

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 459**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2020 PCT/KR2020/001485**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2021 WO21040159**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2020 E 20856035 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2025 EP 3988664**

54 Título: **Método para cribar sustancias personalizadas de mejora del ambiente intestinal usando el proceso PMAS**

30 Prioridad:

30.08.2019 KR 20190107146

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

14.04.2025

73 Titular/es:

**HEM PHARMA INC. (100.00%)
Business Incubation Center, 306-ho, 205-ho, 102-ho, F102-ho, F101-ho, 204-ho, 558, Handong-ro, Heunghae-eup, Buk-gu Pohang-si Gyeongsangbuk-do 37554, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, SO YOUNG y
JI, YO SEP**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 3 013 459 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para cribar sustancias personalizadas de mejora del ambiente intestinal usando el proceso PMAS

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a una composición cribar un material de mejora del ambiente intestinal y a un método de cribado que usa la composición.

10 **Antecedentes**

Genoma se refiere al gen contenido en el cromosoma, la microbiota se refiere a la comunidad microbiana en el ambiente como una flora microbiana, y microbioma se refiere al genoma de la comunidad microbiana total en el ambiente. En el presente documento, el microbioma puede significar una combinación del genoma y la microbiota.

15 Se sabe que la microbiota desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del hospedador, por ejemplo, la inmunidad humana, los metabolitos y similares. La microbiota y el hospedador se transmiten y reciben señales químicas entre sí y la expresión de células inmunitarias, la producción de neurotransmisores y ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) por parte de la microbiota tienen un efecto significativo en el sistema del hospedador.

Los probióticos/prebióticos equilibran la microbiota desequilibrada del hospedador, de modo que un metabolito sano de la microbiota mejora la salud del hospedador. Los probióticos existentes, al igual que los fármacos genéricos, proporcionan a todos la misma dosis y especies similares.

25 Sin embargo, la similitud del microbioma por humano es inferior al 50 %, y existe un creciente reconocimiento e investigación sobre la personalización de los probióticos.

El documento WO 2017/204788 A1 divulga una composición de probióticos y enzimas digestivas y un método para preparar y usar la misma.

30 Por lo tanto, la presente divulgación propone un método para verificar la idoneidad de la microbiota individual de los alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos que promueven la regulación y mejora de diversas microbiotas, incluidos los probióticos o prebióticos, de manera personalizada.

35 **Divulgación de la invención**

Problemas a resolver por la invención

40 En vista de lo anterior, la presente divulgación proporciona una composición para el cribado de un material de mejora del ambiente intestinal, un método de cribado que usa la composición y un método para proporcionar información para diagnosticar una enfermedad mediante la detección de un biomarcador intestinal. Sin embargo, los problemas a resolver por la presente divulgación no se limitan a los problemas descritos anteriormente. Aunque no se describen en el presente documento, otros problemas a resolver por la presente divulgación pueden entenderse claramente por un experto en la técnica a partir de las siguientes descripciones.

Medios para resolver los problemas

50 La presente invención se refiere al uso de una composición para el cribado de un material de mejora del ambiente intestinal, en donde la composición comprende L-cisteína y, opcionalmente, mucina, en donde la composición no incluye proteínas ni carbohidratos distintos de mucina.

Además, la presente invención se refiere a un método para cribar de un material de mejora del ambiente intestinal, incluyendo: (a) mezclar una composición del primer aspecto con una muestra obtenida de un sujeto; (b) tratar uno o más materiales candidatos de mejora del ambiente intestinal en la mezcla del proceso (a) y cultivar; y (c) analizar el cultivo del proceso (b).

Efectos de la invención

60 De acuerdo con los ejemplos y realizaciones de la presente divulgación, es posible proporcionar un método de análisis eficaz para cribar un material candidato de mejorar de la microbiota de una manera personalizada proporcionando un método para verificar probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados en condiciones *in vitro* basándose en la microbiota y los metabolitos de la microbiota.

65 Este método de acuerdo con la presente divulgación se puede aplicar a un sistema de cribado basado en biomarcadores y puede verificar rápidamente un material candidato personalizado con un método de cribado

personalizado eficaz.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 es un diagrama de ejemplo que ilustra un proceso para cribar probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados mediante la técnica PMAS.
- La figura 2 es un diagrama de ejemplo proporcionado para explicar un análisis de muestra mediante la técnica PMAS.
- 10 La figura 3 es un diagrama de ejemplo proporcionado para interpretar un resultado de análisis de muestra mediante la técnica PMAS.
- La figura 4 ilustra un ejemplo de cribado de probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y materiales candidatos a fármacos personalizados basándose en un resultado de análisis obtenido después del PMAS.
- 15 La figura 5 es un diagrama que muestra un resultado de análisis sobre el contenido de ácidos grasos de cadena corta en función de la composición de un medio de PMAS.
- La figura 6 es un diagrama que muestra un resultado de análisis sobre el contenido de ácidos grasos de cadena corta en función del tiempo de cultivo de PMAS.
- La figura 7 es un diagrama que ilustra la reproducibilidad de la técnica PMAS de la presente divulgación.
- 20 La figura 8 es un diagrama que ilustra la identidad entre un resultado clínico y un resultado obtenido mediante la técnica PMAS de la presente divulgación.
- La figura 9 es un diagrama de ejemplo que ilustra la configuración de un pocillo de placa cuando se realiza la técnica PMAS de la presente divulgación.
- La figura 10 es un diagrama de ejemplo que ilustra un análisis de un cambio en la cantidad de butirato en una prueba PMAS de la presente divulgación.
- 25 La figura 11 es un diagrama de ejemplo que ilustra un análisis de un cambio en la diversidad microbiana en una prueba PMAS de la presente divulgación.
- La figura 12 es un diagrama de ejemplo que ilustra un análisis de una correlación entre la composición microbiana y el butirato.

30 Mejor modo de realizar la invención

A lo largo de todo el documento, la expresión "comprende o incluye" y/o "que comprende o que incluye" usada en el documento significa que uno o más de otros componentes, etapas, funcionamiento y/o existencia o adición de elementos no se excluyen además de los componentes, etapas, funcionamiento y/o elementos descritos a menos que el contexto indique lo contrario. A lo largo de todo el documento, la expresión "aproximado o aproximadamente" o "sustancialmente" tiene la intención de tener significados cercanos a los valores numéricos o intervalos especificados con un error permisible y la intención de evitar que los valores numéricos exactos o absolutos divulgados para la comprensión de la presente divulgación sean usados ilegal o injustamente por cualquier tercero inaceptable.

40 A lo largo de todo el documento, la expresión "una o más combinaciones de" incluida en la descripción del tipo Markush significa mezcla o combinación de uno o más componentes, etapas, funcionamientos y/o elementos seleccionados de un grupo que consiste en componentes, etapas, funcionamiento y/o elementos descritos en el tipo Markush y, por lo tanto, significa que la divulgación incluye uno o más componentes, etapas, funcionamientos y/o elementos seleccionados del grupo Markush.

45 A lo largo de todo el documento, una expresión en la forma "A y/o B" significa "A o B, o A y B".

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán en detalle realizaciones y ejemplos de la presente divulgación con referencia a los dibujos adjuntos. Sin embargo, la presente divulgación puede no limitarse a las siguientes realizaciones, ejemplos y dibujos.

50 Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición para el cribado de un material de mejora del ambiente intestinal, en donde la composición comprende L-cisteína y, opcionalmente, mucina, en donde la composición no incluye proteínas ni carbohidratos distintos de mucina.

55 Específicamente, se puede entender que la composición se usa en una serie de procesos para monitorizar el progreso de la mejora en el ambiente intestinal y evaluar si el material candidato puede mejorar el ambiente intestinal, pero no se limita particularmente a tal serie de procesos.

60 En una realización, la composición se usa para imitar de forma idéntica/similar el ambiente intestinal de un usuario individual *in vitro* y permite comprobar de forma precisa y eficaz si el material candidato puede mejorar el ambiente intestinal en condiciones *in vitro* y, por lo tanto, se puede usar de forma útil para el cribado de un material personalizado de mejora del ambiente intestinal.

65 A lo largo de todo el documento, la expresión "mejora del ambiente intestinal" se refiere a cambiar ventajosamente la composición de la microbiota intestinal y los metabolitos de la microbiota. La mejora del ambiente intestinal da como

5 resultado un aumento de las bacterias intestinales beneficiosas y los metabolitos de las bacterias beneficiosas y, por lo tanto, tiene efectos tales como la síntesis de vitaminas, mejora de la digestión y la absorción, prevención de infecciones e inmunopotenciación, y también da como resultado una disminución de las bacterias dañinas y los metabolitos de las bacterias dañinas y, por lo tanto, tiene efectos tales como la disminución de la descomposición intestinal, disminución de las toxinas bacterianas y disminución de los carcinógenos.

Además, la mejora del ambiente intestinal puede prevenir o tratar enfermedades intestinales tales como diarrea, estreñimiento y enteritis, y también puede prevenir o tratar cánceres, obesidad, diabetes y enfermedades relacionadas con el cerebro.

10 En una realización, la mejora del ambiente intestinal cribada puede incluir uno o más seleccionados del grupo que consiste en un aumento de la diversidad microbiana de la microbiota, una disminución de endotoxina y sulfuro de hidrógeno de la microbiota intestinal, un aumento de los metabolitos procedentes de la microbiota beneficiosa, un aumento o una disminución de los ácidos grasos de cadena corta, un aumento del tipo y número de bacterias beneficiosas y una disminución del tipo y número de bacterias dañinas, pero puede no limitarse a lo mismo.

20 A lo largo de todo el documento, el término "L-cisteína" es uno de los complementos de aminoácidos y desempeña un papel importante en el metabolismo como componente del glutatión *in vivo* y también se usa para inhibir el oscurecimiento de los zumos de frutas y la oxidación de la vitamina C.

