

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 358**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/38 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2019 PCT/US2019/059724**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2020 WO20096992**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2019 E 19881475 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2024 EP 3891267**

54 Título: **Composiciones microbianas que comprenden elagitanino y métodos de uso**

30 Prioridad:

05.11.2018 US 201862755880 P
02.10.2019 US 201962909736 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2024

73 Titular/es:

MARVELBIOME, INC. (100.0%)
8 Cabot Road, Suite 3500
Woburn, MA 01801, US

72 Inventor/es:

JAYAMANI, ELAMPARITHI;
GOVINDAN, JOTHI AMARANATH y
CHATTER, PRITI H.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 981 358 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

Composiciones microbianas que comprenden elagitanino y métodos de uso

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 Esta solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/909.736, presentada el 2 de octubre de 2019 y la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/755.880, presentada el 5 de noviembre de 2018.

Antecedentes

Los compuestos de polifenoles vegetales son una fuente dietética de antioxidantes, implicados en una serie de beneficios para la salud, incluyendo actividades antiinflamatorias y anticancerosas.

- 10 US 2009/0123979 A1 divulga métodos para producir un material celulósico reducido en un tanino, que comprenden tratar el material celulósico con una cantidad efectiva de una tanasa para reducir el efecto inhibitor del tanino sobre la sacarificación enzimática del material celulósico. US 2009/0123979 A1 también divulga métodos para sacarificar un material celulósico y métodos para producir un producto de fermentación.

Sumario

La invención es como se define en las reivindicaciones 1-15.

- 15 La presente divulgación reconoce que los metabolitos de elagitaninos incluyendo urolitinas (por ejemplo, urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D y/o isourolitina A), pueden ser beneficiosos para la salud de, por ejemplo, mamíferos, por ejemplo, seres humanos. Sin embargo, generalmente se entiende en la técnica que los metabolitos de elagitaninos tienen baja biodisponibilidad. La presente divulgación proporciona la idea de que ciertos microbios, por ejemplo, los que expresan una o más enzimas de elagitaninos, se pueden proporcionar en combinación con una composición de elagitaninos. Entre otras cosas, la presente divulgación proporciona que una combinación de microbios que expresan una o más enzimas de elagitanino y una composición de elagitanino puede aumentar la biodisponibilidad de metabolitos de elagitaninos incluyendo urolitinas (por ejemplo, urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D y/o isourolitina A).

- 20 En la invención, una combinación proporcionada en la presente memoria comprende una composición de elagitanino y una composición enzimática. En la invención, la composición enzimática comprende una o más enzimas de elagitanino.

- En la invención, la una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima tanino acil hidrolasa, una enzima galato descarboxilasa, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima tanino acil hidrolasa. En algunas realizaciones, una enzima tanino acil hidrolasa es o incluye una enzima tanasa *tanB*. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima galato descarboxilasa. En algunas realizaciones, una enzima galato descarboxilasa es o incluye una enzima galato descarboxilasa *lpdB*. En algunas realizaciones, una enzima galato descarboxilasa es o incluye una enzima galato descarboxilasa *lpdC*. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima galato descarboxilasa *lpdB* y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima tanasa *tanB*, una enzima galato descarboxilasa *lpdB*, y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*.

- 40 En la invención, la composición enzimática comprende un microbio sintetizador de enzima de elagitanino (EES) o un extracto del mismo. En algunas realizaciones, un microbio EES se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones, un microbio EES es un microbio EES modificado por ingeniería. En algunas realizaciones, un microbio EES modificado por ingeniería comprende una alteración genética con respecto a un microbio de referencia por lo demás comparable, de manera que el microbio EES modificado por ingeniería produce la una o más enzimas de elagitanino a un nivel absoluto o relativo diferente del microbio de referencia.

En la invención, el microbio EES es *Lactobacillus plantarum*.

En algunas realizaciones, un microbio EES es viable o está vivo. En algunas realizaciones, un microbio EES se liofiliza.

- 45 En algunas realizaciones, una combinación incluye una cantidad suficiente de un microbio EES para colonizar el microbioma de un sujeto.

- En algunas realizaciones, una composición de elagitanino comprende un extracto vegetal de granada, fresa, frambuesa, arándano, mora, mora de los pantanos, mora ártica, uvas muscadina, guayaba, una fruta de la familia *Myrtaceae*, nuez, pacana, castaña, anacardo, almendra, pistacho, avellana, nuez de Brasil, vino tinto de macadamia envejecido en barriles de roble, zumo de uvas de muscadina, zumo de granada, té, coñac, grosella de la India, hongo de bistec, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una combinación incluye una cantidad de una composición de elagitanino suficiente para inducir la expresión, actividad o ambas de una o más enzimas de elagitanino en el microbio EES.

En algunas realizaciones, una composición de elagitanino y una o más enzimas de elagitanino están presentes en una cantidad efectiva para promover la producción de urolitina en un sujeto.

5 En algunas realizaciones, una combinación comprende un prebiótico. En algunas realizaciones, una combinación comprende un fructooligosacárido, una inulina, un isomaltooligosacárido, un lactilol, una lactosacarosa, una lactulosa, un oligosacárido de soja, un transgalactooligosacárido, un xilooligosacárido o una combinación de los mismos.

10 En algunas realizaciones, una composición de elagitanino, una composición enzimática, o ambas pueden formularse para administración oral. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino, una composición enzimática, o ambas pueden ser un alimento, una bebida, una composición de pienso o un suplemento nutricional. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino, una composición enzimática, o ambas pueden ser un líquido, jarabe, comprimido, pastilla, goma, cápsula, polvo, gel o película.

En algunas realizaciones, se formula una combinación para administración oral. En algunas realizaciones, una combinación es un alimento, una bebida, una composición de pienso o un suplemento nutricional. En algunas realizaciones, una combinación es un líquido, jarabe, comprimido, pastilla, goma, cápsula, polvo, gel o película.

15 En algunas realizaciones, una combinación comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una combinación es una formulación con recubrimiento entérico.

La presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar una combinación divulgada en la presente memoria a un sujeto.

20 La presente divulgación proporciona métodos, que no forman parte de la invención reivindicada, que comprenden administrar a un sujeto una composición de elagitanino, una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino, o una combinación como se divulga en la presente memoria de modo que el sujeto esté recibiendo una combinación divulgada en la presente memoria.

25 En algunas realizaciones, un método es un método para disminuir la formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método es un método para disminuir una cantidad de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, los agregados polipeptídicos son agregados de polipéptido que comprenden una región poliQ (es decir, agregados poliQ). En algunas realizaciones, una región poliQ comprende al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 glutaminas. En algunas realizaciones, una célula es o comprende neuronas. En algunas realizaciones, una célula es o comprende tejido del sistema nervioso central.

30 En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido con un nivel de referencia de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, se determina un nivel de referencia en una célula o tejido de un sujeto al que no se le ha administrado una composición de elagitanino, una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino, o una combinación como se divulga en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método
35 comprende, antes de la administración, determinar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende, después de la administración, determinar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado antes de la administración con un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado después de la administración.
40

45 En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido con un nivel de referencia de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, se determina un nivel de referencia en una célula o tejido de un sujeto al que no se le ha administrado una composición de elagitanino, una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino, o una combinación como se divulga en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método comprende, antes de la administración, determinar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método
50 comprende, después de la administración, determinar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado antes de la administración con un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado después de la administración.

En algunas realizaciones, un método es un método para modificar un nivel de una o más urolitinas producidas en el intestino del sujeto.

55 En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de la una o más urolitinas producidas en el intestino del sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende comparar el nivel de cada una de una o más urolitinas producidas en el intestino del sujeto con un nivel de referencia correspondiente.

- En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de una o más urolitinas producidas en el plasma de un sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende comparar el nivel de una o más urolitinas en el plasma de un sujeto con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es una concentración de una urolitina en plasma, por ejemplo, 0,2-20 μM (Espin JC, Larrosa M, Garcia-Connea MT, Tomás-Barberán F. Biological significance of urolitins, the gut microbial elagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:270418. doi:10.1155/2013/270418). En algunas realizaciones, un nivel de referencia es una concentración de urolitina en plasma de al menos 0,1 μM , al menos 0,2 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM , al menos 5 μM , al menos 10 μM o al menos 15 μM . En algunas realizaciones, un nivel de referencia es una concentración de urolitina en plasma de al menos 0,5 μM , como máximo 1 μM , como máximo 5 μM , como máximo 10 μM , como máximo 15 μM , como máximo 20 μM , o como máximo 25 μM .
- En algunas realizaciones, un nivel de referencia, ya sea en el intestino o plasma, es un nivel de referencia histórico de una urolitina, un nivel de urolitina en el intestino del sujeto antes de recibir una combinación, o un nivel de urolitina en el intestino de un sujeto comparable que no ha recibido una combinación.
- En algunas realizaciones, un método es un método para aumentar una cantidad de una urolitina producida en el intestino del sujeto. En algunas realizaciones, una urolitina es urolitina A (3,8-dihidroxiurolitina), urolitina C (3,8,9 trihidroxiurolitina), isourolitina A (3,9 dihidroxiurolitina), urolitina B (3-hidroxiurolitina), urolitina D (3,4,8,9-tetrahidroxiurolitina) o una combinación de las mismas.
- En algunas realizaciones, un método comprende determinar un indicador de la función mitocondrial en el sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de mitofagia en un sujeto.
- En algunas realizaciones, un método es un método para modificar un nivel de expresión o un nivel de actividad de Nrf2 en una célula o tejido de un sujeto. En algunas realizaciones, un método es un método para aumentar el nivel de expresión o el nivel de actividad de Nrf2 en la célula o tejido del sujeto.
- En algunas realizaciones, un método comprende determinar el nivel de expresión o el nivel de actividad del factor respiratorio nuclear-2 (Nrf2) en la célula o tejido del sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende comparar el nivel de expresión o el nivel de actividad de Nrf2 en la célula o tejido con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es un nivel histórico de expresión o actividad de Nrf2, un nivel de expresión o un nivel de actividad del factor respiratorio nuclear-2 (Nrf2) en una célula o tejido comparable del sujeto antes de recibir la combinación, o un nivel de expresión o un nivel de actividad del factor respiratorio nuclear-2 (Nrf2) en una célula o tejido comparable de un sujeto comparable que no ha recibido la combinación. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de expresión o un nivel de actividad de un gen regulado por la expresión de Nrf2 en una célula o tejido del sujeto.
- En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de uno o más antioxidantes en una célula o tejido del sujeto. En algunas realizaciones, una célula o tejido de un sujeto comprende una célula hepática o tejido hepático. En algunas realizaciones, un método comprende medir un indicador de salud o función hepática en un sujeto.
- En algunas realizaciones, un método es un método para aumentar la biodisponibilidad de una composición de elagitanino para un sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de biodisponibilidad de un elagitanino de la composición de elagitanino en el intestino de un sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende comparar el nivel de biodisponibilidad del elagitanino de la composición de elagitanino en el intestino del sujeto con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es un nivel de referencia de biodisponibilidad histórico para un elagitanino, un nivel de biodisponibilidad de un elagitanino en el intestino del sujeto antes de recibir una combinación; o un nivel de biodisponibilidad de un elagitanino en el intestino de un sujeto comparable que no ha recibido la combinación.
- En algunas realizaciones, un método es un método para tratar una afección o trastorno asociado con disfunción mitocondrial en un sujeto.
- En algunas realizaciones, un método es un método para tratar una afección, enfermedad o trastorno hepático en un sujeto.
- En algunas realizaciones, un método es un método para aumentar la vida útil viable de un producto probiótico que comprende un microbio EES, que comprende añadir una composición de elagitanino al producto probiótico, donde el microbio EES expresa una o más enzimas de elagitanino.
- En la invención, la una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima tanino acil hidrolasa, una enzima galato descarboxilasa, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima tanino acil hidrolasa. En algunas realizaciones, una enzima tanino acil hidrolasa es o incluye una enzima tanasa *tanB*. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima galato descarboxilasa. En algunas realizaciones, una enzima galato descarboxilasa es o incluye una enzima galato descarboxilasa *lpdB*. En algunas realizaciones, una enzima galato descarboxilasa es o incluye una enzima galato descarboxilasa *lpdC*. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima galato descarboxilasa *lpdB* y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*. En algunas realizaciones, una o más

enzimas de elagitanino comprenden una enzima tanasa *tanB*, una enzima galato descarboxilasa *lpdB*, y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*.

