, Kiriya C, Itoh M, Morisaki H. Virtual metagenome reconstruction from 16S rRNA gene sequences. Nat Commun. 2012; 3:1203); dicho de otro modo, se estableció *in silico* qué genes potenciales están presentes y cómo de abundantes en una microbiota dada. Este análisis permitió verificar un supuesto aumento en los genes codificantes para la síntesis de ácido fólico y el metabolismo de ácido nicotínico (figuras 3 y 4). Estas dos moléculas representan vitaminas importantes para el huésped humano (denominadas respectivamente vitamina B9 y B3). La vitamina B9, en particular, representa un factor nutricional de importancia primaria, cuya deficiencia, especialmente en estados fisiológicos específicos tales como el embarazo, puede conducir a consecuencias de salud graves. Por tanto, el tratamiento con el probiótico usado en este estudio pudo favorecer la capacidad de la microbiota intestinal de producir ácido fólico (vitamina B9), con el consiguiente beneficio nutricional para el huésped humano.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* DG depositada ante la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur en París el 05/05/1995, con el número de depósito CNCM 1-1572, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de procesos patológicos intestinales dependientes de butirato y/o succinato.
- 10 2. Composición que comprende la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* DG para su uso según la reivindicación 1.
3. Composición para su uso según la reivindicación 2, en la que dicho proceso patológico intestinal se selecciona de: diarrea, inflamación intestinal, colitis ulcerosa, atrofia gástrica, divertículos intestinales, estenosis, obstrucciones y neuropatía diabética.
- 15 4. Composición para su uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* DG es una bacteria viva o muerta, o un lisado o extracto bacteriano.
- 20 5. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, que comprende 15-30 mil millones de UFC, preferiblemente 20-25 mil millones de UFC de la cepa bacteriana de *Lactobacillus paracasei* DG.
6. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, para administración oral, preferiblemente en forma de pastillas, cápsulas, comprimidos, polvo granular, cápsulas duras, gránulos solubles en agua, sobres o microgránulos.
- 25 7. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-54, formulada en forma líquida, preferiblemente como un jarabe o una bebida, o que se añade a un alimento, preferiblemente a un yogur, queso o zumo de frutas.
- 30 8. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en una forma capaz de ejercer una acción de manera tópica, preferiblemente como un enema.
- 35 9. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, que comprende además fibras vegetales que tiene actividad prebiótica, preferiblemente FOS, inulina o goma guar, o que comprende otras sustancias tales como vitaminas, oligoelementos y/o enzimas.

Coprococcus ssp.