En una realización, la L-cisteína puede estar contenida en una concentración del 0,001 % (p/v) al 5 % (p/v), preferentemente del 0,005 % (p/v) al 3 % (p/v), más preferentemente del 0,01 % (p/v) al 1 % (p/v), mucho más preferentemente del 0,01 % (p/v) al 0,1 % (p/v), pero puede no limitarse a lo mismo.

25 En una realización, la L-cisteína puede incluirse en la composición para cribar un material de mejora del ambiente intestinal en forma de diversos tipos de formulaciones o sales, y específicamente, la L-cisteína puede ser clorhidrato de L-cisteína, pero puede no limitarse a lo mismo.

30 En una realización, la composición puede incluir además mucina, pero puede no limitarse a lo mismo.

A lo largo de todo el documento, el término "mucina" es una mucosustancia secretada por la membrana mucosa e incluye mucina de la glándula submandibular y otras, tales como mucina de la mucosa gástrica y mucina del intestino delgado. Las mucinas son glucoproteínas y se las conoce como una de las fuentes de energía, tales como fuentes de carbono y fuentes de nitrógeno, que la microbiota intestinal puede realmente usar.

35 En una realización de la presente divulgación, la mucina puede estar contenida en una concentración del 0,01 % (p/v) al 5 % (p/v), preferentemente del 0,05 % (p/v) al 3 % (p/v), más preferentemente del 0,07 % (p/v) al 2 % (p/v), y mucho más preferentemente del 0,1 % (p/v) al 1 % (p/v), pero puede no limitarse a lo mismo.

40 La composición usada puede no incluir ningún otro nutriente distinto de la mucina y, específicamente, puede no incluir una fuente de nitrógeno y/o una fuente de carbono, tal como proteínas y carbohidratos.

45 La proteína que sirve como fuente de carbono y fuente de nitrógeno puede incluir uno o más de triptona, peptona y extracto de levadura, pero puede no limitarse a lo mismo. Específicamente, la proteína puede ser triptona.

El carbohidrato que sirve como fuente de carbono puede incluir uno o más de monosacáridos, tales como glucosa, fructosa y galactosa, y disacáridos, tales como maltosa y lactosa, pero puede no limitarse a lo mismo. Específicamente, el carbohidrato puede ser glucosa.

50 La composición puede no incluir glucosa ni triptona.

55 En una realización, la composición puede incluir uno o más seleccionados del grupo que consiste en cloruro de sodio (NaCl), carbonato de sodio (NaHCO₃), cloruro de potasio (KCl) y hemina. Específicamente, el cloruro de sodio puede estar contenido en una concentración de 10 mM a 100 mM, el carbonato de sodio puede estar contenido en una concentración de 10 mM a 100 mM, el cloruro de potasio puede estar contenido en una concentración de 1 mM a 30 mM, y la hemina puede estar contenida en una concentración de 1 x 10⁻⁶ g/l a 1 x 10⁻⁴ g/l, pero puede no limitarse a lo mismo.

60 En una realización, la composición puede ser una composición de medio de cultivo, pero puede no limitarse a lo mismo.

En una realización, el material de mejora del ambiente intestinal puede incluir uno o más seleccionados del grupo que consiste en probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos, pero puede no limitarse a lo mismo.

65 A lo largo de todo el documento, el término "probióticos" se refiere a bacterias que exhiben un efecto beneficioso *in vivo* sobre la salud de un hospedador. Específicamente, los probióticos que pueden llegar al intestino y crecer en la

5 mucosa intestinal producen ácido láctico que acidifica el ambiente intestinal y, por lo tanto, las bacterias dañinas que no pueden sobrevivir en condiciones ácidas disminuyen en número y las bacterias beneficiosas que pueden vivir bien en condiciones ácidas aumentan en número, lo que hace que el ambiente intestinal sea saludable. Los probióticos pueden incluir *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y similares, pero puede no limitarse a lo mismo. Los probióticos pueden prepararse en forma de leche fermentada, gránulos, polvo o similares que incluyan estas cepas.

10 A lo largo de todo el documento, el término "prebióticos" se refiere a sustancias que activan los probióticos, que son bacterias beneficiosas, inhibiendo así las bacterias intestinales dañinas y también creando un ambiente intestinal donde los probióticos pueden vivir bien. Además, los prebióticos sirven como alimento para ser descompuestos y usados como fuente de energía para la producción de probióticos y son sacáridos que no pueden ser absorbidos por el cuerpo y, por lo tanto, no se absorben en el intestino delgado y llegan al intestino donde sirven como alimento para las bacterias del ácido láctico y también causan una disminución de las bacterias dañinas.

15 En una realización, el uso de la composición puede crear un ambiente intestinal en condiciones *in vitro*.

20 Un segundo aspecto de la presente divulgación proporciona un método para cribar un material de mejora del ambiente intestinal, incluyendo: (a) mezclar una composición del primer aspecto con una muestra obtenida de un sujeto; (b) tratar uno o más materiales candidatos de mejora del ambiente intestinal en la mezcla del proceso (a) y cultivar; y (c) analizar el cultivo del proceso (b). Las características descritas anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente divulgación pueden aplicarse igualmente al método de acuerdo con el segundo aspecto de la presente divulgación.

25 En una realización, el método puede ser un método para cribar un material para prevenir y tratar enfermedades causadas por trastornos intestinales.

30 En una realización, el método puede entenderse como una serie de procesos para tratar una muestra obtenida de un sujeto que necesita una mejora del ambiente intestinal con un material candidato capaz de mejorar el ambiente intestinal, monitorizar el progreso de la mejora en el ambiente intestinal y evaluar si el material candidato puede mejorar el ambiente intestinal, pero sin limitarse particularmente a lo mismo. Específicamente, si se ha mejorado el ambiente intestinal, cuando se determina el grado de mejora en el ambiente intestinal, el material candidato se puede determinar como un material de mejora del ambiente intestinal.

35 En una realización, el método puede realizarse en condiciones *in vitro*.

40 A lo largo de todo el documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier organismo vivo que pueda tener un trastorno intestinal, que pueda tener una enfermedad causada por un trastorno intestinal o desarrollarla o que pueda necesitar una mejora del ambiente intestinal. Los ejemplos específicos de los mismos pueden incluir, pero sin limitación, mamíferos tales como ratones, monos, ganado vacuno, cerdos, cerdos enanos, animales domésticos y seres humanos, aves, peces de criadero y similares.

45 A lo largo de todo el documento, el término "muestra" se refiere a un material procedente del sujeto y, específicamente, puede ser células, orina, heces o similares, pero puede no limitarse a lo mismo siempre que se pueda detectar a partir de lo mismo un material, tal como microbiota, metabolitos microbianos intestinales, endotoxinas y ácidos grasos de cadena corta, presentes en el intestino.

50 En una realización, el método puede incluir un proceso para preparar una muestra, un proceso para pretratar la muestra, un proceso para analizar la muestra y los datos, y un proceso para cribar un material personalizado de mejora del ambiente intestinal basándose en los datos obtenidos, pero puede no limitarse a lo mismo.

55 En una realización, el método puede ser un método de cribado rápido que es más rápido que los métodos de análisis de microbiota y los métodos de análisis del ambiente intestinal conocidos convencionalmente. El "rápido" puede significar específicamente de 12 horas a 48 horas, y más específicamente de 18 horas a 24 horas, pero puede no limitarse a lo mismo.

En una realización, el cultivo en el proceso (b) puede realizarse durante 12 horas a 48 horas, y específicamente durante 18 horas a 24 horas, pero puede no limitarse a lo mismo.

60 En una realización, el método puede realizarse en condiciones anaerobias. Específicamente, el cultivo en el proceso (b) del método puede realizarse en condiciones anaerobias.

65 En una realización, el material candidato de mejora del ambiente intestinal puede incluir uno o más seleccionados del grupo que consiste en probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos, pero puede no limitarse a lo mismo.

En una realización, el análisis del cultivo en el proceso (c) sirve para analizar si el ambiente intestinal se ha mejorado

o no. Específicamente, el análisis del cultivo en el proceso (c) sirve para analizar el tipo, contenido y/o concentración de uno o más de una endotoxina, sulfuro de hidrógeno como producto de fermentación intestinal anómala, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y metabolitos procedentes de la microbiota contenidos en el cultivo y para analizar un cambio en el tipo, contenido y/o concentración cuando la muestra se trata con el material candidato.

5 A lo largo de todo el documento, el término "endotoxina" es una sustancia tóxica que se puede encontrar dentro de una célula bacteriana y actúa como un antígeno compuesto por un complejo de proteínas, polisacáridos y lípidos.

10 En una realización, la endotoxina puede incluir lipopolisacáridos (LPS), pero puede no limitarse a lo mismo. Los LPS pueden ser específicamente gramnegativos y proinflamatorios.

15 A lo largo de todo el documento, la expresión "ácido graso de cadena corta (SCFA)" se refiere a un ácido graso de longitud corta con seis o menos átomos de carbono y es un metabolito representativo producido a partir de la microbiota intestinal. El SCFA tiene funciones útiles en el cuerpo, tal como un aumento de la inmunidad, la estabilización de los linfocitos intestinales, una disminución de la señalización de la insulina y la estimulación de los nervios simpáticos.

En una realización, los ácidos grasos de cadena corta pueden incluir uno o más seleccionados del grupo que consiste en formiato, acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato e iso-valerato, pero puede no limitarse a lo mismo.

20 En una realización, el análisis del cultivo en el proceso (c) puede servir para analizar el tipo, contenido, concentración y/o cambio de diversidad de las bacterias contenidas en la microbiota del cultivo, pero puede no limitarse a lo mismo.

25 En una realización, la microbiota puede incluir bacterias intestinales beneficiosas y bacterias intestinales dañinas. Específicamente, las bacterias intestinales beneficiosas pueden incluir, pero sin limitación, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y las bacterias intestinales dañinas pueden incluir, pero sin limitación, *Proteobacteria* y *Clostridium difficile*.