5 En la invención, la composición enzimática comprende un microbio sintetizador de enzima de elagitanino (EES) o un extracto del mismo. En algunas realizaciones, un microbio EES se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones, un microbio EES es un microbio EES modificado por ingeniería. En algunas realizaciones, un microbio EES modificado por ingeniería comprende una alteración genética con respecto a un microbio de referencia por lo demás comparable, de manera que el microbio EES modificado por ingeniería produce la una o más enzimas de elagitanino a un nivel absoluto o relativo diferente del microbio de referencia.

En la invención, el microbio EES es *Lactobacillus plantarum*.

10 En algunas realizaciones, un microbio EES es viable o está vivo. En algunas realizaciones, un microbio EES se liofiliza.

En algunas realizaciones, un microbio EES modificado por ingeniería comprende una alteración genética con respecto a un microbio de referencia por lo demás comparable, de manera que produce una o más enzimas de elagitanino a un nivel absoluto o relativo diferente del microbio de referencia.

15 En algunas realizaciones, una composición de elagitanino comprende un extracto vegetal de granada, fresa, frambuesa, arándano, mora, mora de los pantanos, mora ártica, uvas muscadina, guayaba, una fruta de la familia *Myrtaceae*, nuez, pacana, castaña, anacardo, almendra, pistacho, avellana, nuez de Brasil, vino tinto de macadamia envejecido en barriles de roble, zumo de uvas de muscadina, zumo de granada, té, coñac, grosella de la India, hongo de bistec, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino comprende un suplemento que contiene uno o más elagitaninos o ácidos elágicos. En algunas realizaciones, una combinación incluye
20 una cantidad de una composición de elagitanino suficiente para inducir la expresión, actividad o ambas de una o más enzimas de elagitanino en el microbio EES.

En algunas realizaciones, una composición de elagitanino y una o más enzimas de elagitanino están presentes en una cantidad efectiva para promover la producción de urolitina en un sujeto.

25 En algunas realizaciones, un método comprende añadir un prebiótico. En algunas realizaciones, un prebiótico comprende un fructooligosacárido, una inulina, un isomaltooligosacárido, un lactilol, una lactosacarosa, una lactulosa, un oligosacárido de soja, un transgalactooligosacárido, un xilooligosacárido o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, se puede formular una composición probiótica para administración oral. En algunas realizaciones, una composición probiótica puede ser un alimento, una bebida, una composición de pienso o un suplemento nutricional. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino, una composición enzimática, o
30 ambas pueden ser un líquido, jarabe, comprimido, pastilla, goma, cápsula, polvo, gel o película. En algunas realizaciones, una composición probiótica es una formulación con recubrimiento entérico.

La presente divulgación proporciona un producto probiótico, que no forma parte de la invención reivindicada, que comprende un microbio EES que expresa una o más enzimas de elagitanino. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima tanino acil hidrolasa. En algunas realizaciones, una enzima
35 tanino acil hidrolasa es o incluye una enzima tanasa *tanB*. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino pueden comprender una enzima galato descarboxilasa. En algunas realizaciones, una enzima galato descarboxilasa es o incluye una enzima galato descarboxilasa *lpdB*. En algunas realizaciones, una enzima galato descarboxilasa es o incluye una enzima galato descarboxilasa *lpdC*. En algunas realizaciones, una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima galato descarboxilasa *lpdB* y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*. En algunas
40 realizaciones, una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima tanasa *tanB*, una enzima galato descarboxilasa *lpdB*, y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*.

En algunas realizaciones, un microbio EES se encuentra en la naturaleza. En algunas realizaciones, un microbio EES es un microbio EES modificado por ingeniería. En algunas realizaciones, un microbio EES modificado por ingeniería comprende una alteración genética con respecto a un microbio de referencia por lo demás comparable, de manera
45 que el microbio EES modificado por ingeniería produce la una o más enzimas de elagitanino a un nivel absoluto o relativo diferente del microbio de referencia.

En la invención, un microbio EES es un miembro de la familia *Lactobacillaceae*. En la invención, un miembro de la familia *Lactobacillaceae* es una especie de *L. plantarum*.

En algunas realizaciones, un microbio EES es viable o está vivo. En algunas realizaciones, un microbio EES se liofiliza.

50 En algunas realizaciones, un microbio EES modificado por ingeniería comprende una alteración genética con respecto a un microbio de referencia por lo demás comparable, de manera que produce la una o más enzimas de elagitanino a un nivel absoluto o relativo diferente del microbio de referencia.

En algunas realizaciones, un probiótico comprende un prebiótico. En algunas realizaciones, un prebiótico comprende un fructooligosacárido, una inulina, un isomaltooligosacárido, un lactilol, una lactosacarosa, una lactulosa, un oligosacárido de soja, un transgalactooligosacárido, un xilooligosacárido o una combinación de los mismos.

- 5 En algunas realizaciones, se formula un producto probiótico para la administración oral. En algunas realizaciones, un producto probiótico es un alimento, una bebida, una composición de pienso o un suplemento nutricional. En algunas realizaciones, un producto probiótico es un líquido, jarabe, comprimido, pastilla, goma, cápsula, polvo, gel o película.

En algunas realizaciones, un producto probiótico es una formulación con recubrimiento entérico.

Los siguientes métodos y usos no forman parte de la invención reivindicada, pero se consideran útiles para comprender la invención.

- 10 La presente divulgación proporciona un método de fabricación de un producto probiótico que comprende un microbio EES, que comprende añadir una composición de elagitanino al producto probiótico, donde el microbio EES expresa una o más enzimas de elagitanino.

- 15 En algunas realizaciones, un método comprende añadir un prebiótico. En algunas realizaciones, un prebiótico comprende un fructooligosacárido, una inulina, un isomaltooligosacárido, un lactilol, una lactosacarosa, una lactulosa, un oligosacárido de soja, un transgalactooligosacárido, un xilooligosacárido o una combinación de los mismos.

La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para modular un nivel de urolitina producida en el intestino de un sujeto.

La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para regular la función mitocondrial en un sujeto.

- 20 La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para modular un nivel de mitofagia en un sujeto.

La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para modular un nivel de expresión o un nivel de actividad de Nrf2 en una célula o tejido de un sujeto.

- 25 La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para modular un nivel de expresión o un nivel de actividad de un gen regulado por la expresión de Nrf2 en una célula o tejido de un sujeto.

- 30 La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para modular un nivel de uno o más antioxidantes en una célula o tejido de un sujeto. En algunas realizaciones, una célula o tejido de un sujeto comprende una célula hepática o tejido hepático. La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para mejorar la salud o función hepática en un sujeto.

La presente divulgación proporciona usos de una combinación divulgada en la presente memoria para aumentar un nivel de biodisponibilidad de un elagitanino en el intestino de un sujeto.

Estos, y otros aspectos abarcados por la presente divulgación, se describen con más detalle a continuación y en las reivindicaciones.

35 Definiciones

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones adjuntas a la presente memoria y no está limitado por ciertas realizaciones descritas en la presente memoria. En general, los términos usados en la presente memoria están de acuerdo con su significado entendido en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario. A continuación se proporcionan definiciones explícitas de ciertos términos; los significados de estos y otros términos en casos particulares a lo largo de esta memoria descriptiva resultarán claros para los expertos en la técnica a partir del contexto.

- 45 El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de un elemento de reivindicación sobre otro o el orden temporal en el que se realizan las acciones de un método, sino que se usan simplemente como etiquetas para distinguir un elemento de reivindicación que tiene un cierto nombre de otro elemento que tiene un mismo nombre (pero para el uso del término ordinal) para distinguir los elementos de reivindicación.

- 50 Los artículos "un" y "una", como se usan en la presente memoria, deben entenderse que incluyen los referentes plurales a menos que se indique claramente lo contrario. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, empleados en, o relevantes de otro modo para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o sean evidentes de otro modo a partir del contexto. En algunas realizaciones, exactamente un miembro de un grupo está presente en, empleado en, o relevante de otro modo para un producto o proceso dado. En algunas

realizaciones, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o son relevantes de otro modo para un producto o proceso dado. Debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, según sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique lo contrario o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que surgiría una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas (por ejemplo, en un grupo Markush o formato similar), debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se divulga, y cualquier elemento(s) puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando las realizaciones o aspectos se denominan "que comprenden" elementos, características, etc., particulares, ciertas realizaciones o aspectos "consisten", o "consisten esencialmente en", tales elementos, características, etc. Con fines de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente en todos los casos con tantas palabras en la presente memoria. También debe entenderse que cualquier realización o aspecto puede excluirse explícitamente de las reivindicaciones, independientemente de si la exclusión específica se enumera en la memoria descriptiva.

Administración: Como se usa en la presente memoria, el término "administración" se refiere típicamente a la administración de una composición a un sujeto o sistema para lograr el suministro de un agente al sujeto o sistema. En algunas realizaciones, el agente es, o está incluido en, la composición; en algunas realizaciones, el agente se genera a través del metabolismo de la composición o uno o más componentes de la misma. Los expertos en la técnica serán conscientes de una variedad de vías que pueden, en circunstancias apropiadas, utilizarse para la administración a un sujeto, por ejemplo, un ser humano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la administración puede ser ocular, oral, parenteral, tópica, etc. En algunas realizaciones particulares, la administración puede ser bronquial (por ejemplo, por instilación bronquial), bucal, dérmica (que puede ser o comprender, por ejemplo, una o más de tópica en la dermis, intradérmica, intradérmica, transdérmica, etc), entérica, intraarterial, intradérmica, intragástrica, intramedular, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intraventricular, dentro de un órgano específico (por ejemplo, intrahepática), mucosal, nasal, oral, rectal, subcutánea, sublingual, tópica, traqueal (por ejemplo, por instilación intratraqueal), vaginal, vítea, etc. En muchas realizaciones proporcionadas por la presente divulgación, la administración es administración oral. En algunas realizaciones, la administración puede implicar solo una dosis única. En algunas realizaciones, la administración puede implicar la aplicación de un número fijo de dosis. En algunas realizaciones, la administración puede implicar una dosificación que es intermitente (por ejemplo, una pluralidad de dosis separadas en el tiempo) y/o una dosificación periódica (por ejemplo, dosis individuales separadas por un período de tiempo común). En algunas realizaciones, la administración puede implicar una dosificación continua (por ejemplo, perfusión) durante al menos un periodo de tiempo seleccionado. La administración de células puede ser por cualquier vía apropiada que dé como resultado la administración a una ubicación deseada en un sujeto donde al menos una porción de las células administradas o componentes de las células permanecen viables. Un período de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser tan corto como unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, a unos pocos días, hasta tan largo como varios años, es decir, injerto a largo plazo. En algunas realizaciones, la administración comprende la administración de un extracto o preparación bacteriana que comprende uno o más metabolitos y/o subproductos bacterianos pero que carece de células bacterianas completamente viables.