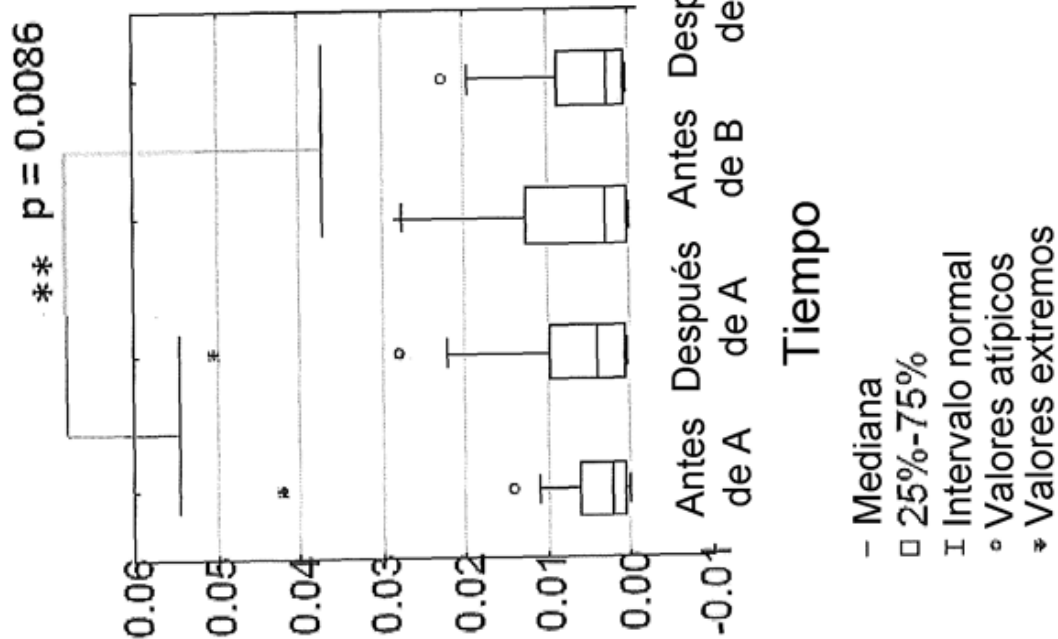
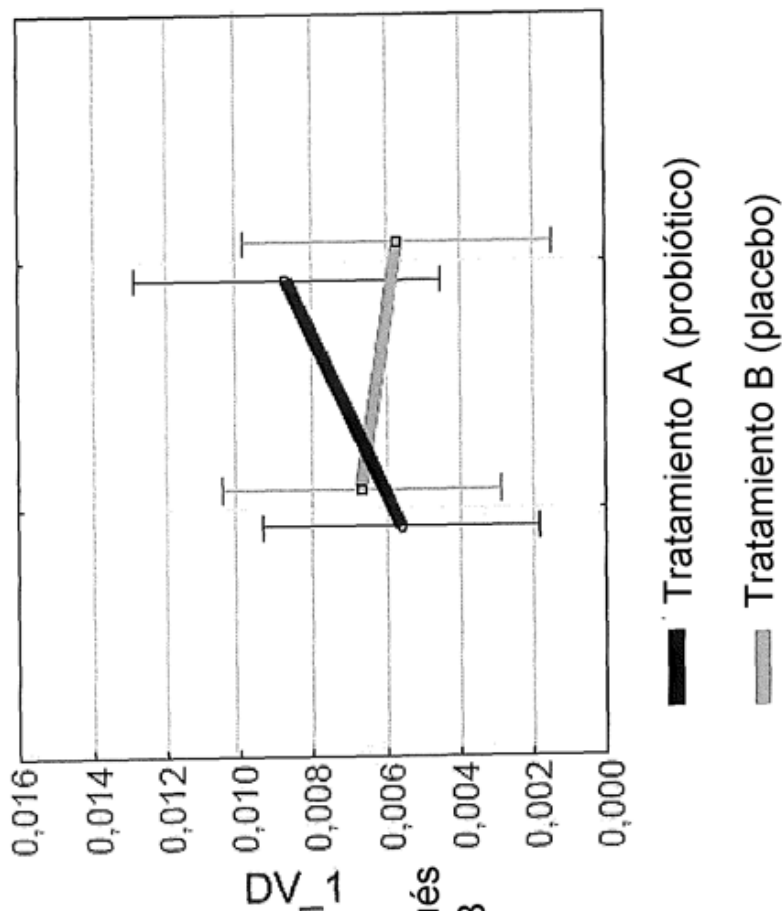


Fig.1.1

Tratamiento*tiempo ; medias no ponderadas
 Efecto real: $F(1, 42)=7.6014, p=0.00859$
 Descomposición de hipótesis eficaz
 Las barras verticales indican intervalos de confianza de 0,95



Blautia ssp.