30 En una realización, un método para analizar la endotoxina, el sulfuro de hidrógeno como producto de fermentación intestinal anómala, los ácidos grasos de cadena corta (SCFA), los metabolitos procedentes de la microbiota, la microbiota y la diversidad microbiana intestinal puede emplear diversos métodos de análisis, tales como métodos de análisis genético que incluyen análisis de absorbancia, análisis cromatográfico y secuenciación de próxima generación, y métodos de análisis metagenómico, que se pueden usar por un experto en la técnica.

35 En una realización, el método puede incluir además cribar un material candidato que aumenta el contenido de los ácidos grasos de cadena corta, aumenta el tipo y el contenido de bacterias beneficiosas en la microbiota, disminuye el contenido de la endotoxina y el sulfuro de hidrógeno o disminuye el tipo y contenido de bacterias dañinas en la microbiota mediante la comparación entre el resultado del análisis del proceso (c) y el resultado del análisis en un grupo de control.

40 A lo largo de todo el documento, la expresión "grupo de control" se refiere a una muestra o datos sin limitación, siempre que se puedan comparar en cuanto a los cambios del ambiente intestinal (tipo, concentración y/o contenido de ácidos grasos de cadena corta, microbiota, endotoxinas, sulfuro de hidrógeno y metabolitos microbianos intestinales) provocados por el tratamiento con un material candidato de mejora del ambiente intestinal. Específicamente, el grupo de control puede incluir una muestra no tratada de un sujeto o una muestra tratada solo con un material de control, tal como vehículo, solución salina, DMSO o similares, pero puede no limitarse a lo mismo.

50 En una realización, el método incluye imitar de manera idéntica/similar el ambiente intestinal de un usuario individual, incluida la microbiota, temperatura, humedad y movimiento *in vitro*, y analizar un número predeterminado o más de probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos de manera paralela. Por lo tanto, es posible cribar rápidamente el material candidato de mejora de la microbiota personalizado más eficaz.

55 En una realización, el método puede incluir realizar un pretratamiento *in vitro*, un tratamiento con un material candidato de mejora de la microbiota, la verificación de la funcionalidad y el modo de acción del material candidato con respecto a muestras de heces de seres humanos y diversos animales que puedan representar más fácilmente el ambiente microbiano intestinal *in vivo* y el examen de la identificación taxonómica, la seguridad microbiana y la funcionalidad microbiana de la microbiota resultante del material candidato. Como tal, a través del método de cribado rápido que contiene las heces de un individuo y medios especiales y el análisis del microbioma procedente de las heces y los metabolitos, es posible cribar de manera eficiente probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados.

60 En una realización, el método permite el cribado de probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados usando muestras tales como heces. En lo sucesivo en el presente documento, el método de acuerdo con la presente divulgación se describirá como cribado de metaanálisis farmacéutico personalizado (PMAS, por sus siglas en inglés).

65 Un tercer aspecto de la presente divulgación (no reivindicado) proporciona un método para proporcionar información

para diagnosticar una enfermedad causada por un trastorno intestinal. Las características descritas anteriormente con respecto al primer aspecto y al segundo aspecto de la presente divulgación pueden aplicarse igualmente al método de acuerdo con el tercer aspecto de la presente divulgación.

- 5 El método puede incluir la detección de un biomarcador para diagnosticar una enfermedad causada por un trastorno intestinal a partir de la muestra obtenida del sujeto, y el método puede incluir un proceso de preparación de muestra, un proceso de pretratamiento de muestra, un proceso de análisis de muestra, un proceso de análisis de datos y un proceso para diagnosticar una enfermedad en función de los datos obtenidos.
- 10 El biomarcador puede ser una sustancia detectada en el intestino y, específicamente, puede incluir microbiota, endotoxinas, sulfuro de hidrógeno, metabolitos microbianos intestinales, ácidos grasos de cadena corta y similares, pero puede no limitarse a lo mismo.

Modo para realizar la invención

- 15 En lo sucesivo en el presente documento, se describirán en detalle ejemplos de la presente divulgación. Sin embargo, la presente divulgación puede no limitarse a los mismos.

Ejemplo

- 20 Ejemplo 1. Proceso general de un sistema de cribado de candidatos a material personalizado mediante la técnica de cribado de metaanálisis farmacéutico personalizado (PMAS)

25 La presente invención se refiere al uso de una composición y un método para cribar probióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados en condiciones *in vitro* usando muestras tales como las heces de un individuo. En la presente invención, el sistema de cribado se describirá como cribado de metaanálisis farmacéutico personalizado (PMAS).

30 La figura 1 es un diagrama de ejemplo que ilustra un proceso para cribar probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados mediante la técnica PMAS. El proceso general de un sistema de cribado de la presente divulgación se describirá a continuación con referencia a la figura 1.

(1) Preparación de la muestra

35 Las heces de un ser humano o animal y un medio de PMAS se mezclaron en una relación de 1:12 y se homogeneizaron usando un Stomacher. A continuación, se usó un filtro para filtrar los residuos de las heces. Antes de tratar los probióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y materiales candidatos a fármacos, la mezcla de heces y medio se redujo en una cámara anaerobia durante 4 horas.

40 (2) Dispensación de la mezcla de heces y medio

En la cámara anaerobia, se dispensó la misma cantidad de la mezcla de heces y medio homogeneizada a cada una de las placas de cultivo, tales como placas de 96 pocillos.

45 (3) Tratamiento del material candidato

Los probióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y materiales candidatos a fármacos a tratar se suspendieron en PBS 1X estéril para homogeneizarlos en cuando a concentración y cantidad y a continuación se dispensaron a las placas respectivas donde se puso la mezcla de heces y medio.

50 (4) Cultivo anaerobio

Las placas se cultivaron en condiciones anaerobias con temperatura, humedad y movimiento similares a los del ambiente intestinal para fermentar y cultivar los respectivos grupos de prueba.

55 (5) Análisis de la muestra

60 Cada uno de los grupos de prueba cultivados se centrifugó para separar el sobrenadante y el sedimento. A continuación, se analizaron los metabolitos, ácidos grasos de cadena corta, sustancias tóxicas y similares del sobrenadante y se analizó la microbiota del sedimento.

Ejemplo 2. Proceso de análisis de muestras usando la técnica PMAS

65 La figura 2 y la figura 3 son diagramas de ejemplo que muestran el proceso de análisis de muestras en la técnica PMAS del Ejemplo 1.

Específicamente, después de que finaliza el cultivo de los grupos de prueba tratados con los materiales candidatos, las sustancias tóxicas, tales como sulfuro de hidrógeno y LPS bacterianos (endotoxinas) y los metabolitos microbianos, tales como ácidos grasos de cadena corta del sobrenadante obtenido por centrifugación de los grupos de prueba cultivados se analizan mediante análisis de absorbancia y análisis por cromatografía y se realiza un método de análisis independiente del cultivo a la microbiota del sedimento centrifugado. Por ejemplo, la cantidad de cambio en el sulfuro de hidrógeno producido por el cultivo se mide a través de un método de azul de metileno usando N,N-dimetil-p-fenilendiamina y cloruro de hierro (FeCl₃) y el nivel de endotoxinas, que es uno de los factores que promueven la inflamación, se mide usando un kit de ensayo de endotoxinas. Además, los metabolitos microbianos, tales como los ácidos grasos de cadena corta que incluyen acetato, propionato y butirato se pueden analizar a través de cromatografía de gases. La microbiota se puede analizar mediante análisis basado en el genoma a través de análisis metagenómico, tal como PCR en tiempo real, en el que todos los genomas se extraen de una muestra y un cebador específico de bacterias sugerido en el método GULDA o secuenciación de próxima generación. Es decir, el método de acuerdo con la presente divulgación hace posible cribar un material candidato personalizado de mejora de la microbiota basándose en al menos uno de análisis de sustancias tóxicas, análisis de metabolitos procedentes de la microbiota que incluyen ácidos grasos de cadena corta, y análisis de la microbiota. Específicamente, es posible encontrar un material candidato que disminuya el nivel de sustancias tóxicas mediante el análisis de sustancias tóxicas, incluyendo las endotoxinas y el sulfuro de hidrógeno, comprobar un cambio en un ácido graso de cadena corta diana predeterminado mediante el análisis de ácidos grasos de cadena corta y comprobar un cambio en la microbiota antes y después del tratamiento del material candidato mediante el análisis de la microbiota. Por lo tanto, es posible cribar un material candidato personalizado de mejora de la microbiota.

Ejemplo 3. Proceso de cribado de candidatos a material personalizado basado en el resultado del análisis de muestras usando la técnica PMAS

La figura 4 es un diagrama de ejemplo que muestra un proceso para cribar probióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados en función del resultado del análisis de muestra del Ejemplo 2.

Específicamente, un aumento o una disminución en la producción de sustancias tóxicas, un cambio en SCFA, un aumento o una disminución en las bacterias dañinas y las bacterias beneficiosas se determinan en función del resultado del análisis después de la ejecución del PMAS para determinar si el material candidato tratado puede mejorar la microbiota. Si el sobrenadante no permanece por encima de la cantidad mínima para el análisis cuando se realiza la centrifugación después de la fermentación y el cultivo, la cantidad de sobrenadante a usar para el análisis se asegura repitiendo el PMAS y el cultivo. Si las sustancias tóxicas aumentan y la cantidad total de ácidos grasos de cadena corta está fuera del intervalo normal y las bacterias dañinas disminuyen significativamente en comparación con antes del tratamiento, se considera que el desequilibrio de la microbiota es inducido por el material de tratamiento. Por lo tanto, el material de tratamiento se excluye del cribado. Sin embargo, si el número de bacterias beneficiosas disminuye, se excluye del cribado solo cuando la diversidad de toda la microbiota examinada a través del análisis metagenómico usando secuenciación de próxima generación disminuye significativamente. Además, para realizar el cribado con referencia a los efectos de los probióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y materiales candidatos a fármacos en un biomarcador intestinal específico, el análisis del biomarcador se realiza para el cribado solo cuando los materiales candidatos pasan los criterios de cribado mencionados anteriormente.