Análogo: Como se usa en la presente memoria, el término "análogo" se refiere a una sustancia que comparte una o más características estructurales, elementos, componentes o restos particulares con una sustancia de referencia. Típicamente, un "análogo" muestra una similitud estructural significativa con la sustancia de referencia, por ejemplo, comparte una estructura central o consenso, pero también difiere en ciertas formas discretas. En algunas realizaciones, un análogo es una sustancia que puede generarse a partir de la sustancia de referencia, por ejemplo, mediante manipulación química de la sustancia de referencia. En algunas realizaciones, un análogo es una sustancia que puede generarse a través de la realización de un proceso sintético sustancialmente similar a (por ejemplo, que comparte una pluralidad de etapas con) uno que genera la sustancia de referencia. En algunas realizaciones, un análogo es o puede generarse a través de la realización de un proceso sintético diferente del usado para generar la sustancia de referencia.

Aproximadamente: Como se aplica a uno o más valores de interés, incluye un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" se refiere a un intervalo de valores que caen dentro de $\pm 10\%$ (mayor o menor que) del valor de referencia indicado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

Biodisponibilidad de elagitaninos: Como se usa en la presente memoria, el término "biodisponibilidad de elagitaninos" se refiere a una cantidad de elagitaninos o productos de su hidrólisis que se absorben en la circulación sistémica de una composición de elagitaninos. Una cantidad de elagitaninos puede determinarse midiendo una cantidad de productos de hidrólisis de elagitaninos presentes en muestras de sangre, plasma u orina. Además, los elagitaninos biodisponibles pueden ser metabolizados en un sujeto a, por ejemplo, urolitina. Como tal, la biodisponibilidad de elagitaninos puede determinarse indirectamente evaluando una cantidad de urolitinas en la circulación sistémica (por ejemplo, sangre, plasma, etc.) o excretadas por los riñones (por ejemplo, orina). Por tanto, puede determinarse un cambio en la biodisponibilidad (por ejemplo, aumento) de una composición de elagitanino dada evaluando los niveles de urolitina en presencia de una composición o combinación de elagitanino como se describe

en la presente memoria. En algunas realizaciones, los niveles de urolitina se pueden comparar, por ejemplo, con los de un sujeto antes del inicio del tratamiento con la composición.

Comparable: Como se usa en la presente memoria, el término "comparable" se refiere a dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, sujetos, etc., que pueden no ser idénticos entre sí pero que son suficientemente similares para permitir la comparación entre los mismos de modo que un experto en la técnica apreciará que pueden extraerse conclusiones razonablemente basándose en diferencias o similitudes observadas. En algunas realizaciones, los conjuntos comparables de condiciones, circunstancias, individuos o poblaciones se caracterizan por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y una o un pequeño número de características variadas. Los expertos en la técnica entenderán, en contexto, qué grado de identidad se requiere en cualquier circunstancia dada para que dos o más de tales agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etc. se consideren comparables. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán que los conjuntos de circunstancias, individuos o poblaciones son comparables entre sí cuando se caracterizan por un número y tipo suficientes de características sustancialmente idénticas para garantizar una conclusión razonable de que las diferencias en los resultados obtenidos o fenómenos observados bajo o con diferentes conjuntos de circunstancias, individuos o poblaciones son causadas por o son indicativas de la variación en esas características que varían.

Conservativa: Como se usa en la presente memoria, se refiere a casos cuando se describe una sustitución de aminoácidos conservativa, que incluye una sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácidos conservativa no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor para unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: cadenas laterales alifáticas tales como glicina (Gly, G), alanina (Ala, A), valina (Val, V), leucina (Leu, L) e isoleucina (Ile, I); cadenas laterales alifáticas con hidroxilo tales como serina (Ser, S) y treonina (Thr, T); cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina (Asn, N) y glutamina (Gln, Q); cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y) y triptófano (Trp, W); cadenas laterales básicas tales como lisina (Lys, K), arginina (Arg, R) e histidina (His, H); cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E); y cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína (Cys, C) y metionina (Met, M). Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativa incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina (Val/Leu/Ile, V/L/I), fenilalanina/tirosina (Phe/Tyr, F/Y), lisina/arginina (Lys/Arg, K/R), alanina/valina (Ala/Val, A/V), glutamato/aspartato (Glu/Asp, E/D) y asparagina/glutamina (Asn/Gln, N/Q). En algunas realizaciones, una sustitución de aminoácidos conservativa puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, mutagénesis por barrido de alanina. En algunas realizaciones, se realiza una sustitución conservativa que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250 divulgada en Gonnet, G.H. et al., 1992, Science 256:1443-1445. En algunas realizaciones, una sustitución es una sustitución moderadamente conservativa en la que la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica de PAM250.

SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS CONSERVATIVAS		
Para Aminoácido	Código	Reemplazar con
Alanina	A	D-ala, Gly, Aib, β -Ala, Acp, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido Aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido Glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala, Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met

SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS CONSERVATIVAS		
Para Aminoácido	Código	Reemplazar con
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, AdaA, AdaG, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4 ó 5-fenilprolina, AdaA, AdaG, cis-3,4 ó 5-fenilprolina, Bpa, D-Bpa
Prolina	P	D-Pro, ácido L-l-tioazolidin-4-carboxílico, ácido D-o-L-1-oxazolidin-4-carboxílico (Kauer, Pat. de EE. UU. No. (4.511.390)
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, alo-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, alo-Thr, Met, D-Met, Met (O), D-Met (O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met, AdaA, AdaG

Control: Como se usa en la presente memoria, se refiere al significado entendido en la técnica de un "control" siendo un estándar frente al que se comparan los resultados. Típicamente, se usan controles para aumentar la integridad en experimentos aislando variables con el fin de llegar a una conclusión sobre tales variables. En algunas realizaciones, un control es una reacción o ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción o ensayo de prueba para proporcionar un comparador. Un "control" también incluye "animal de control". Un "animal de control" puede tener una modificación como se describe en la presente memoria, una modificación que es diferente a como se describe en la presente memoria, o ninguna modificación (es decir, un animal de tipo salvaje). En un experimento, se aplica un "ensayo" (es decir, una variable que se está ensayando). En un segundo experimento, "control", no se aplica la variable que se está ensayando. En algunas realizaciones, un control es un control histórico (es decir, de una prueba o ensayo realizado previamente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). En algunas realizaciones, un control es o comprende un registro impreso o guardado de otro modo. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

Determinación, medición, evaluación, valoración, ensayo y análisis: La determinación, medición, evaluación, valoración, ensayo y análisis se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a cualquier forma de medición, e incluyen determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. El ensayo puede ser relativo o absoluto. El "ensayo para determinar la presencia de" puede ser determinar la cantidad de algo presente y/o determinar si está o no presente o ausente.

Forma de dosificación: Los expertos en la técnica apreciarán que el término "forma de dosificación" puede usarse para referirse a una unidad físicamente discreta de un agente (por ejemplo, un agente terapéutico) para la administración a un sujeto. Típicamente, cada una de tales unidades contiene una cantidad predeterminada de agente. En algunas realizaciones, dicha cantidad es una cantidad de dosificación unitaria (o una fracción completa de la misma) apropiada para la administración de acuerdo con un régimen de dosificación que se ha determinado que se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante (es decir, con un régimen de dosificación terapéutica). Los expertos en la técnica apreciarán que la cantidad total de una composición o agente terapéutico administrado a un sujeto particular es determinada por uno o más médicos asistentes y puede implicar la administración de múltiples formas de dosificación.

Régimen de dosificación: Los expertos en la técnica apreciarán que el término "régimen de dosificación" puede usarse para referirse a un conjunto de dosis unitarias (típicamente más de una) que se administran individualmente a un sujeto, típicamente separadas por períodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente dado tiene un régimen de dosificación recomendado, que puede implicar una o más dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis, cada una de las cuales está separada en el tiempo de otras dosis. En algunas realizaciones, las dosis individuales están separadas entre sí por un período de tiempo de la misma duración;

en algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una pluralidad de dosis y al menos dos períodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. En algunas realizaciones, todas las dosis dentro de un régimen de dosificación son de la misma cantidad de dosis unitaria. En algunas realizaciones, diferentes dosis dentro de un régimen de dosificación son de diferentes cantidades. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida de una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguido de una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis igual a la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, un régimen de dosificación se correlaciona con un resultado deseado o beneficioso cuando se administra a una población relevante.

Enriquecido en elagitanino: Como se usa en la presente memoria, el término "enriquecido en elagitanino" se refiere a un material obtenido procesando uno o más materiales vegetales, en el que la fracción de uno o más elagitaninos aumenta con respecto a la fracción del uno o más elagitaninos en el o los materiales vegetales antes del procesamiento. El enriquecimiento puede ser, por ejemplo, de al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces o más.

Composición de elagitanino: Como se usa en la presente memoria, "composición de elagitanino" se refiere a una composición que comprende uno o más compuestos de elagitanino. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino se refiere a una sustancia enriquecida en elagitanino. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino comprende extracto de granada. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino se produce procesando uno o más materiales vegetales que comprenden uno o más compuestos de elagitanino preparados por una o más plantas. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino incluye zumo de un fruto que produce un compuesto de elagitanino, un homogeneizado de un fruto u otro material (por ejemplo, piel, monda, cáscara, etc.) de una planta que produce un compuesto de elagitanino, un extracto de un material de una planta que produce un compuesto de elagitanino, o una fracción enriquecida en elagitanino de un zumo, homogeneizado o extracto de una planta que produce un compuesto de elagitanino. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino comprende un suplemento que contiene uno o más elagitaninos o ácidos elágicos.

Compuesto de elagitanino: Como se usa en la presente memoria, "compuesto de elagitanino" se refiere a compuestos que son miembros de una clase diversa de polifenoles y análogos estructurales de los mismos. En la naturaleza, los elagitaninos se hidrolizan a ácido elágico, que se metaboliza para producir diferentes tipos de urolitinas. Los elagitaninos comprenden una clase diversa de polifenoles de tanino vegetal hidrolizables complejos compuestos por restos de hexahidroxidifenilo esterificados a un azúcar, es decir, ésteres de hexahidroxidifenilo-glucosa, que pueden encontrarse en una variedad de alimentos tales como fresas (*Fragaria vesca*), frambuesas, moras, moras de los pantanos (*Rubus chamaemorus*), frutas de la familia *Myrtaceae*, incluyendo, pero sin limitarse a jabuticaba, cambuci, cerezas Surinam, camu-camu, guayaba roja, guayaba blanca, granada, nueces, pacanas, hongo de bistec (*Fistula hepatica*) y arándanos. Otros elagitaninos incluyen, por ejemplo, pedunculaginas, rosacianinas, filanemblininas y sanguina H6.

Enzima de elagitanino: Como se usa en la presente memoria, "enzima de elagitanino" se refiere a una enzima implicada en el metabolismo de un elagitanino a una urolitina. Las enzimas de elagitanino incluyen, pero no se limitan a: una enzima tanino acil hidrolasa (por ejemplo, una enzima tanasa *tanB*), y una enzima galato descarboxilasa (por ejemplo, una enzima galato descarboxilasa *lpdB*, una enzima galato descarboxilasa *lpdC*).