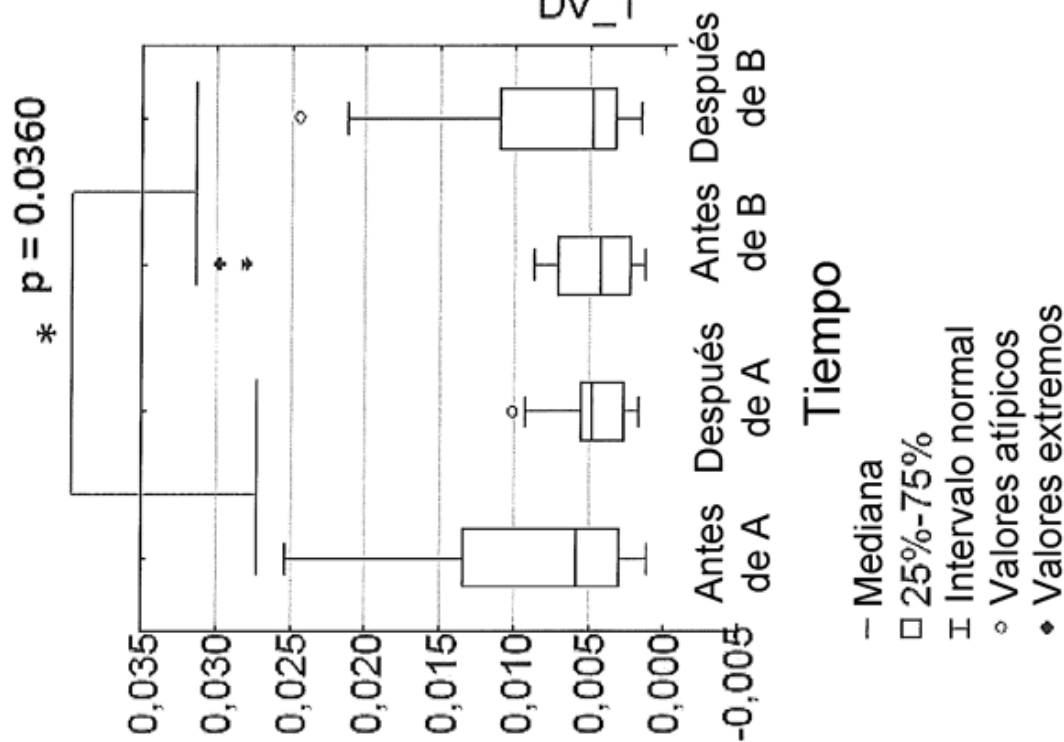
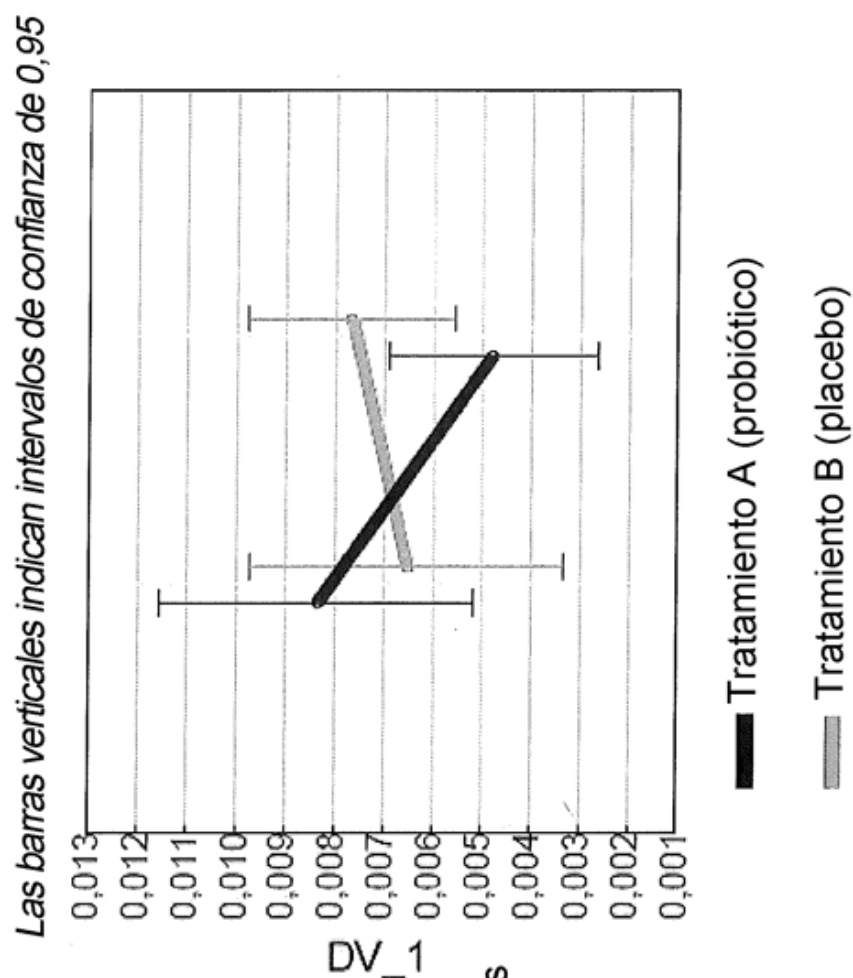