Es decir, la presente divulgación hace posible cribar un material candidato personalizado de mejora de la microbiota basándose en al menos uno de análisis de sustancias tóxicas, incluyendo endotoxinas e hidrógeno, análisis de metabolitos procedentes de la microbiota que incluyen ácidos grasos de cadena corta, análisis de bacterias intestinales dañinas, incluidas *Proteobacteria* y *Clostridium difficile*, y análisis de bacterias intestinales beneficiosas, incluidas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Específicamente, es posible encontrar un material candidato que disminuya el nivel de sustancias tóxicas mediante el análisis de sustancias tóxicas, incluyendo las endotoxinas y el sulfuro de hidrógeno, comprobar un cambio en un ácido graso de cadena corta diana predeterminado mediante el análisis de ácidos grasos de cadena corta, y comprobar un aumento o disminución de bacterias intestinales dañinas y bacterias intestinales beneficiosas mediante el análisis de bacterias intestinales dañinas y el análisis de bacterias intestinales dañinas. Por lo tanto, es posible cribar un material candidato personalizado de mejora de la microbiota. Por ejemplo, si la producción de sustancias tóxicas no aumenta significativamente, la cantidad total de ácidos grasos de cadena corta está dentro del intervalo normal, las bacterias dañinas no aumentan significativamente y las bacterias beneficiosas no disminuyen significativamente, o si las bacterias beneficiosas disminuyen significativamente pero la diversidad de la microbiota aumenta, es posible seleccionar un grupo de prueba con el mayor aumento en la relación de butirato en los ácidos grasos de cadena corta totales y realizar un cribado de probióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados. Si la producción de sustancias tóxicas no aumenta significativamente, la cantidad total de ácidos grasos de cadena corta está dentro del intervalo normal, las bacterias dañinas no aumentan significativamente y las bacterias beneficiosas no disminuyen significativamente, o si las bacterias beneficiosas disminuyen significativamente pero la diversidad de la microbiota aumenta y se necesita un análisis adicional de un biomarcador específico del intestino, se realiza un análisis adicional de un aumento o disminución y la presencia o ausencia del biomarcador específico y, en función del resultado del análisis, es posible seleccionar un grupo de prueba en el que el biomarcador específico se ve afectado por el tratamiento con PMAS y realizar un cribado de probióticos, prebióticos, alimentos, alimentos funcionales para la salud y fármacos personalizados.

Ejemplo de prueba 1. Comprobación de la composición del medio para la técnica PMAS

Para comprobar la composición óptima de un medio de PMAS para la técnica PMAS del Ejemplo 1, se realizó una prueba de la siguiente manera.

Específicamente, las muestras de heces se mezclaron en una relación de 1:12 (p/v) con medios que tenían diversas composiciones que se muestran en la siguiente Tabla 1 y a continuación se homogeneizaron usando un Stomacher. En particular, no se reivindican la Prueba 1, la Prueba 3 ni la Prueba 4. Se reivindican la Prueba 2 y la Prueba 5.

Tabla 1

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5
Glucosa	○	X	○	X	X
Triptona	○	X	X	0	X
Mucina	X	X	X	X	0
Clorhidrato de L-cisteína	X	○	0	0	0

A continuación, las muestras de heces se dispensaron en placas de 96 pocillos. El grupo de control no se trató con ningún material y los grupos de prebióticos se trataron con un agente prebiótico (medio: muestra de heces:prebióticos = 1:12:2 (p/v)) y a continuación se cultivaron en condiciones anaerobias a 37 °C durante 18 horas. A continuación, el grupo de control se comparó con los grupos de prebióticos en términos del contenido de butirato, propionato y acetato.

Como resultado, se verificó que la Prueba 1 y la Prueba 3 tratadas con prebióticos que se sabe que se fermentan por la microbiota intestinal y producen ácidos grasos de cadena corta, no mostraron un cambio en el contenido de butirato, propionato y acetato, y la Prueba 4 tratada con prebióticos mostró una disminución en el contenido de butirato, propionato y acetato (figura 5).

Por otro lado, se verificó que la Prueba 2 y la Prueba 5 tratadas con prebióticos mostraron un aumento general en el contenido de ácidos grasos de cadena corta (figura 5). Dado que la cantidad absoluta (mM) de ácidos grasos de cadena corta detectada fue mayor en la Prueba 5 que en la Prueba 2, la Prueba 5 es más fácil de analizar. Por lo tanto, las pruebas que se describirán en los siguientes Ejemplos de prueba se realizaron usando medios que tenían la composición de la Prueba 5.

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, se puede observar que la composición (Prueba 2) que contiene L-cisteína sin componentes nutritivos y la composición (Prueba 5) que contiene L-cisteína y mucina en realidad mostraron los resultados previstos del tratamiento con prebióticos. Por lo tanto, el ambiente intestinal se puede imitar de manera similar *in vitro* con un medio que contiene L-cisteína o L-cisteína y mucina sin carbohidratos, tal como glucosa y una proteína, tal como triptona y, por lo tanto, es posible verificar de manera rápida y precisa un cambio en el ambiente intestinal provocado por el tratamiento con un material candidato.

Ejemplo de prueba 2. Ajuste del tiempo de cultivo para el cribado de material de mejora del ambiente intestinal

Para comprobar el tiempo de cultivo óptimo para el cultivo anaerobio en la técnica PMAS del Ejemplo 1, se realizó una prueba de la siguiente manera.

Específicamente, la prueba se realizó de la misma manera que en el Ejemplo de prueba 1, excepto que el tiempo de cultivo del cultivo anaerobio se estableció en 0 horas, 18 horas, 21 horas, 24 horas, 40 horas y 48 horas. Después del cultivo, se midió el contenido de butirato, propionato y acetato.

Como resultado, se verificó que tanto el grupo de control como los grupos de prebióticos mostraron un aumento brusco en el contenido de ácidos grasos de cadena corta hasta el tiempo de cultivo de 18 horas y a continuación entraron en una fase de meseta (figura 6).

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, se puede observar que cuando el tiempo de cultivo para el cultivo anaerobio se establece en 18 horas, es el más eficiente para el cribado rápido de un material candidato usando la técnica PMAS de la presente divulgación.

Ejemplo de prueba 3. Validación del método de cribado de candidatos a material personalizado usando la técnica PMAS

Para verificar si es posible cribar con precisión un material candidato personalizado en el ambiente intestinal de un individuo creado *in vitro* usando la técnica PMAS de la presente divulgación, se realizaron pruebas de la siguiente manera.

(1) Verificación de la reproducibilidad

Para verificar si el resultado del análisis usando la técnica PMAS de la presente divulgación se reproduce en el mismo sujeto, se realizó una prueba de la siguiente manera.

5 Específicamente, para verificar la reproducibilidad del resultado del análisis PMAS en las muestras de heces A1 a A4 y B1 a B3 recogidas en fechas respectivas de diferentes personas A y B, se midió la cantidad de butirato del grupo de control tratado sin material y de los grupos de prueba tratados con cinco materiales candidatos y los valores cuantitativos de butirato de los grupos de prueba tratados con cinco materiales candidatos se dividieron por el valor cuantitativo de butirato del grupo de control para averiguar las cantidades de butirato que aumentaron o disminuyeron cuando las muestras se trataron con los candidatos a material, respectivamente. A continuación, se analizaron todos los resultados del tratamiento de las muestras respectivas con los cinco materiales candidatos usando la correlación de Pearson (cuanto más se acerca el coeficiente de correlación a 1, mayor similitud).

15 Como resultado, los resultados del análisis PMAS de las muestras de heces recogidas de la misma persona mostraron una tendencia considerablemente similar (coeficiente de correlación de 0,8 o más), pero diferencias con los resultados del análisis PMAS de las muestras de heces recogidas de personas diferentes (figura 7). De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, se puede observar que el resultado del análisis usando la técnica PMAS de la presente divulgación se reproduce en las muestras de la misma persona incluso en condiciones *in vitro*.

20 (2) Verificación de identidad con resultado clínico

Para verificar si el resultado del análisis mediante la técnica PMAS de la presente divulgación muestra identidad con un resultado clínico real, se realizó una prueba de la siguiente manera.

25 Específicamente, se obtuvieron muestras de heces de veinticuatro personas, y se analizó si el contenido de ácidos grasos de cadena corta en las muestras de heces aumentó o disminuyó por el tratamiento con probióticos A usando la técnica PMAS de la presente divulgación.

30 A continuación, después de que las mismas veinticuatro personas realmente tomaron los probióticos A, se verificó clínicamente si el contenido de ácidos grasos de cadena corta cambió entre las muestras de heces obtenidas antes y después de la ingesta, y el resultado clínico se comparó con el resultado obtenido mediante la técnica PMAS (en lo sucesivo en el presente documento, denominado "resultado PMAS").

35 Como resultado, se verificó realmente que doce de las doce personas mostraron un aumento de ácidos grasos de cadena corta en sus heces después de la ingesta de los probióticos A y las otras doce personas mostraron una disminución de los ácidos grasos de cadena corta. Además, de acuerdo con el resultado de la verificación de los efectos de los probióticos A mediante la técnica PMAS, los ácidos grasos de cadena corta aumentaron en las muestras de un total de catorce personas y disminuyeron en las muestras de diez personas (figura 8). El análisis se realizó basándose en los resultados descritos anteriormente de la siguiente manera.