Microbio sintetizador de enzima de elagitanino: Como se usa en la presente memoria, la expresión "microbio sintetizador de enzima de elagitanino" o "microbio EES" se refiere a un microbio (por ejemplo, algas, hongos, bacterias) que expresa una o más enzimas de elagitanino. En algunas realizaciones, un microbio EES puede expresar de forma natural una o más enzimas de elagitanino. En algunas realizaciones, un microbio EES incluye una modificación de enzima de elagitanino. En algunas realizaciones, un microbio EES puede modificarse genéticamente (por ejemplo, para tener una o más alteraciones genéticas) de modo que exprese una o más enzimas de elagitanino a un nivel absoluto o relativo diferente del de un microbio de referencia por lo demás comparable que no se ha modificado genéticamente (es decir, no contiene la o las alteraciones genéticas). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un microbio EES se ha modificado por ingeniería genética para expresar una o más enzimas de elagitanino no expresadas por el microbio sin la ingeniería genética. Alternativamente, en algunas realizaciones, un microbio EES puede haber sido modificado genéticamente de manera que su expresión de una o más enzimas de elagitanino puede estar a un nivel más alto en relación con el microbio sin la ingeniería genética. En algunas realizaciones, se puede evaluar un nivel más alto en referencia a un nivel umbral; en algunas realizaciones, se puede evaluar un nivel más alto en referencia a otro compuesto (por ejemplo, otra enzima de elagitanino) también producido por el microbio (antes de la ingeniería genética). En algunas realizaciones particulares, un microbio EES puede haber sido modificado genéticamente para añadir o aumentar la expresión de uno o más genes que codifican una o más enzimas de elagitanino.

Modificación de enzimas de elagitanino: El término "modificación de enzimas de elagitanino", como se usa en la presente memoria, se refiere a una modificación de un microbio que ajusta la producción de una o más enzimas de elagitanino, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, una modificación de enzimas de elagitanino puede aumentar el nivel de producción de una o más enzimas de elagitanino, y/o puede alterar los niveles de producción relativos de diferentes enzimas de elagitanino. En principio, una modificación de enzimas de elagitanino puede ser

cualquier modificación química, fisiológica, genética u otra modificación que altere apropiadamente la producción de una o más enzimas de elagitanino producidas por un microbio en comparación con el nivel producido en un microbio por lo demás idéntico no sujeto a la misma modificación. En la mayoría de las realizaciones, sin embargo, una modificación de enzimas de elagitanino comprenderá una modificación genética, que típicamente da como resultado un aumento de la producción de una o más enzimas de elagitanino seleccionadas. En algunas realizaciones, las enzimas de elagitanino comprenden una enzima tanino acil hidrolasa (por ejemplo, una enzima tanasa *tanB*), una enzima galato descarboxilasa (por ejemplo, una enzima galato descarboxilasa *lpdB*, una enzima galato descarboxilasa *lpdC*), o una combinación de las mismas.

Modificado por ingeniería: En general, el término "modificado por ingeniería" se refiere al aspecto de haber sido manipulado por la mano del hombre. Por ejemplo, se considera que una célula u organismo está "modificado por ingeniería" si se ha manipulado de modo que su información genética se altera (por ejemplo, se ha introducido nuevo material genético no previamente presente, por ejemplo, mediante transformación, apareamiento, hibridación somática, transfección, transducción u otro mecanismo, o se altera o elimina material genético previamente presente, por ejemplo, mediante mutación por sustitución o delección, o mediante protocolos de apareamiento). Como es práctica común y se entiende por los expertos en la técnica, la progenie de un polinucleótido o célula modificada por ingeniería se denomina típicamente todavía "modificada por ingeniería" incluso aunque la manipulación real se realizara en una entidad anterior.

Excipiente: Como se usa en la presente memoria, se refiere a un agente inactivo (por ejemplo, no terapéutico) que puede incluirse en una composición farmacéutica, por ejemplo, para proporcionar o contribuir a una consistencia o efecto estabilizante deseado. En algunas realizaciones, los excipientes farmacéuticos adecuados pueden incluir, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

Funcional: Como se usa en la presente memoria, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que presenta una propiedad y/o actividad por la que se caracteriza. Una molécula biológica puede tener dos funciones (es decir, bifuncional) o muchas funciones (es decir, multifuncional).

Gen: Como se usa en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ADN en un cromosoma que codifica un producto (por ejemplo, un producto de ARN y/o un producto polipeptídico). En algunas realizaciones, un gen incluye una secuencia codificante (es decir, una secuencia que codifica un producto particular). En algunas realizaciones, un gen incluye una secuencia no codificante. En algunas realizaciones particulares, un gen puede incluir tanto la secuencia codificante (por ejemplo, exónica) como la no codificante (por ejemplo, intrónica). En algunas realizaciones, un gen puede incluir una o más secuencias reguladoras (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) y/o secuencias de intrones que, por ejemplo, pueden controlar o afectar a uno o más aspectos de la expresión génica (por ejemplo, expresión específica de tipo celular, expresión inducible, etc.). Con fines de claridad, se observa que, tal como se usa en la presente divulgación, el término "*gen*" generalmente se refiere a una porción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido o fragmento del mismo; el término puede abarcar opcionalmente secuencias reguladoras, como será evidente a partir del contexto para los expertos en la técnica. Esta definición no pretende excluir la aplicación del término "*gen*" a unidades de expresión que no codifican proteínas, sino más bien aclarar que, en la mayoría de los casos, el término como se usa en este documento se refiere a un ácido nucleico que codifica polipéptidos.

Mejorar, aumentar, potenciar, inhibir o reducir. Como se usan en la presente memoria, los términos "mejorar", "aumentar", "potenciar", "inhibir", "reducir" o equivalentes gramaticales de los mismos, indican valores que están relacionados con una medición de la línea base u otra medición de referencia. En algunas realizaciones, un valor es estadísticamente significativamente diferente de una medición de la línea base u otra medición de referencia. En algunas realizaciones, una medición de referencia apropiada puede ser o comprender una medición en un sistema particular (por ejemplo, en un único individuo) en condiciones comparables de otro modo sin presencia de (por ejemplo, antes y/o después de) un agente o tratamiento particular, o en presencia de un agente de referencia comparable apropiado. En algunas realizaciones, una medición de referencia apropiada puede ser o comprender una medición en un sistema comparable que se sabe o que se espera que responda de una manera particular, en presencia del agente o tratamiento relevante. En algunas realizaciones, una referencia apropiada es una referencia negativa; en algunas realizaciones, una referencia apropiada es una referencia positiva.

Aislado: Como se usa en la presente memoria, se refiere a una sustancia y/o entidad que se ha (1) separado de al menos algunos de los componentes con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) diseñado, producido, preparado y/o fabricado por la mano del hombre. En algunas realizaciones, una sustancia o entidad aislada puede estar enriquecida; en algunas realizaciones, una sustancia o entidad aislada puede ser pura. En algunas realizaciones, las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de aproximadamente el 99 % de los otros componentes con los que estaban inicialmente asociadas. En algunas realizaciones, los agentes aislados son puros en

aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más de aproximadamente el 99 %. Como se usa en la presente memoria, una sustancia es "pura" si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas realizaciones, como entenderán los expertos en la técnica, una sustancia todavía puede considerarse "enriquecida", "aislada" o incluso "pura", después de haber sido combinada con ciertos otros componentes tales como, por ejemplo, uno o más vehículos o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etc.); en tales realizaciones, el porcentaje de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir tales vehículos o excipientes. Los expertos en la técnica son conscientes de una variedad de tecnologías para aislar (por ejemplo, enriquecer o purificar) sustancias o agentes (por ejemplo, usando uno o más de fraccionamiento, extracción, precipitación u otra separación).

Composición farmacéutica: Como se usa en la presente memoria, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición en la que un agente activo se formula junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el agente activo está presente en una cantidad de dosis unitaria apropiada para la administración en un régimen terapéutico que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: administración oral, por ejemplo, pociones (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, los dirigidos a absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación en la lengua, cápsulas, polvos, etc. En algunas realizaciones, un agente activo puede ser o comprender una célula o población de células (por ejemplo, un cultivo, por ejemplo, de un microbio EES); en algunas realizaciones, un agente activo puede ser o comprender un extracto o componente de una célula o población (por ejemplo, cultivo) de células. En algunas realizaciones, un agente activo puede ser o comprender un compuesto aislado, purificado o puro. En algunas realizaciones, un agente activo puede haber sido sintetizado in vitro (por ejemplo, mediante síntesis química y/o enzimática). En algunas realizaciones, un agente activo puede ser o comprender un producto natural (ya sea aislado de su fuente natural o sintetizado in vitro).

Farmacéuticamente aceptable: Como se usa en la presente memoria, el término "farmacéuticamente aceptable" que, por ejemplo, puede usarse en referencia a un vehículo, diluyente o excipiente usado para formular una composición farmacéutica como se divulga en la presente memoria, significa que el vehículo, diluyente o excipiente es compatible con los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial para el receptor de la misma.

Vehículo farmacéuticamente aceptable: Como se usa en la presente memoria, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente o material de encapsulación de disolvente, implicado en portar o transportar el compuesto objeto desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones con pH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhidridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Prebiótico: Como se usa en la presente memoria, un "prebiótico" se refiere a un ingrediente que permite o promueve cambios específicos, en la composición y/o la actividad en la microbiota gastrointestinal, que pueden (o no) conferir beneficios al huésped. En algunas realizaciones, un prebiótico puede incluir uno o más de los siguientes: el prebiótico comprende un extracto de poma, extracto de bayas y extracto de nuez.

Prevención: El término "prevención", como se usa en la presente memoria, se refiere a un retraso del inicio y/o reducción en la frecuencia y/o gravedad de uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección particular. En algunas realizaciones, la prevención se evalúa en una base de población de manera que se considera que un agente "previene" una enfermedad, trastorno o afección particular si se observa una disminución estadísticamente significativa en el desarrollo, frecuencia y/o intensidad de uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno o afección en una población susceptible a la enfermedad, trastorno o afección. En algunas realizaciones, la prevención puede considerarse completa, por ejemplo, cuando el inicio de una enfermedad, trastorno o afección se ha retrasado durante un período de tiempo predefinido.

Referencia: Como se usa en la presente memoria, describe un estándar o control en relación con el cual se realiza una comparación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés se compara con un agente, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia o control. En algunas realizaciones, una referencia o control se prueba y/o determina sustancialmente de manera

simultánea con la prueba o determinación de interés. En algunas realizaciones, una referencia o control es una referencia o control histórico, opcionalmente incorporado en un medio tangible. Típicamente, como entenderán los expertos en la técnica, se determina o caracteriza una referencia o control en condiciones o circunstancias comparables a las que se están evaluando. Los expertos en la técnica apreciarán cuándo están presentes similitudes suficientes para justificar la dependencia y/o comparación con una referencia o control particular posible. En algunas realizaciones, una referencia es una referencia de control negativo; en algunas realizaciones, una referencia es una referencia de control positivo.