Fig.1.2

Tratamiento*tiempo ; medias no ponderadas
 Efecto real: $F(1, 42)=4.6960$, $p=0.03595$
 Descomposición de hipótesis eficaz



Antes del trat. A Después del trat. A

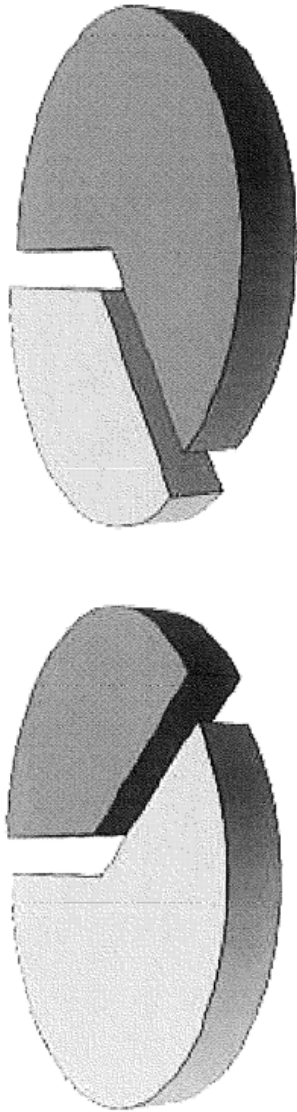


Fig.2.1

■ *Coprococcus* □ *Blautia*

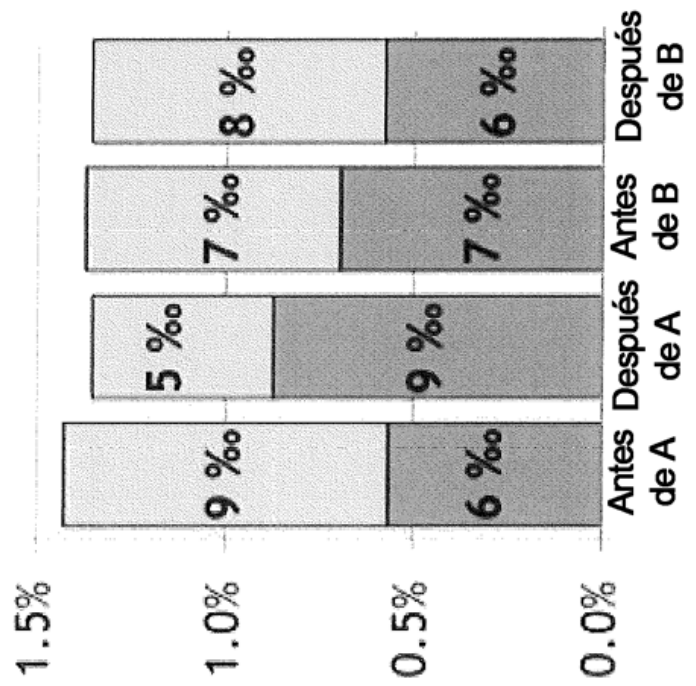


Fig.2.2

Fig.3

Tratamiento*tiempo ; medias no ponderadas