- 40 1) Casos de un aumento real de los ácidos grasos de cadena corta cuando los ácidos grasos de cadena corta aumentaron de acuerdo con el resultado PMAS - $11/14 = 0,79$
 2) Casos de una disminución real de los ácidos grasos de cadena corta cuando los ácidos grasos de cadena corta disminuyeron de acuerdo con el resultado PMAS - $9/10 = 0,9$
 45 3) Casos de un aumento de los ácidos grasos de cadena corta de acuerdo con el resultado PMAS entre las personas cuyos ácidos grasos de cadena corta realmente aumentaron - $11/12 = 0,92$
 4) Casos de una disminución de los ácidos grasos de cadena corta de acuerdo con el resultado PMAS entre las personas cuyos ácidos grasos de cadena corta realmente disminuyeron - $9/12 = 0,75$
 5) Falso negativo con respecto a un aumento de los ácidos grasos de cadena corta - $1-0,92 = 0,08$
 6) Falso positivo con respecto a un aumento de los ácidos grasos de cadena corta - $1-0,75 = 0,15$
 50 7) Suponiendo que la prevalencia (frecuencia con la que aumentan los ácidos grasos de cadena corta después de la ingesta real de los probióticos A) es 0,5, $PPV = (0,92 \times 0,5)/(0,92 \times 0,5 + (1-0,75) \times (1-0,5)) = 0,86$

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, la técnica PMAS de la presente divulgación permite lograr la reproducibilidad en el mismo sujeto incluso en condiciones *in vitro* y obtener un resultado muy similar a un resultado clínico real. Por lo tanto, se puede observar que la técnica PMAS puede imitar el ambiente intestinal de manera muy similar y mediante el uso de la técnica PMAS, es posible cribar de manera rápida y eficiente un material de mejora del ambiente intestinal muy eficaz para cada individuo.

60 Ejemplo de prueba 4. Realización específica del sistema de cribado de candidatos a material personalizado usando la técnica PMAS

Mediante el uso de la técnica PMAS descrita anteriormente en los Ejemplos 1 a 3 y los Ejemplos de prueba 1 a 3, es posible analizar de forma rápida y precisa el ambiente intestinal de un individuo en condiciones *in vitro* como se describe a continuación y, en función del resultado del análisis, es posible cribar un material candidato capaz de mejorar el ambiente intestinal. La siguiente descripción es un ejemplo de un sistema de cribado que usa la técnica PMAS, y un experto en la técnica entenderá que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones a partir de la

descripción anterior. Por ejemplo, se pueden lograr resultados adecuados si las técnicas descritas se realizan en un orden diferente y/o si los componentes del sistema, la arquitectura, el dispositivo o el proceso descritos se combinan de una manera diferente o se reemplazan o sustituyen por otros componentes o sus equivalentes.

5 (1) Preparación de la mezcla de heces y medio y tratamiento con material candidato

Cada una de las muestras de heces obtenidas de ocho personas se mezcló con un medio de PMAS y se homogeneizó y a continuación se dispensó la misma cantidad de la mezcla de heces y medio homogeneizada a cada una de las placas de 96 pocillos (eje horizontal), y las placas de 96 pocillos a las que se dispensaron las muestras de heces se trataron verticalmente con diferentes materiales candidatos (figura 9).
10

El grupo de control (referencia) se preparó para determinar el grado de mejora en el ambiente intestinal comparando los valores de análisis medidos después de una prueba PMAS. Se usó una mezcla de antibióticos (ABX) en el tratamiento de referencia como grupo de control negativo para crear un ambiente donde las actividades microbianas en las heces disminuyeran drásticamente y se usó *Clostridium butyricum* (CB, cepas bacterianas que producen butirato de forma autónoma) como grupo de control positivo para crear un ambiente donde el butirato, influyente para determinar si el ambiente intestinal ha mejorado, aumenta aparentemente. Además, otras cepas bacterianas de LB, EF, BF son materiales candidatos a ensayar, y diferentes números representan cepas bacterianas.
15

20 (2) Resultado del análisis PMAS - Análisis del cambio en la cantidad de butirato

Se realizó una prueba PMAS usando muestras de heces obtenidas de 100 personas adultas de la misma manera que se ha descrito anteriormente en el párrafo (1), y se analizó un cambio en la cantidad de butirato. El resultado del análisis fue el que se muestra en la figura 10.
25

Específicamente, cada fila en el mapa de calor de la figura 10 representa una muestra de heces, y el punto representa el caso de un aumento y la línea diagonal representa el caso de una disminución en la cantidad de butirato en relación con un pocillo del grupo de control (referencia) después de la ejecución de PMAS.

30 Como resultado, se puede observar que el butirato aumenta significativamente en el caso del tratamiento con CB, que es un grupo de control positivo de butirato en comparación con otros tratamientos, y el butirato disminuye significativamente en el caso del tratamiento con ABX, que es un grupo de control negativo en comparación con otros tratamientos (una disminución en el metabolito microbiano, butirato, provocada por una disminución en las actividades microbianas).
35

Además, los materiales candidatos que sirven como grupos de prueba son bacterias basadas en *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* y *Enterococcus* que no pueden producir butirato de forma autónoma. Sin embargo, se puede observar que algunas heces tratadas con dichas cepas muestran un aumento de butirato (flecha de color negro de la figura 10). Por consiguiente, en algunos casos (algunas muestras de heces), se puede inferir que el tratamiento con un material candidato específico en el ambiente de PMAS induce un cambio en la actividad de otros microorganismos en las muestras (un aumento de butirato).
40

De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, se puede observar que un cambio ambiental causado por el tratamiento con un material candidato en la técnica PMAS es diferente para cada muestra de heces. Por consiguiente, se puede observar que es posible cribar un material candidato de mejora del ambiente intestinal en función de los microorganismos en cada muestra de heces.
45

(3) Resultado del análisis PMAS - Cambio en la diversidad microbiana intestinal

50 Se realizó una prueba PMAS usando muestras de heces obtenidas de 100 personas adultas de la misma manera que se ha descrito anteriormente en el párrafo (1), y se analizó un cambio en la diversidad microbiana intestinal en algunas de las muestras. El resultado del análisis fue el que se muestra en la figura 11.

Específicamente, cada fila en el mapa de calor de la figura 11 representa una muestra de heces, y el punto representa el caso de un aumento y la línea diagonal representa el caso de una disminución en la diversidad microbiana en relación con un pocillo del grupo de control (referencia) después de la ejecución de PMAS.
55

Como resultado, se puede observar que un material candidato para aumentar o disminuir la diversidad microbiana es diferente para cada muestra de heces. Además, se verificó que un efecto de cada material candidato se expresa de manera diferente para cada muestra de heces. Además, se verificó que la diversidad microbiana disminuye significativamente en el caso del tratamiento con ABX en comparación con otros grupos de tratamiento.
60

(4) Resultado del análisis PMAS - Correlación entre la composición microbiana de la muestra de heces inicial y el cambio en la cantidad de butirato después de la prueba PMAS

65 Se realizó una prueba PMAS usando muestras de heces obtenidas de 100 personas adultas de la misma manera que

se ha descrito anteriormente en el párrafo (1), y se analizó una correlación entre la composición microbiana y un cambio en la cantidad de butirato después de la prueba PMAS. El resultado del análisis fue el que se muestra en la figura 12.

- 5 Específicamente, la figura 12A es un gráfico que muestra los resultados del cambio de butirato en las muestras de heces tratadas con diferentes materiales candidatos después de la ejecución de PMAS (multivariante, diez resultados excepto el grupo de control de referencia) en el plano a través del análisis de PCA (eje x: PC1, eje y: PC2, se representan el 90,36 % de todos los datos y los puntos en el gráfico representan las respectivas muestras de heces) y la microbiota fecal inicial PC1 en la categoría es una puntuación PC1 obtenida expresando la microbiota fecal inicial
- 10 en las heces antes de la ejecución de PMAS calculada en distancia UniFrac ponderada. Además, la figura 12B es un gráfico que muestra una correlación entre PC1 que es un componente principal de los resultados del cambio de butirato en las respectivas muestras de heces después de la ejecución de PMAS y PC1 que es la diversidad beta del cambio de microbiota en las respectivas muestras de heces antes de la ejecución de PMAS.
- 15 De acuerdo con los resultados descritos anteriormente, se puede observar que "los resultados del cambio de butirato en las respectivas muestras de heces después de la ejecución de PMAS" tienen una correlación significativa con "los resultados del análisis microbiano antes de la ejecución de PMAS". Es decir, se puede inferir que un patrón diferente de cambio de butirato para cada muestra de heces después de la ejecución de PMAS es causado por la distribución y composición de diferentes microorganismos presentes en cada muestra de heces (el cambio de butirato no es
- 20 aleatorio).

La descripción anterior de la presente divulgación se proporciona con fines ilustrativos, y un experto en la técnica entenderá que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones sin cambiar la concepción técnica y las características esenciales de la presente divulgación. Por lo tanto, resulta evidente que los ejemplos descritos

25 anteriormente son ilustrativos en todos los aspectos y no limitan la presente divulgación. Por ejemplo, cada componente descrito como de un solo tipo se puede implementar de manera distribuida. Asimismo, los componentes descritos a distribuir se pueden implementar de manera combinada.