Riesgo: Como se entenderá a partir del contexto, "riesgo" de una enfermedad, trastorno y/o afección se refiere a la probabilidad de que un individuo particular desarrolle la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un porcentaje. En algunas realizaciones, el riesgo es del 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 hasta 100 %. En algunas realizaciones, el riesgo se expresa como un riesgo en relación con un riesgo asociado con una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia. En algunas realizaciones, una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia tienen un riesgo conocido de una enfermedad, trastorno, afección y/o evento. En algunas realizaciones, una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia son de individuos comparables a un individuo particular. En algunas realizaciones, el riesgo relativo es de 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

Muestra: Como se usa en la presente memoria, el término "muestra" se refiere típicamente a una alícuota de material obtenido o derivado de una fuente de interés. En algunas realizaciones, una fuente de interés es una fuente biológica o ambiental. En algunas realizaciones, una fuente de interés puede ser o comprender una célula o un organismo, tal como un microbio, una planta o un animal (por ejemplo, un ser humano). En algunas realizaciones, una fuente de interés es o comprende tejido o fluido biológico. En algunas realizaciones, un tejido o fluido biológico puede ser o comprender líquido amniótico, humor acuoso, ascitis, bilis, médula ósea, sangre, leche materna, líquido cefalorraquídeo, cerumen, quilo, quimo, eyaculado, endolinf, exudado, heces, ácido gástrico, jugo gástrico, linfa, moco, líquido pericárdico, perilinf, líquido peritoneal, líquido pleural, pus, legañas, saliva, sebo, semen, suero, esmegma, esputo, líquido sinovial, sudor, lágrimas, orina, secreciones vaginales, humor vítreo, vómito y/o combinaciones o componente(s) de los mismos. En algunas realizaciones, un fluido biológico puede ser o comprender un fluido intracelular, un fluido extracelular, un fluido intravascular (plasma sanguíneo), un fluido intersticial, un fluido linfático y/o un fluido transcelular. En algunas realizaciones, un fluido biológico puede ser o comprender un exudado de planta. En algunas realizaciones, se puede obtener un tejido o muestra biológico, por ejemplo, mediante aspirado, biopsia (por ejemplo, biopsia de aguja fina o tejido), hisopo (por ejemplo, hisopo oral, nasal, de piel o vaginal), raspado, cirugía, lavado o irrigación (por ejemplo, broncoalveolar, ductal, nasal, ocular, oral, uterino, vaginal u otro lavado o irrigación). En algunas realizaciones, una muestra biológica es o comprende células obtenidas de un individuo. En algunas realizaciones, una muestra es una "muestra primaria" obtenida directamente de una fuente de interés por cualquier medio apropiado. En algunas realizaciones, como será evidente a partir del contexto, el término "muestra" se refiere a una preparación que se obtiene procesando (por ejemplo, eliminando uno o más componentes de y/o añadiendo uno o más agentes a) una muestra primaria. Por ejemplo, filtrar usando una membrana semipermeable. Tal "muestra procesada" puede comprender, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas extraídas de una muestra u obtenidas sometiendo una muestra primaria a una o más técnicas tales como amplificación o transcripción inversa de ácido nucleico, aislamiento y/o purificación de ciertos componentes, etc.

Vida útil: Como se usa en la presente memoria, el término "vida útil" o "vida útil viable" se refiere a la cantidad de tiempo (expresado en días, meses o años) que una composición dada comprende una cantidad de microbios viables (por ejemplo, bacterias) que está por encima de un umbral mínimo de microbios viables necesarios para producir un efecto biológico en un sujeto o grupo de sujetos. La viabilidad puede evaluarse determinando la relación de células vivas:muertas en la composición en un momento dado, por ejemplo, usando un ensayo de cultivo apropiado. En otras realizaciones, la viabilidad puede evaluarse funcionalmente usando un ensayo basado en células para medir la velocidad y/o la cantidad máxima de hidrólisis de elagitanino por células en una composición, formulación o preparación. Como apreciará un experto en la técnica, la viabilidad de una composición dada se compara con una referencia adecuada, tal como la viabilidad de la composición el día en que se envasa o una tasa umbral/cantidad máxima de hidrólisis de elagitaninos deseada en la composición. Como se usa en la presente memoria, la expresión "vida útil aumentada" o "vida útil viable aumentada" se refiere a un aumento en la vida útil de una composición de elagitanino (o composición o combinación que incluye una composición de elagitanino) en al menos un día en comparación con una composición comparable. En otras realizaciones, una vida útil aumentada se refiere a un aumento de al menos 2 días, al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 10 días, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses o más en una composición de elagitanino (o composición o combinación que incluye una composición de elagitanino) en comparación con una composición comparable. En algunas realizaciones, una composición comparable carece de elagitanino.

Molécula pequeña: Como se usa en la presente memoria, el término "molécula pequeña" se refiere a moléculas orgánicas o inorgánicas pequeñas con un peso molecular inferior a aproximadamente 3.000 Daltons. En general, las moléculas pequeñas pueden tener un peso molecular de menos de 3.000 Daltons (Da). Las moléculas pequeñas pueden tener, por ejemplo, al menos aproximadamente 100 Da a aproximadamente 3.000 Da (por ejemplo, entre aproximadamente 100 a aproximadamente 3.000 Da, aproximadamente 100 a aproximadamente 2.500 Da,

aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 Da, aproximadamente 100 a aproximadamente 1.750 Da, aproximadamente 100 a aproximadamente 1.500 Da, aproximadamente 100 a aproximadamente 1.250 Da, aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 Da, aproximadamente 100 a aproximadamente 750 Da, aproximadamente 100 a aproximadamente 500 Da, aproximadamente 200 a aproximadamente 1.500, aproximadamente 500 a aproximadamente 1.000, aproximadamente 300 a aproximadamente 1.000 Da, o aproximadamente 100 a aproximadamente 250 Da).

Sujeto: Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" se refiere a un individuo al que se administra un tratamiento proporcionado. En algunas realizaciones, un sujeto es un animal. En algunas realizaciones, un sujeto es un mamífero, por ejemplo, un mamífero que experimenta o es susceptible a una enfermedad, trastorno o afección como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, un animal es un vertebrado, por ejemplo, un mamífero, tal como un primate no humano, (particularmente un primate superior), una oveja, un perro, un roedor (por ejemplo, un ratón o rata), una cobaya, una cabra, un cerdo, un gato, un conejo o una vaca. En algunas realizaciones, un animal es un animal no mamífero, tal como un pollo, un anfibio, un reptil o un modelo de invertebrado como *C. elegans*. En algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, un paciente padece de o es susceptible a una o más enfermedades, trastornos o afecciones como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, un paciente muestra uno o más síntomas de una o más enfermedades, trastornos o afecciones como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, un paciente ha sido diagnosticado con una o más enfermedades, trastornos o afecciones como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, el sujeto está recibiendo o ha recibido cierta terapia para diagnosticar y/o tratar una enfermedad, trastorno o afección. En otra realización, el sujeto es un animal experimental o sustituto animal como modelo de enfermedad.

Sustancialmente: Como se usa en la presente memoria, se refiere a la condición cualitativa de presentar una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la materia de técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, si los hay, llegan a completarse y/o prosiguen hasta la compleción o logran o evitan un resultado absoluto. El término "*sustancialmente*" por lo tanto, se usa en la presente memoria para capturar la falta potencial de compleción inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos.

Los síntomas se reducen: De acuerdo con la presente divulgación, "los síntomas se reducen" cuando uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección particular se reducen en magnitud (por ejemplo, intensidad, gravedad, etc.) y/o frecuencia. Con fines de claridad, un retraso en el inicio de un síntoma particular se considera una forma de reducir la frecuencia de ese síntoma.

Régimen terapéutico: Un "régimen terapéutico", tal como se usa ese término en la presente memoria, se refiere a un régimen de dosificación cuya administración a través de una población relevante puede correlacionarse con un resultado terapéutico deseado o beneficioso.

Cantidad terapéuticamente efectiva: Como se usa en la presente memoria, se entiende que es una cantidad que produce el efecto deseado para el que se administra. En algunas realizaciones, el término se refiere a una cantidad que es suficiente, cuando se administra a una población que padece de o es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección de acuerdo con un régimen de dosificación terapéutica, para tratar la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva es una que reduce la incidencia y/o gravedad de, y/o retrasa el inicio de, uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. Se ha informado que el término "cantidad terapéuticamente efectiva" de hecho no requiere que se logre un tratamiento exitoso en un sujeto particular. Más bien, una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser aquella cantidad que proporcione una respuesta farmacológica deseada particular en un número significativo de sujetos cuando se administra a sujetos que necesitan tal tratamiento. En algunas realizaciones, la referencia a una cantidad terapéuticamente efectiva puede ser una referencia a una cantidad medida en uno o más tejidos específicos (por ejemplo, un tejido afectado por la enfermedad, trastorno o afección) o fluidos (por ejemplo, sangre, saliva, suero, sudor, lágrimas, orina, etc.). Se ha informado que, en algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o terapia particular puede formularse y/o administrarse en una única dosis. En algunas realizaciones, un agente terapéuticamente efectivo puede formularse y/o administrarse en una pluralidad de dosis, por ejemplo, como parte de un régimen de dosificación.

Tratamiento: Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" (también "tratar" o "que trata") se refiere a cualquier administración de una terapia que, parcialmente o completamente, alivia, mejora, mitiga, inhibe, retrasa el inicio de, reduce la gravedad de y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características y/o causas de una enfermedad, trastorno y/o afección particular. En algunas realizaciones, dicho tratamiento puede ser de un sujeto que no muestra signos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante y/o de un sujeto que muestra solo signos tempranos de la enfermedad, trastorno y/o afección. Alternativamente, o adicionalmente, tal tratamiento puede ser de un sujeto que muestra uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto al que se le ha diagnosticado que padece de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante. En algunas realizaciones, el tratamiento puede ser de un sujeto que se sabe que tiene uno o más factores de susceptibilidad que están estadísticamente correlacionados con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno y/o afección relevante.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** muestra los niveles de inducción de la expresión de *gst-4* usando el informador CL2166 *dvls19 [pAF15 (gst-4::gfp-nls)]III* en *Caenorhabditis elegans* usando una pantalla visual cualitativa. El **panel (a)** muestra los niveles de inducción de la expresión de *gst-4* a partir del informador CL2166 *dvls19 [pAF15 (gst-4::gfp-nls)]III* en bacterias de control negativo alimentadas con *C. elegans* y sin extracto de granada. El **panel (b)** muestra los niveles de inducción de la expresión de *gst-4* a partir del informador CL2166 *dvls19 [pAF15 (gst-4::gfp-nls)]III* en bacterias de control negativo alimentadas con *C. elegans* y extracto de granada. El **panel (c)** muestra los niveles de inducción de la expresión de *gst-4* a partir del informador CL2166 *dvls19 [pAF15 (gst-4::gfp-nls)]III* en *Lactobacillus planetarium* (MBT501) alimentado con *C. elegans* y sin extracto de granada. El **panel (d)** muestra los niveles de inducción de la expresión de *gst-4* a partir del informador CL2166 *dvls19 [pAF15 (gst-4::gfp-nls)]III* en *L. planetarium* (MBT501) alimentado con *C. elegans* y extracto de granada.

La **FIG. 2, panel (A)** incluye un esquema de un grupo de genes implicados en el metabolismo de elagitanino. La **FIG. 2, panel (B)** incluye un gráfico de barras que muestra los niveles de expresión normalizados de los genes de tanasa (*tanB*), galato descarboxilasa (*lpdB*) y galato descarboxilasa (*lpdC*) en bacterias de control negativo alimentadas con *C. elegans* (barras grises) y sin (barras negras) extracto de granada.

La **FIG. 3, panel (A)** incluye un gráfico de barras que muestra unidades formadoras de colonias de *L. planetarium* (MBT501) a las 0, 2 y 4 semanas solo (barras negras) o con extracto de granada (barras grises). La **FIG. 3, panel (B)** muestra unidades formadoras de colonias *L. planetarium* (MBT501) en una placa de cultivo a las 0, 2 y 4 semanas solo (rectángulo negro) o con extracto de granada (rectángulo gris).