Efecto real : $F(1, 42)=4.6182, p=0.03744$

Descomposición de hipótesis eficaz

Las barras verticales indican intervalos de confianza de 0,95

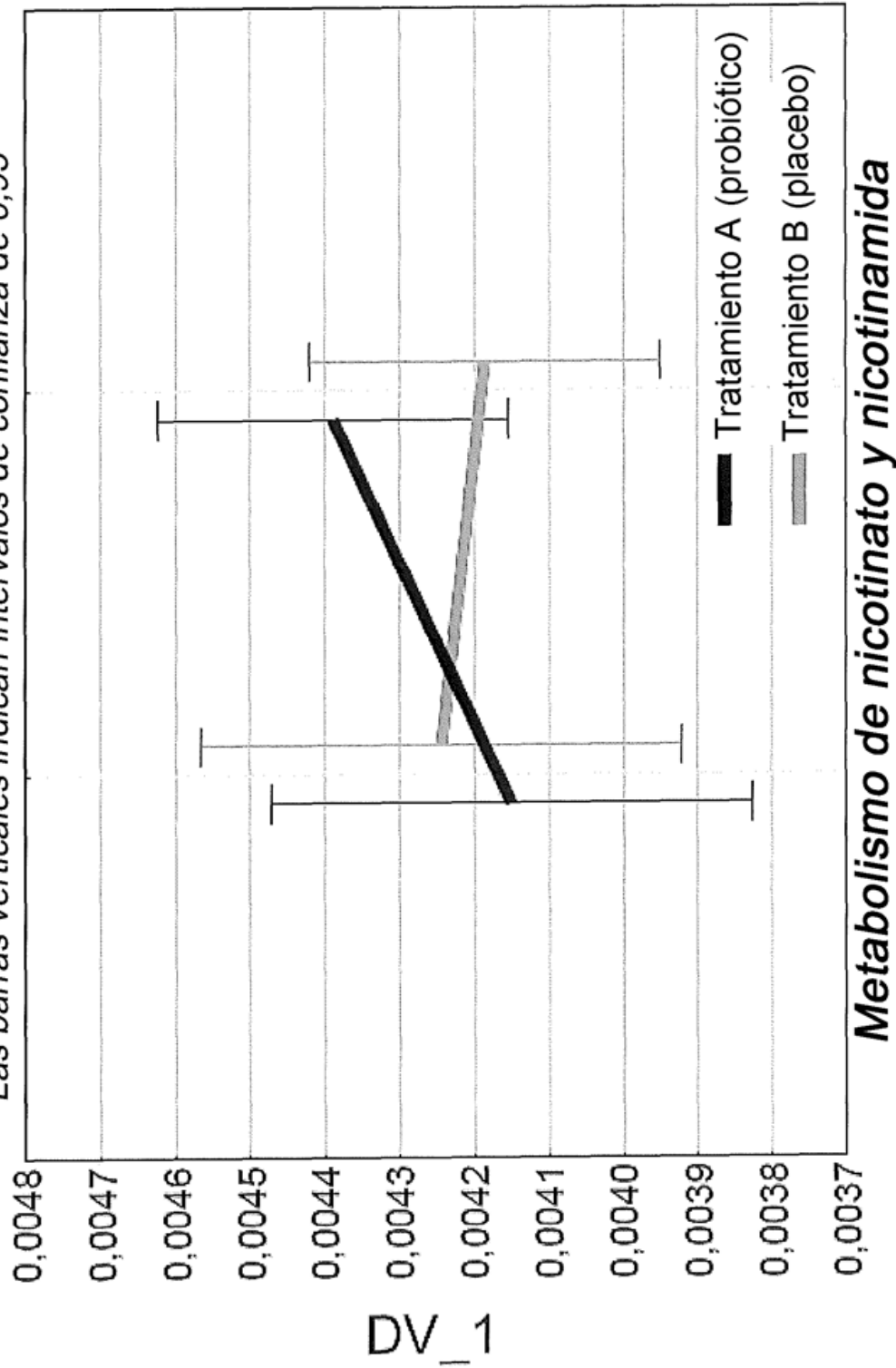


Fig.4

Tratamiento*tiempo ; medias no ponderadas

Efecto real : $F(1, 42)=4.8817, p=0.03265$

Descomposición de hipótesis eficaz

Las barras verticales indican intervalos de confianza de 0,95