El alcance de la presente divulgación se define mediante las siguientes reivindicaciones en lugar de la descripción

30 detallada de la realización.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición para cribar un material de mejora del ambiente intestinal, en donde la composición comprende
- 10 L-cisteína y, opcionalmente, mucina, en donde la composición no incluye proteínas ni carbohidratos distintos de mucina.
- 15 2. El uso de la composición para cribar un material de mejora del ambiente intestinal de la reivindicación 1,
- 20 en donde el material de mejora del ambiente intestinal se selecciona del grupo que consiste en probiótico, prebiótico, alimento, alimento funcional para la salud, fármaco y una mezcla de los mismos.
- 25 3. Un método para cribar de un material de mejora del ambiente intestinal, que comprende:
- 30 (a) mezclar una composición de la reivindicación 1 con una muestra obtenida de un sujeto;
- (b) tratar uno o más materiales candidatos de mejora del ambiente intestinal en la mezcla del proceso (a) y cultivar;
- y
- (c) analizar el cultivo del proceso (b).
- 35 4. El método de la reivindicación 3, en donde el método se realiza en condiciones *in vitro*.
- 40 5. El método de la reivindicación 3, en donde el cultivo en el proceso (b) se realiza en condiciones anaerobias durante 18 horas a 24 horas.
- 45 6. El método para cribar un material de mejora del ambiente intestinal de la reivindicación 3,
- en donde el análisis del cultivo en el proceso (c) sirve para analizar el contenido, la concentración o el tipo de uno o más de endotoxinas, sulfuro de hidrógeno, ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y metabolitos procedentes de la microbiota contenidos en el cultivo.
- 50 7. El método para cribar un material de mejora del ambiente intestinal de la reivindicación 6,
- 55 en donde el ácido graso de cadena corta se selecciona del grupo que consiste en acetato, propionato, butirato, isobutirato, valerato e isovalerato.
- 60 8. El método para cribar un material de mejora del ambiente intestinal de la reivindicación 3,
- 65 en donde el análisis del cultivo en el proceso (c) consiste en analizar el tipo, la concentración, el contenido o el cambio de diversidad de la microbiota intestinal contenida en el cultivo.
- 70 9. El método para cribar un material de mejora del ambiente intestinal de la reivindicación 3, que comprende además:
- 75 (d) cribar un material candidato que aumenta el contenido de los ácidos grasos de cadena corta, aumenta el tipo y el contenido de bacterias beneficiosas en la microbiota, disminuye el contenido de endotoxina y sulfuro de hidrógeno o disminuye el tipo y el contenido de bacterias dañinas en la microbiota mediante la comparación entre el resultado del análisis del proceso (c) y el resultado del análisis en un grupo de control.