La **FIG. 4, panel (A)** incluye un gráfico de barras que muestra los niveles de inducción de la expresión de Nrf2 usando informador Nrf2:Luciferasa en una línea celular de hígado humano (HepG) tratada con *L. planetarium* (MBT501) solo, extracto de granada solo, o *L. planetarium* (MBT501) y extracto de granada. La **FIG. 4, panel (B)** incluye una transferencia Western que muestra los niveles de proteína Nrf2 en una línea celular de hígado humano (HepG) tratada con *L. planetarium* (MBT501) solo, extracto de granada solo, o *L. planetarium* (MBT501) y extracto de granada.

La **FIG. 5** incluye un gráfico de líneas que muestra el número de agregados de poliQ formados cuando se usa el informador *rmls133 (unc_{54p::Q40::YFP})* en bacterias de control negativo alimentadas con *C. elegans*, extracto de granada, alimentado en *L. planetarium* (MBT501), y alimentado en *L. planetarium* (MBT501) y extracto de granada. Los agregados se determinaron usando una pantalla visual cualitativa.

Descripción detallada

La presente divulgación reconoce que los metabolitos de elagitanino tienen propiedades biológicas, incluyendo, en algunos casos, actividades biológicas beneficiosas. Por ejemplo, las urolitinas (por ejemplo, urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D y/o isourolitina A) que resultan del metabolismo de elagitanino pueden mejorar, por ejemplo, la función mitocondrial, aumentando (entre otras cosas) la mitofagia (por ejemplo, el reciclaje de mitocondrias por autofagia). Aunque los metabolitos de elagitanino (por ejemplo, urolitinas) pueden influir en las actividades biológicas, se ha informado que tales metabolitos tienen una baja biodisponibilidad. Por consiguiente, sigue existiendo en la técnica la necesidad de enfoques que puedan aumentar la biodisponibilidad de los metabolitos de elagitanino.

La presente divulgación proporciona la idea de que las composiciones enzimáticas que comprenden una o más enzimas de elagitanino (por ejemplo, una enzima tanino acil hidrolasa, una enzima galato descarboxilasa, o una combinación de las mismas) pueden utilizarse para aumentar la biodisponibilidad de las urolitinas resultantes del procesamiento del elagitanino. Por tanto, entre otras cosas, la presente divulgación proporciona tecnologías en las que se incluyen una o más enzimas de elagitanino con una composición de elagitanino. Dichas tecnologías proporcionan una producción aumentada de urolitinas (por ejemplo, urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D y/o isourolitina A) y/o un aumento en la biodisponibilidad de las urolitinas (por ejemplo, urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D y/o isourolitina A) y, por lo tanto, proporcionan una solución a las necesidades en la técnica. En algunas realizaciones, las tecnologías de la presente memoria pueden ser útiles para modificar (por ejemplo, mejorar) la función mitocondrial (por ejemplo, disminuyendo la disfunción mitocondrial) y/o modificar los niveles de antioxidantes.

La presente divulgación proporciona la idea adicional de que los microbios, tales como variantes naturales o modificadas genéticamente de cepas microbianas encontradas en un microbioma (por ejemplo, de un mamífero, por ejemplo, de un ser humano), pueden incluir y/o expresar una o más enzimas de elagitanino (por ejemplo, microbios sintetizadores de enzimas de elagitanino). Por consiguiente, la presente divulgación proporciona, entre otras cosas, tecnologías que utilizan tales microbios, bien solos o en combinación con una composición de elagitanino, para aumentar la producción y/o biodisponibilidad de las urolitinas. Un beneficio de usar cepas microbianas que incluyen y/o expresan una o más enzimas de elagitanino incluye que las cepas microbianas, tales como las encontradas en un microbioma, son generalmente seguras para la administración o consumo por un sujeto (por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano). Otro beneficio de usar tales cepas microbianas puede ser que las cepas microbianas pueden colonizar el intestino de un sujeto al que se administran las cepas, lo que puede reducir el número de administraciones necesarias y prolongar el tiempo en el que las enzimas de elagitanino están presentes en el intestino.

del sujeto. Adicionalmente, las cepas microbianas pueden ser fáciles de administrar a un sujeto a través de varias formas probióticas, como se analiza en la presente memoria.

Composiciones de elagitanino

Los elagitaninos son una clase diversa de polifenoles de taninos vegetales hidrolizables complejos compuestos por restos de hexahidroxidifenoilo esterificados a un azúcar, es decir, ésteres de hexahidroxidifenoil-glucosa. Los elagitaninos se pueden encontrar en una variedad de alimentos, tales como fresas (*Fragaria vesca*), frambuesas, moras, moras de los pantanos (*Rubus chamaemorus*), frutos de la familia Myrtaceae, incluyendo, pero sin limitarse a, jabuticaba, cambuci, cerezas Surinam, camu-camu, guayaba roja, guayaba blanca, granada, nueces, pacanas, hongos de bistec (*Fistula hepatica*) y arándanos. Los ésteres de elagitanino hexahidroxidifenoil-glucosa pueden comprender números variables de unidades de hexahidroxidifenoilo (HHDP) y unidades de galoilo y/o sanguisorboilo unidas a un azúcar, y pueden producirse principalmente en especies vegetales angiospermas dicotiledóneas, incluyendo, pero no limitado a, especies del orden Myrtales.

Después del consumo por un sujeto (por ejemplo, un mamífero, por ejemplo, un ser humano), los elagitaninos (ET) pueden metabolizarse en el sujeto a metabolitos de elagitanino, tales como un metabolito del ácido elágico (EA), que puede ser, pero no se limita a, urolitina A, urolitina B, urolitina C, urolitina D, isourolitina A, metiluroolitina A, hidroxiluroolitina A y/o derivados de los mismos. Aunque estos metabolitos pueden derivarse de elagitaninos presentes en ciertos alimentos (por ejemplo, granadas), el consumo de estos alimentos a menudo conduce a una biodisponibilidad insuficiente de estos metabolitos bioactivos beneficiosos. Específicamente, ciertos sujetos pueden no producir cantidades detectables de estos metabolitos después del consumo de alimentos que contienen ET (por ejemplo, zumo de granada). En algunos casos, los sujetos podrían beneficiarse de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria que pueden aumentar la biodisponibilidad de los elagitaninos en la dieta y/o coadministrados como parte de una composición como se describe en la presente memoria. Los sujetos que producen niveles muy bajos o indetectables de metabolitos de elagitanino después de la ingestión pueden beneficiarse de las tecnologías divulgadas en la presente memoria. Sin embargo, los sujetos que pueden producir niveles detectables de metabolitos de elagitanino también pueden beneficiarse de las tecnologías divulgadas en la presente memoria, ya que pueden ser deseables niveles aumentados de tales metabolitos.

En ciertas realizaciones, se usa una composición de elagitanino como un constituyente de una composición descrita en la presente memoria, o se administra en un método descrito en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes de elagitaninos útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen elagitaninos de granada que son numerosas, pero en particular incluyen punicalaginas, incluyendo punicalina y ácido galágico, cada una de las cuales puede hidrolizarse a ácido elágico (EA), que puede hidrolizarse adicionalmente a urolitinas A y B por microbios intestinales. Otros elagitaninos incluyen, por ejemplo, pedunculaginas, rosacianinas (Fukui et al., Tetrahedron 62: 9661-9670 (2006)), filanemblininas (Zhang et al., J. Nat. Prod. 64: 1527-1532 (2001) y sanguina H6.

Las composiciones de elagitanino que pueden ser útiles en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden incluir, por ejemplo, zumos u homogeneizados de un material vegetal, incluyendo, pero no limitado a, fruta, o una piel y/o una cáscara de la misma, de una planta productora de elagitanino. Puede ser preferible usar un zumo u homogeneizado enriquecido en elagitaninos, por ejemplo, por extracción. Se pueden extraer diferentes materiales vegetales de diferentes maneras. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los materiales pueden extraerse mediante extracción con disolvente de material vegetal molido liofilizado. A continuación se describen algunos ejemplos.

Se describe una extracción de cáscara o piel de granada que puede enriquecer en elagitaninos mientras se eliminan las antocianinas, por ejemplo, por Adams et al., J. Agric. Food Chem. 54: 980-985 (2006), Seeram et al., Sep. Purif. Technol. 41: 49-55 y Sharma et al., J. Agric. Food Chem. 58: 3965-3969 (2010). La pureza y concentración de los elagitaninos en tales extractos se puede determinar por HPLC y por cromatografía líquida espectrometría de masas de ionización por electropulverización (LC-ESI/MS). El extracto de granada se puede obtener comercialmente, por ejemplo, un extracto que comprende un 37,5 % de los elagitaninos principales de la granada, ácido gálico, punicalagina y punicalagina, y el 2,7 % de ácido elágico está disponible en Vegetable Sciences, Noblesville IN. Este extracto se prepara según el método descrito por Pacheco-Palencia et al., J. Agric. Food Chem. 56: 8434-8441 (2008).

Un extracto de elagitaninos de fresa puede prepararse como se describe, por ejemplo, por Zhang et al., J. Agric. Food Chem. 56: 670-675 (2008). Brevemente, el polvo de fresa de frutos enteros liofilizados puede extraerse mediante percolación en frío con metanol para producir un extracto que después se divide en cloroformo seguido de acetato de etilo. Una porción acuosa restante puede purificarse adicionalmente mediante cromatografía de adsorción en una columna XAD-16 (Resina de Amberlita, Sigma, St. Louis, MO) y eluirse con agua seguido de metanol ácido. El eluato de metanol puede secarse al vacío y luego enriquecerse adicionalmente en contenido de elagitanino mediante suspensión en agua destilada y filtración para producir una fracción insoluble en agua enriquecida en elagitaninos y ácido elágico. Los extractos pueden estandarizarse por HPLC a ácido elágico al 5,0 %. Generalmente, los extractos resultantes pueden contener aproximadamente un 20,5 % de compuestos fenólicos, medidos como equivalentes de ácido gálico (GAE).

Un proceso de extracción de semillas de jamun también se describe por Sharma et al., J. Agric. Food Chem. 58: 3965-3969 (2010). La baya de jamun india (*Eugenia jambolana*) tiene elagitaninos en su pulpa carnosa, pero sus semillas pueden ser una fuente más rica que no contiene tantas antocianinas. En algunos casos, pueden eliminarse las antocianinas. En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria están esencialmente libres de o están libres de antocianinas. La extracción de semillas de jamun puede incluir, por ejemplo, la extracción de polvo de semillas en acetona, seguido de secado al vacío. El extracto resultante puede estandarizarse por HPLC a aproximadamente 4,2 % de ácido elágico, con 20,5 % de compuestos fenólicos como GAE. Enfoques similares u otros conocidos previamente pueden aplicarse para preparar preparaciones que contienen elagitanino a partir de otras fuentes para su uso en métodos y composiciones descritos en la presente memoria.

Una composición de elagitanino como se divulga en la presente memoria se puede formular para administración oral. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino puede ser un alimento, una bebida, una composición de pienso o un suplemento nutricional. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino puede ser un líquido, jarabe, comprimido, pastilla, goma, cápsula, polvo, gel o película.

En algunas realizaciones, una composición de elagitanino puede mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, una composición de elagitanino puede incluirse en una formulación con recubrimiento entérico.

Cuando se consumen, los elagitaninos pueden hidrolizarse para liberar ácido elágico. El ácido elágico puede detectarse en plasma humano y se ha propuesto que actúa directamente sobre una metiltransferasa implicada en la metilación de histonas, entre otras actividades. Sin embargo, los metabolitos de los elagitaninos, incluyendo, pero sin limitarse a, urolitina A (3,8-dihidroxiurolitina), urolitina C (3,8,9 trihidroxiurolitina), isourolitina A (3,9 dihidroxiurolitina), urolitina B (3-hidroxiurolitina), urolitina D (3,4,8,9-tetrahidroxiurolitina) o una combinación de los mismos requieren la acción de la microbiota intestinal sobre los elagitaninos.

La concentración de urolitina A puede alcanzar niveles de hasta micromolar (μM) en plasma sin ningún efecto tóxico evidente *in vivo*. Por ejemplo, tras el consumo de zumo de granada por los seres humanos, los niveles plasmáticos máximos de urolitina A pueden alcanzar de 14 a 40 μM . Sin embargo, puede haber amplias variaciones entre los niveles de urolitina que resultan del procesamiento de elagitanino entre individuos (véase, por ejemplo, Cerda et al., Eur. J. Nut. 43: 205-220). Selma et al. identificaron bacterias en monocultivo (*Gordonibacter urolitinfaciens* y *Gordonibacter pamelaee* DSM 19378T) que pueden metabolizar ácido elágico para producir ácido lúteo, urolitina M-5, urolitina M-6 y urolitina C. Sin embargo, estas bacterias cultivadas eran incapaces de producir productos aguas abajo, urolitina A y urolitina B; véase Selma et al., Food & Nut. 5: 1779-1784 (2014). La presente divulgación proporciona el reconocimiento de que una amplia variación entre individuos puede deberse a diferencias en la microbiota.

Los estudios de disposición tisular revelan que las urolitinas pueden estar enriquecidas en tejidos de próstata, intestino y colon en ratones. La urolitina A puede inhibir la proliferación de células de cáncer de colon, inducir la detención del ciclo celular y modular procesos celulares clave asociados con el desarrollo del cáncer de colon, tal como la señalización de MAPK *in vitro* (Larossa et al., J. Agric. Food Chem., 54: 1611-1620 (2006); Gonzalez-Sarrias et al., Mol. Nut. Food Res. 53: 686-698 (2009)). En un modelo de colitis en rata, la urolitina A puede disminuir los marcadores inflamatorios incluyendo óxido nítrico sintasa inducible, ciclooxigenasa-2 (COX-2), prostaglandina E sintasa y prostaglandina E2, en la mucosa colónica. Se ha encontrado que la urolitina B es un regulador de la masa del músculo esquelético en algunas realizaciones (véase, por ejemplo, Rodríguez et al., J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8: 583-597 (2017)). Cuando las urolitinas están directamente biodisponibles, los tratamientos que promueven la producción de urolitina como se describe en la presente memoria pueden aumentar la biodisponibilidad de los metabolitos de elagitanino.

Las urolitinas tienen espectros UV distintos que pueden permitir su detección y medición mediante, por ejemplo, HPLC acoplada con detectores de matriz de fotodiodos UV. Se han informado correlaciones entre características estructurales, incluyendo la conjugación, con los espectros UV y los tiempos de retención (véase, por ejemplo, Gonzalez-Barrio et al., J. Agric. Food Chem. 59: 1152-1162 (2011)). Por tanto, pueden usarse HPLC y UHPLC para ensayar e identificar niveles de urolitinas en orina obtenida de un sujeto (véase, por ejemplo, Piwowarski, JP et al. Drug Metabolism and Disposition 45(6):657-665 (2017)).

Enzimas de elagitanino

Enzimas tanino acil hidrolasas

Las realizaciones de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de microbios que expresan enzimas que actúan sobre elagitaninos o en una ruta metabólica de elagitaninos. Las enzimas ejemplares incluyen enzimas tanino acil hidrolasa que pueden catalizar la hidrólisis del enlace éster de galoilo en taninos hidrolizables, incluyendo elagitaninos para liberar ácido gálico. Las tanino acil hidrolasas como se describen en la presente memoria pueden catalizar una reacción característica de E.C. 3.1.1.20. Los hongos, tales como especies de *Aspergillus* y bacterias, tales como miembros de la familia Lactobacillaceae, pueden producir naturalmente enzimas tanasa adecuadas para su uso en composiciones y métodos como se describe en la presente memoria. Las enzimas

tanasa codificadas por hongos pueden compartir poca similitud estructural con las codificadas por bacterias, aunque pueden compartir un intervalo similar de especificidades de sustrato. Como tal, para realizaciones en las que la enzima tanasa se puede administrar o usar como una preparación derivada de, pero sin incluir, microorganismos vivos, la tanasa se puede aislar o preparar a partir de fuentes fúngicas, así como bacterianas. Las tanasas producidas por levaduras y los métodos para producirlas se describen, por ejemplo, por Boer et al., *Yeast* 26: 323-337 (2009), y la secreción, purificación y caracterización de la tanasa de *Aspergillus oryzae* en la levadura *Pichia pastoris* se describe por Zhong et al., *Protein Expression and Purif.* 36: 165-169 (2004).

Las tanasas que actúan sobre elagitaninos pueden hidrolizar selectivamente restos galoílico, produciendo ácido gálico y elagitaninos degaloilados. Véase, por ejemplo, Rodríguez-Duran et al., *Enzyme Res.* 2011: 823619 (2011), que incluye ilustraciones de productos hidrolíticos de la digestión con tanasa de diversos elagitaninos. En una realización, una tanino acil hidrolasa es una enzima tanasa B o tanasa tanB. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, enzimas tanB codificadas y expresadas por miembros de la familia Lactobacillaceae, incluyendo, pero no limitadas a, especies de *L. plantarum*. Las tanasas tanasa B codificadas y expresadas por otras especies que pueden catalizar la misma reacción también pueden ser útiles en diversas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, como pueden serlo variantes de origen natural o creadas artificialmente que retienen la capacidad de catalizar la misma reacción.

Los métodos para producir y aislar tanasa recombinante, por ejemplo, tanasa de *L. plantarum*, se describen, por ejemplo, por Curiel et al., *J. Agric. Food Chem.* 57: 6224-6230 (2009). Se ha determinado la estructura cristalina de un polipéptido tanasa B codificada y expresada por *L. plantarum* (véase Ren et al., *J. Mol. Biol.* 425: 2737-2751 (2013)). Como se ha informado, la tanasa B muestra una estructura α/β , caracterizada por un dominio cap grande insertado en un pliegue de serina hidrolasa. Los estudios estructurales de la enzima en complejo con un número de sustratos indicaron que las interacciones en un sitio de unión a galoílico son una fuerza determinante para la unión de sustratos. Un sitio de unión a galoílico es responsable de las actividades esterasa y depsidasa de la enzima. Se identificó una triada catalítica compuesta por Ser163, His451 y Asp419. Los estudios de mutagénesis mostraron que, durante la unión del ácido gálico, el grupo carboxilo de la molécula forja interacciones de enlaces de hidrógeno con la triada catalítica de la enzima, mientras que los tres grupos hidroxilo hacen contacto con Asp421, Lys343 y Glu357 para formar otra red de enlaces de hidrógeno, y que estos residuos son necesarios para la actividad enzimática. Como tal, probablemente no se tolerarán modificaciones en el polipéptido de tanino acil hidrolasa o tanasa B que cambian la identidad de uno o más de estos residuos o su equivalente en proteínas homólogas. De manera similar, se anticipa que los cambios que alteran el posicionamiento de estos residuos o su equivalente en otros homólogos entre sí también alterarían las redes de enlaces de hidrógeno e interferirían con la función enzimática. Por otro lado, sería más probable que se toleraran cambios que no afectarían a la identidad o al posicionamiento relativo de los residuos indicados. En una realización, un polipéptido de tanasa B como se describe en la presente memoria es al menos un 85 % idéntico a la enzima tanasa B de *L. plantarum* codificada por la cepa WCFS1 y retiene los aminoácidos de la triada catalítica Ser163, His451 y Asp419 y los aminoácidos Asp 421, Lys343 y Glu357 que entran en contacto con el hidroxilo del tanino indicados anteriormente, o su equivalente como se localiza en polipéptidos homólogos. En otra realización, un polipéptido de tanasa B como se describe en la presente memoria tiene al menos un 90 % o al menos un 95 % o más de identidad con una enzima tanasa B de *L. plantarum* codificada por la cepa WCFS1 y retiene los aminoácidos de la triada catalítica Ser163, His451 y Asp419 y los aminoácidos Asp 421, Lys343 y Glu357 que entran en contacto con el hidroxilo del tanino indicados anteriormente, o su equivalente como se localiza en polipéptidos homólogos.

Un gran número de cepas de *L. plantarum* codifican y expresan un polipéptido tanasa B similar. Los ejemplos no limitantes incluyen, *L. plantarum* WCFS1 (véanse, las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos más adelante), así como, por ejemplo, *L. plantarum* 5-2, *L. plantarum* LP3, *L. plantarum* BLS41, *L. plantarum* LQ80, *L. plantarum* A3, *L. plantarum* FBR6, y *L. plantarum* RI-515.

Secuencia de ácido nucleico de la tanasa B de *L. plantarum* WCFS1 (No de acceso de NCBI. NC_004567.2):

atgagtaacc gattgatttt tgaatctgac tggctgggic cggaaacaggt ccaagttgcc gggcaggcta ticaatatta
 tgcgccccgt aatattcagt acgttcagca tccagtcgca ggcattcagg tctaaacgt tttgtacca gccacatact tgcattggag
 ttcagtcatt ggttatcagc gggcaacggc gccaatctg atgcgaata cggtcggcgg ttatttgcca ggaccggcgg
 atgatccga acgtgtact tggccgacga atgcagggac gattcaacag gcaactaac gcggttactg tctggggccc
 gctggaattc ggggtcgtac gacgggtgat aagtcgggc aacgggtcgg gcaagcggc gctttatcg tagatatgaa
 gggcgcaatc cgttacgta agtataatca gggcggcgtg ccaggtgaca cgaacgggat catcacgaat ggaacggagt
 ctgggggtgc cacttcggct itagcgggtg cgagtggcaa ttcggcttat ttgaaccag ccttaacitc gctcggggca
 gcaccggcga ctgacgatat ctttcgggtg tcaacttact gcccgattca taatctggaa cagcagaca tggcctacga
 gtggcagttt aatggatata atgactggca ccgttatcag cctgttcggg ggacgaccaa gaattggcga ccaaatgtg
 aacgggttag tggcagctc acagtgaag aacaggccct ttcgttcggg taaaagecc agtcagtac ctactgaac
 cagtgaac tcacggccag tgacgggacg cacttgacgc ttaataggc gggaatgggt tcaatcgtg atgtgttcg
 ccaattattg atactatctg ctacagcgc attcgatcaa gggacggata ttcataagta cgcaggcttt gtcgttactg gaaatcaggt
 gacggacttg gatttateag ctatttgaa gtcgttaact cgcataaag cgtcccgcc gtttgacca tiagattga cgagtcaga
 gaataattg tttggcagc caacggcgaa agccaagcac ttacggcct tggcagac gccgaagtag gtcacggcac
 aactagcga cgtgagctg attcaggcga ttaacggct cagtactta acgacaact cgtcagagt tgctaagcac
 tggcggatc gccacgggtg ggcgacga galacgagt tgcataccc gattatcta gcaataatg tagaaaatca
 tggttatggc atgattttg cgtacccgtg ggatattccc cacagtggg actatgatt aggcgattta ttttcctgga ttgatggctt
 .2): gtgccaatga

Secuencia de aminoácidos de la tanasa B de *L. plantarum* WCFS1, No de acceso de NCBI. WP_011101979.1:

MSNRLIFDAD WLVPEQVQVA GQAIQYAAAR NIQYVQHPVA AIQVLNVFVP AAYLHGSSVN GYQRATAPIL
 MPNTVGGYLP GPADDPQRVT WPTNAGTIQQ ALKRGYVVVA AGIRGRTTVD KSGQRVGQAP AFIVDMKAAI
 RYVKYNQGR L PGDTNRIITN GTSAGGATSA LAGASGNSAY FEPALTALGA APATDDIFAV SAYCPIHNLE
 HADMAYEWQF NGINDWHRYQ PVAGTTKNGR PKFEPVSGQL TVEEQALS LAQAQFSTYLN QLKLTASDGT
 HLTLINEAGMG SFRDVRQLL ISSAQAFDQ GTDIHKYAGF VVTGNQVTDL DLSAYLKS LT RMKAVPAFDQ
 LDLTSPENNL FGDATKAKH FTALAQTRST VTAQLADAEL IQAINPLSYL TTTSSRVAKH WRIRHGAADR DTSFAIPIIL
 AIMLENHGYG IDFALPWDIP HSGDYDLGDL FSWIDGLCQ

Los aminoácidos Ser163, His451, Asp419, Asp 421, Lys343 y Glu357 están en negrita.