FIG. 1



FIG. 2

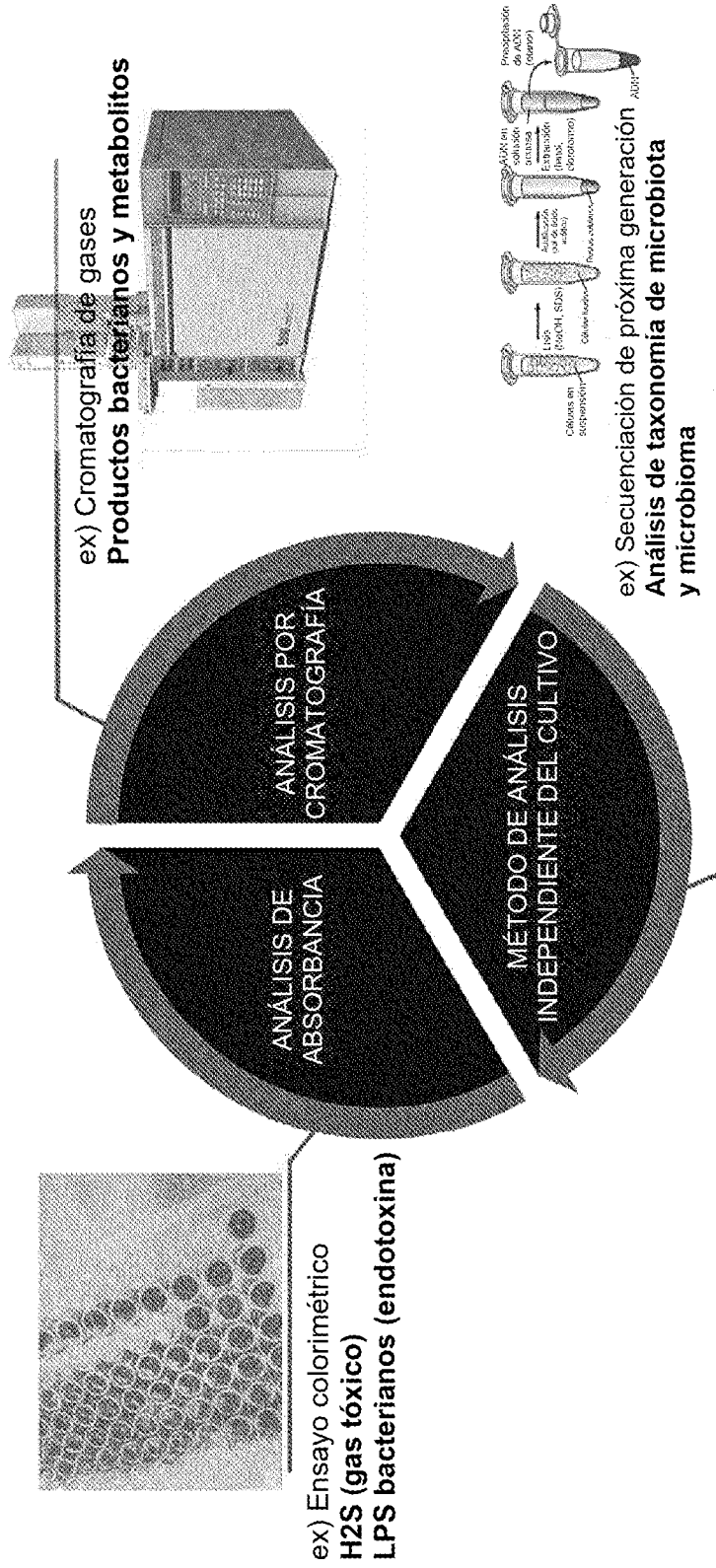


FIG. 4

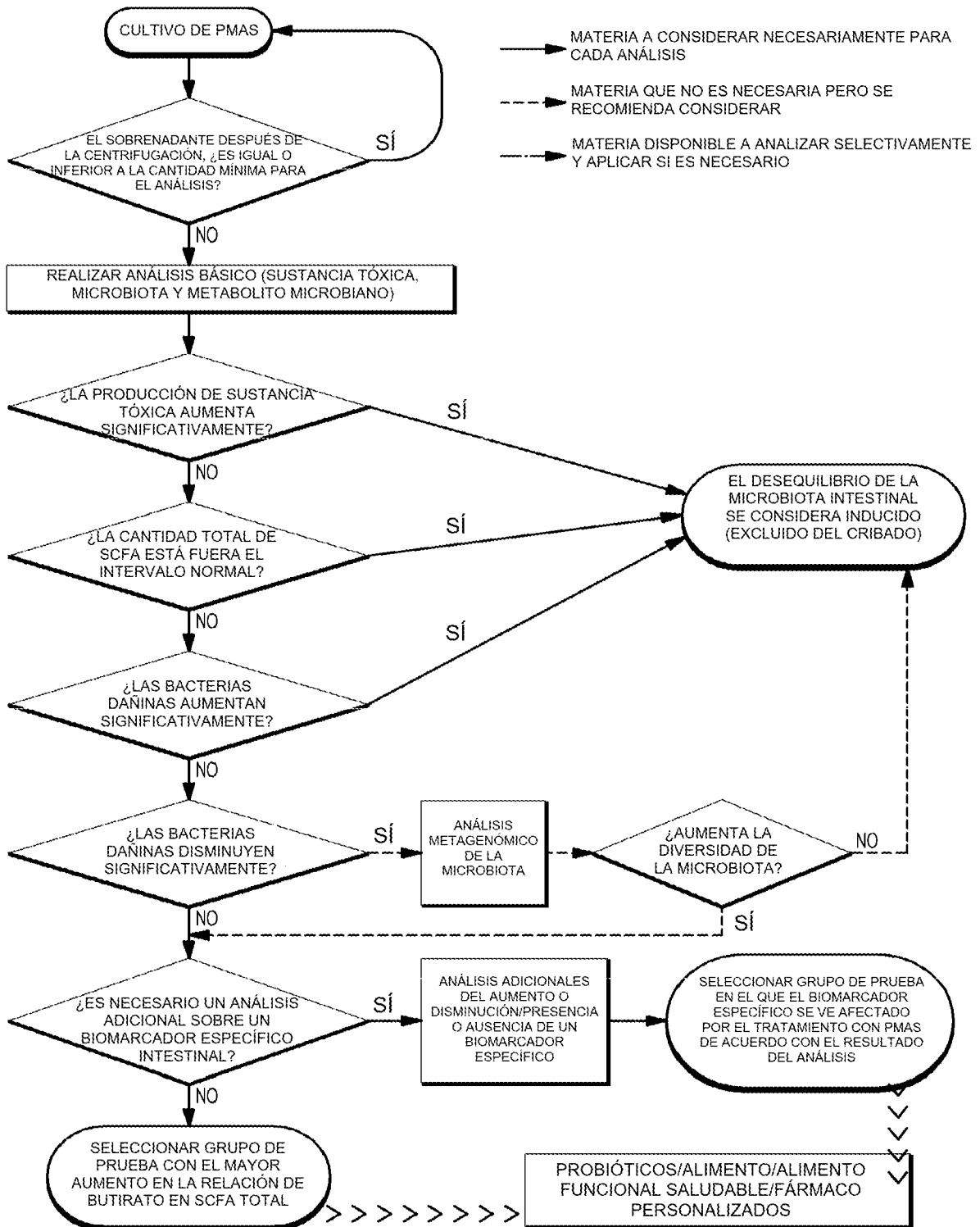


FIG. 6

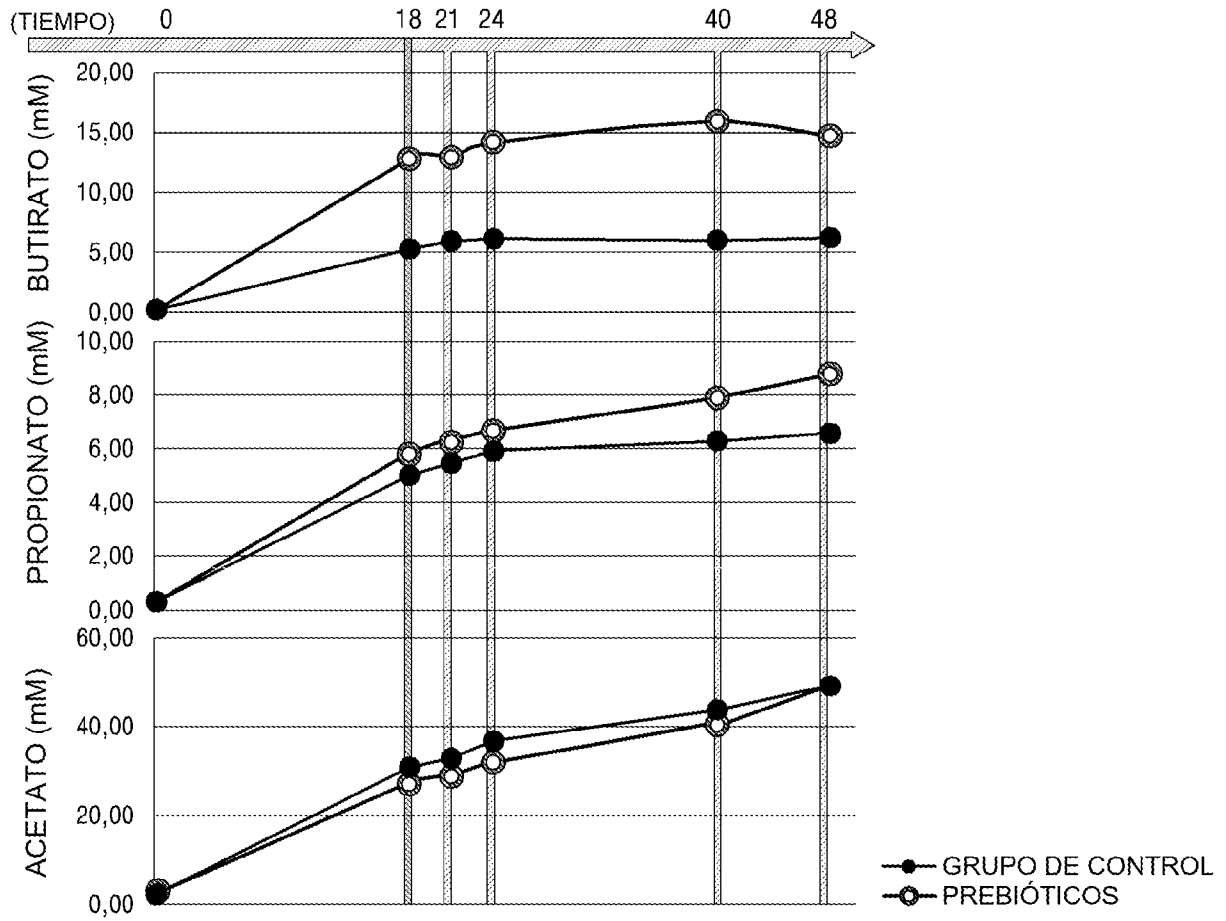


FIG. 7

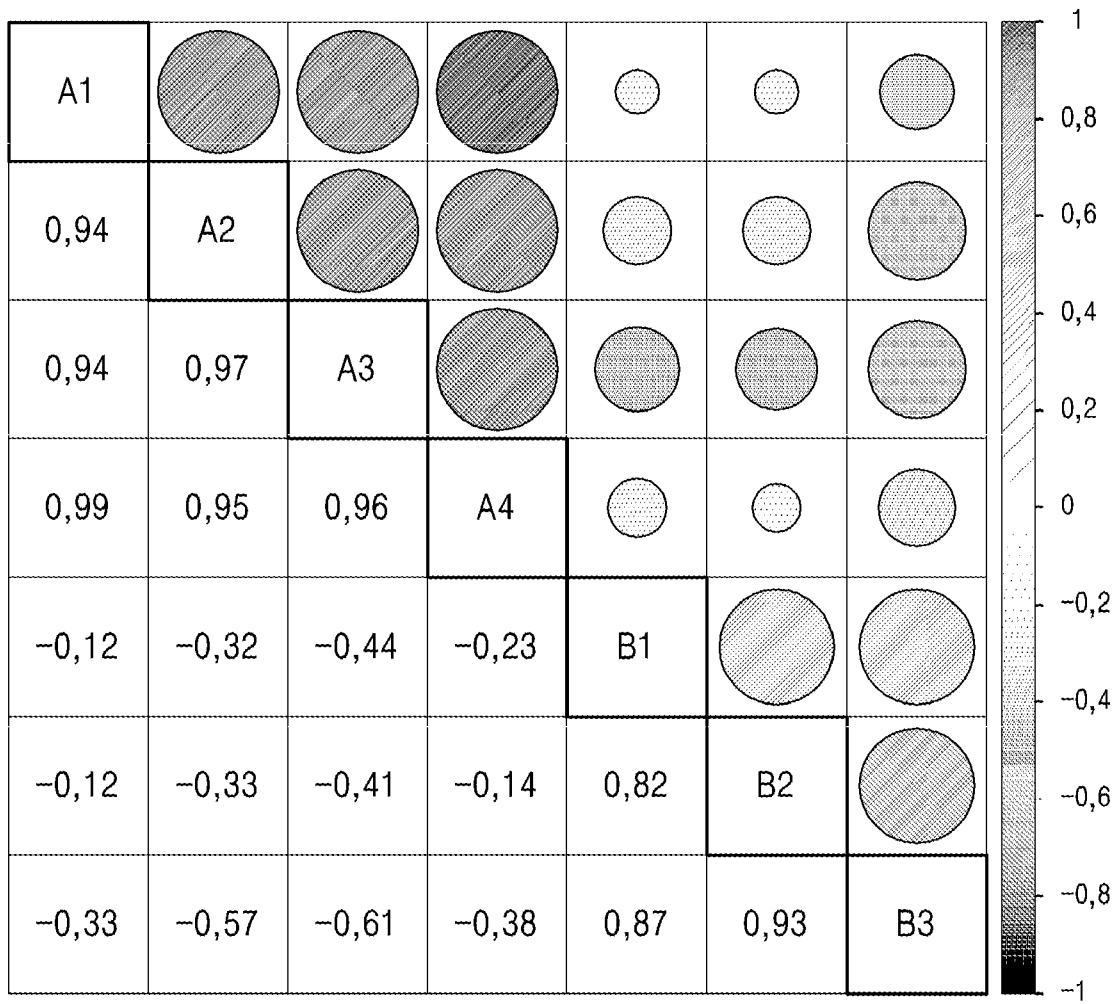


FIG. 8

CRIBADO DE PMAS USANDO UNA MUESTRA DE HECES DE CADA PERSONA RECOGIDAS ANTES DE LA INGESTA DE LOS PROBIÓTICOS A



	AUMENTO DE SCFA ▲	DISMINUCIÓN DE SCFA ▼
1	11	1
9	3	9
10	14	10

12 PERSONAS

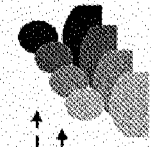


EL AUMENTO/DISMINUCIÓN DE SCFA EN LAS HECES DESPUÉS DE LA INGESTA DE A EN COMPARACIÓN CON ANTES DE LA INGESTA DE A AUMENTA EN SCFA ▲

12 PERSONAS



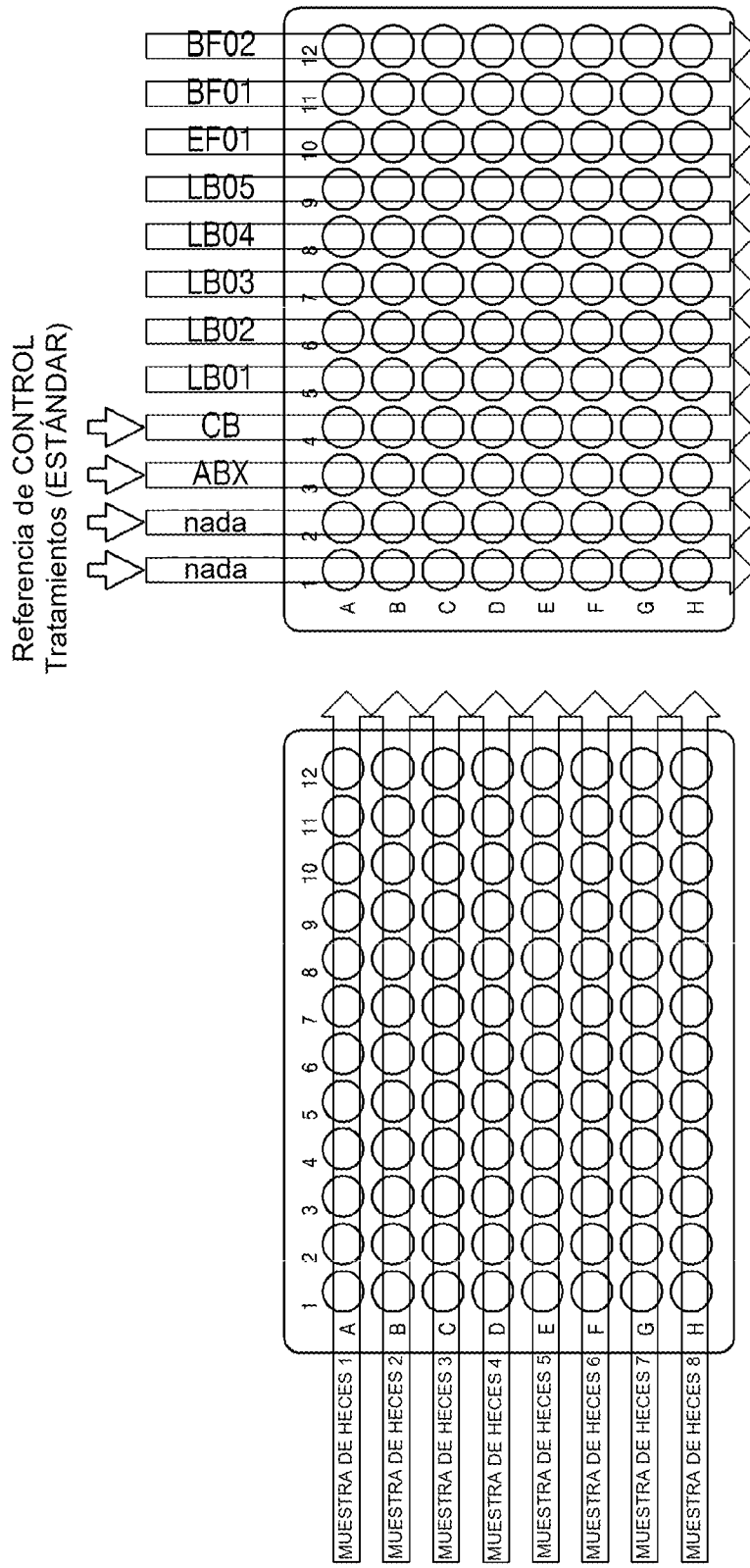
EL AUMENTO/DISMINUCIÓN EN SCFA EN LAS HECES DESPUÉS DE LA INGESTA DE A EN COMPARACIÓN CON ANTES DE LA INGESTA DE A DISMINUYE EN SCFA ▼



PROBIÓTICOS A
(MATERIAL CANDIDATO DE MEJORA DE LA MICROBIOTA)

1. CASO DE AUMENTO REAL EN EL SCFA CUANDO EL SCFA AUMENTA DE ACUERDO CON EL PMAS $11/14 = 0.79$
2. CASO DE DISMINUCIÓN REAL EN EL SCFA CUANDO EL SCFA DISMINUYE DE ACUERDO CON EL PMAS $9/10 = 0.9$

FIG. 9



MEZCLA DE ANTIBIÓTICOS ABX; CB *Clostridium butyricum* MIYARI 588; cepas de LB *Lactobacillus*; cepa de EF *Enterococcus faecium*; cepas de BF *Bifidobacterium*

FIG. 10

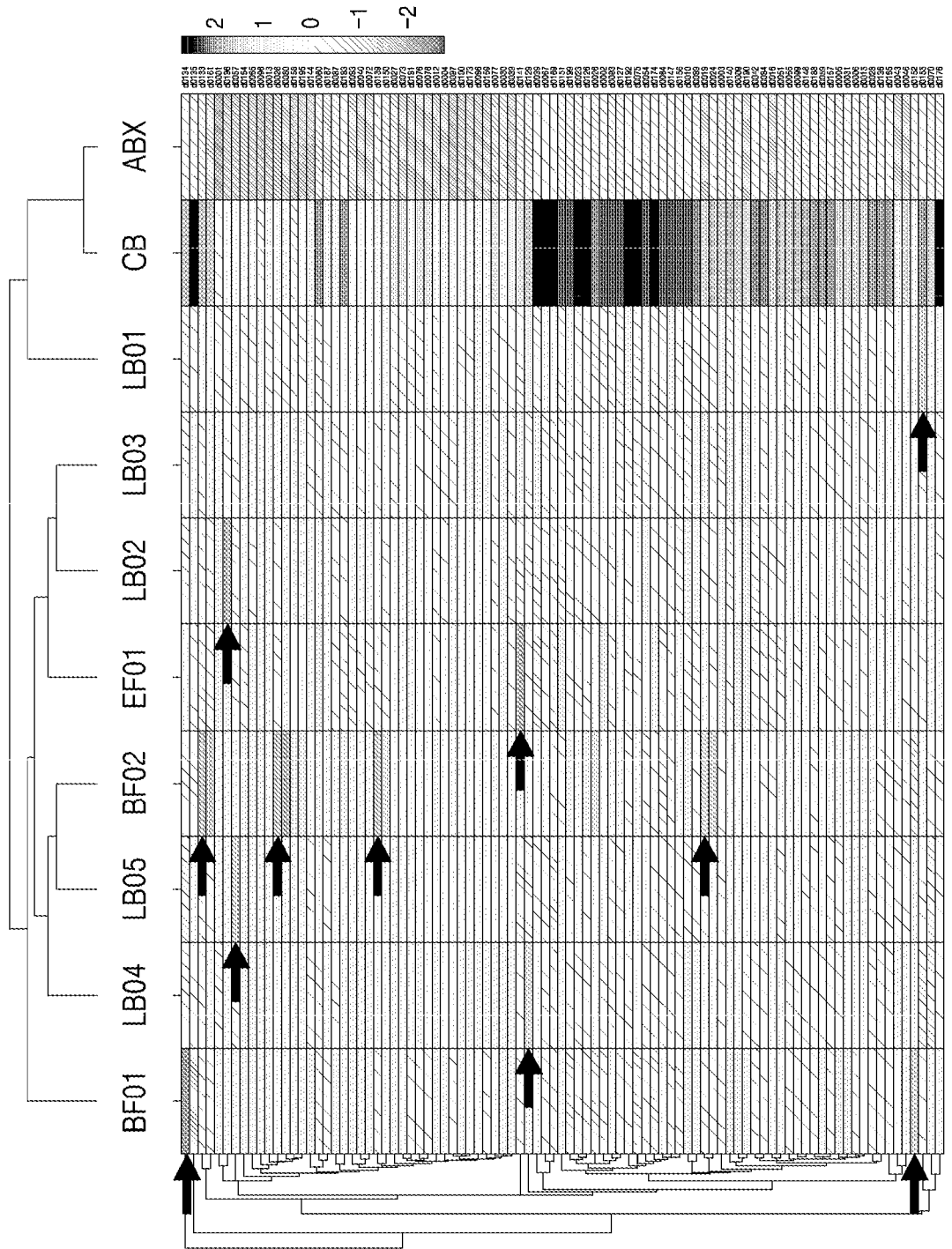


FIG. 11

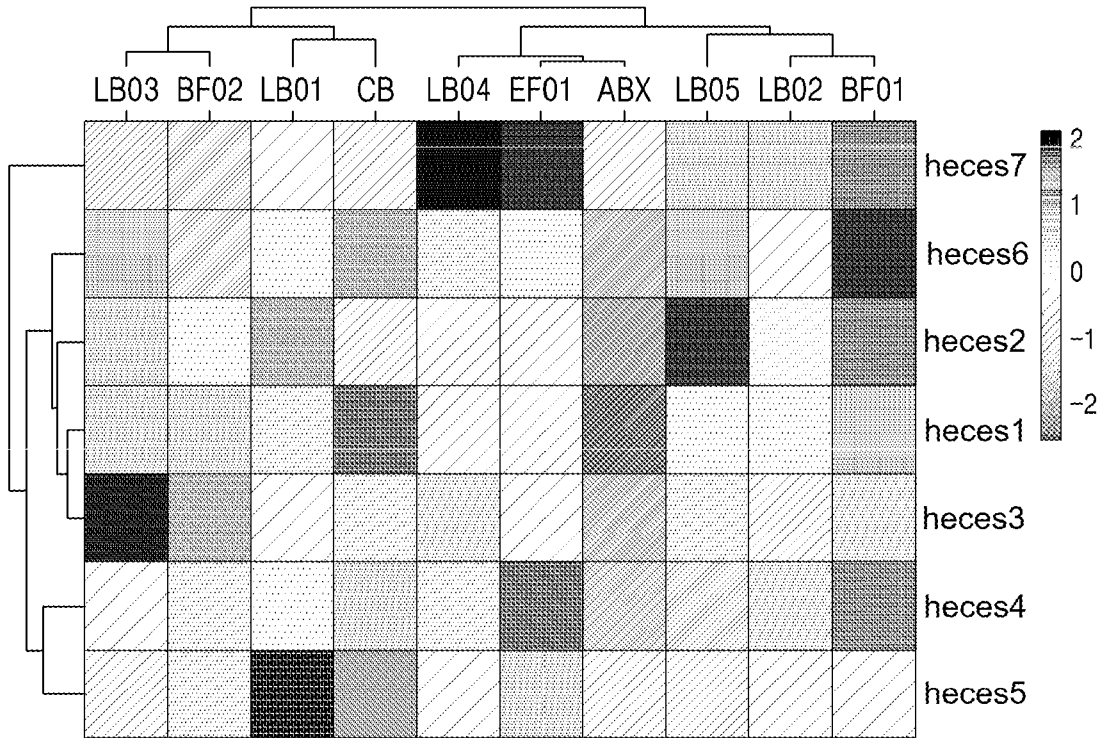


FIG. 12B

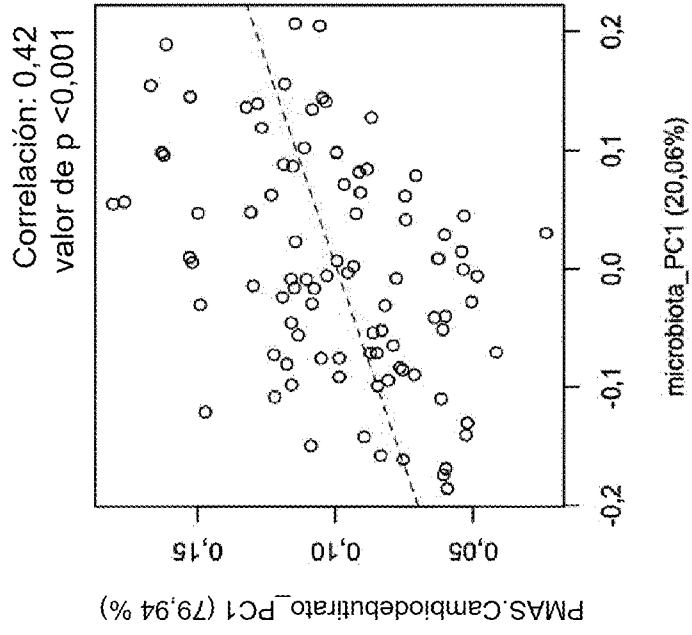


FIG. 12A

* CORRELACIÓN ENTRE LA COMPOSICIÓN MICROBIANA EN LA MUESTRA DE HECES INICIAL ANTES DE LA EJECUCIÓN DE PMAS Y UN CAMBIO EN LA CANTIDAD DE BUTIRATO DESPUES DE LA EJECUCIÓN DE PMAS