- 5 Los métodos para detectar o medir la actividad de la tanino acil hidrolasa incluyen métodos ejemplares tales como los descritos por: Beverini y Metche, Sci. Aliments. 10: 807-816 (1990) que describe un ensayo de HPLC, Haslam et al. J. Chem. Soc. 1829-1835 (1961) que describe un ensayo titrimétrico no tamponado, Yamada et al. Agr. Biol. Chem. 45: 233-240 (1967) que describe un ensayo titrimétrico tamponado, Skene y Booker, Anareobe 1: 321-327 (1995) que describe un ensayo espectrofotométrico de una sola longitud de onda, Bajpai y Patil, World J. Microbiol. Biotechnol.
- 10 12: 217-220 (1996) que describe un ensayo espectrofotométrico de doble longitud de onda, y Aguilar et al. (Braz. Arch. Biol. Technol. 42 (No. 3), Curitiba 1999) que describe un ensayo espectrofotométrico de doble longitud de onda. Cada una de estas publicaciones se incorpora en la presente memoria por referencia con respecto a las condiciones del ensayo de la tanino acil hidrolasa y al cálculo de los resultados. La referencia Aguilar incluye una comparación de estos seis métodos, usando ácido tánico como único sustrato en la reacción enzimática. Cada uno de los métodos
- 15 descritos fue útil para medir la actividad de la tanino acil hidrolasa extracelular, y todos excepto el método de Bajpai y Patil fueron útiles para medir la actividad intracelular. Para los ensayos espectrofotométricos y de HPLC, una unidad de actividad enzimática se define típicamente como una cantidad de enzima que libera 1 μmol (micromol) de ácido gálico por ml por minuto; para los métodos titrimétricos, una unidad de enzima es típicamente una cantidad de enzima que libera 1 μmol de grupo carboxilo por ml por minuto. Aunque cualquiera de estos métodos puede usarse basándose
- 20 en esta comparación, el ensayo de HPLC descrito por Beverini y Metche tenía el coeficiente de variación más bajo, lo que indica una fiabilidad más alta que otros métodos. Puede preferirse un método de HPLC cuando importa la precisión en la medición de la actividad de la tanino acil hidrolasa. Para determinar si una bacteria dada expresa una actividad de tanino acil hidrolasa, puede usarse cualquiera de los ensayos proporcionados anteriormente, entre otros, pero cuando sea necesario o se desee medir la cantidad de dicha actividad, se prefiere un enfoque de HPLC. La presencia
- 25 de un gen de tanino acil hidrolasa puede detectarse en una bacteria mediante PCR usando cebadores basados en secuencias de ácido nucleico de tanino acil hidrolasa disponibles o, cuando se ha secuenciado el genoma de la bacteria, la presencia de una secuencia que codifica una tanino acil hidrolasa puede determinarse basándose en la homología o identidad con tanino acil hidrolasas conocidas.

Enzimas galato descarboxilasas

- 30 Las realizaciones de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen el uso de microbios que codifican y expresan una enzima galato descarboxilasa. La enzima puede catalizar la conversión de 3,4,5-trihidroxibenzoato (ácido gálico) a pirogalol y dióxido de carbono, que es una característica de E.C. 4.1.1.59. Los genes

microbianos de la galato descarboxilasa pueden codificarse en una disposición de operón de tres secuencias codificantes de proteínas separadas denominadas "subunidades" C, B y D, pero una enzima activa no es un complejo de las tres subunidades. Más bien, para especies que tienen esta disposición, la subunidad C parece ser la subunidad catalítica. En *Lactobacillus plantarum* WCFS1, una subunidad B, pero no una subunidad D, se requiere junto con una subunidad C para la actividad galato descarboxilasa, basándose en experimentos de inactivación génica; se ha propuesto que la subunidad B desempeña un papel en, por ejemplo, el establecimiento del plegamiento correcto de la subunidad C. Véase, por ejemplo, Jimenez et al., Appl. Environ. Microbiol. 79: 4253-4263 (2013). Para la galato descarboxilasa expresada por *L. plantarum* WCFS1 (también conocida como cepa depositada en la ATCC BAA-793), la subunidad C, IpdC, tiene la secuencia en el No de acceso de GenBank. F9US27-1:

```
atggcagaac aacctgaggga ttgcgtcgc gtgcttgatg agatcaagga tgatccaaag aactatcatg aaactgacgt cgaagtgtg
ccaaatgcgg aactttctgg tgttatcgg tatatcggtg ctggtgggac cggtcaacgg ccaacgcaag aggggtccagc aatgatgtt
aacaacgtta aggggtttcc tgatacggg gtcttgactg gattgatggc gactgcggc cgcttggtga agatgttcca ccacgattat
cagacgttag ggcaatactt gaacgaagca gtctctaatac cagtggcgcc agaaacggtt gctgaagcgg atgcgccagc tcacgatgtc
gtttataaag cgacggatga aggtcttgat attcgttaagt tagtggcagc accaacgaat acgccccaaag atgctggacc atatattacg
gtcgggtgtg tggttggtc aagcatggac aagtctaaga gtgatgtgac gattcacga atggtccttg aagataagga taagttaggg
atttatatca tgcttggcgg tcggcacatt ggtgcgttg cggaagagta tgagaaagct aacaagccaa tgccaattac aattaatatt
ggtttggatc cagccattac gattggtgca actttcgaac caccgaccac gccattcggg tataacgaat tagtgtttgc tgggtcgatt
cggaaccaag ctgttcaatt agttgacggg gtgaccgtcg atgaaaaggc gattgctcgt tctgaatata cgcttgaggg gtacattatg
cctaacgaac gtattcagga agatatcaat acgcatacgg gcaaggcgat gcctgaattc cggggttatg atggtgacgc caaccagct
ttacaagtga ttaagtgac ggcggtgact catcggaaga atgcatcat gcaaacgctg attggacat ccgaagaaca tgcagcatg
gcgggaattc caactgaagc tagtatctta caattggtta accgtgcat tcttggtaaa gtgacgaatg ttataatcc gccggctggt
ggtggaagt tgatgacct catcgagatt cacaaggata atgaagcgga tgaaggaatt caacggcaag ctgcttctgc tgcgttctca
gccttaagg aattgaagac tgttatcctg gttgatgaag atgttgatat tttgatatg aatgatgtga ttggacgat gaataccgt
ttcaagccg atcaggactt gatgtctta tcaggcatgc ggaatcatcc gttggacca tcggaacgcc cacaatatga tcaaaagtcg
attcgtttcc gtgggatgag ttctaaacta gtgattgatg gcaccgtacc attcgatatg aaggaccaat tgaacgggc ccaattcatg
aaagtggctg actgggagaa gtatttgaag taa
```

IpdC:

F9US27-1 (UniprotKB; *L. plantarum* ATCC BAA-793)

```
MAEQPWDLRR VLDEIKDDPK NYHETDVEVD PNAELSGVYR YIGAGGTVQR
PTQEGPAMMF NNVKGFDPDR VLTGLMASRR RVGKMFHHYD QTLGQYLNEA VSNPVAPETV AEADAPAHDV
VYKATDEGFD IRKLVAAPTN TPQDAGPYIT VGVVFGSSMD KSKSDVTIHR MVLEDKDKLG IYIMPGGRHI
GAFAEEYEKA
NKPMPITINI GLDPAITIGA TFEPTTPFG YNELGVAGAI RNQAVQLVDG
VTVDEKAIAR SEYTLGYIM PNERIQEDIN THTGKAMPEF PGYDGDANPA
LQVIKVTAVT HRKNAIMQSV IGPSEEHVSM AGIPTEASIL QLVNRAIPGK VTNVYNPPAG GGKLMTIMQI
HKDNEADEGI QRQAALLAFS AFKELKTIVL VDEDVDIFDM NDVIWMTNTR FQADQDLMVL SGMRNHPLDP
SERPQYDPKS IFRGMSSKL VIDGTVPFDM KDQFERAQFM KVADWEKYLK
```

La subunidad B de la galato descarboxilasa de *L. plantarum* WCFS1 (IpdB) tiene la secuencia en el Número de Acceso de GenBank. F9UT67:

```
atgaaacgaa ttgtgtggg aatcacggga gctccgga cgaattacgc ggtcgactta ttagaaaagt tacatcagcg gccagatgtt
gaagttcatc tggtaatgag tgcgtgggct aaaaaaact tggagttaga gactgattac tcgctcgcgc agctgacggc gctcggat
gctacttatc gggctaata ccaaggcgca gcgattgcca cgggttcgtt ttgaaatgac ggaatgtgca ttgtccagc tagtatgaag
acggtagcag ggattgcgta cggcttcggt gataatttaa tatcgcgggc tgctgatgac acgattaaag aacaacgtaa acttgtgatt
gtccacgtg aaacaccgtt aagcgtgatt catttagaaa atctaacgaa gtgggcaaaa ctggtgccc aaattattcc accgattccc
gcgtttata atcatccga atccattcag gatctggtca atcatcaac catgaaaatt ttagatgcgt tcatattca taatgaaact
gatcgccgtt gggaggggga ttaa
MKRIVVGITG ASGTIYAVDL LEKLHQRPDV EVHLVMSAWA KKNLETDY SLAQLTALAD ATYRANDQGA
AIASGSFLND GMVIVPASMK TVAGIAYGFG DNLISRAADV TIKEQRKLV VPRETPLSVI HLENLTAKL LGAQIIPPI
AFYNHPQSIQ DLVNHQTMKI LDFHIHNET DRRWEGD
```

La subunidad D de, por ejemplo, la galato descarboxilasa de *L. plantarum* (IpdD) tiene la secuencia en el Número de Acceso de GenBank. F9UT68:

atggcaactt ttacgactga gcaggccggg tatcaaatgc aagcaatact ccaagtgtt ggatatgact tggtagctgt cgttaccggt
 gggaccaatc cccatattgg tgacgtgacc acactaactg ccagcacggt tcccgaacg gtttaagttc ccagccatga tggtcgcttc
 cacaagata actttatttc ggaacgaatg gccaaagcga ttacgctgta tctagctgga agctgtacaa ttactgcggg aattcatgtc
 aaccaaatta ctaaagcaca aatagcagct gcggcaccaa tgacggatga cctcagccgc cagattatta gctggttaca ggcccatccc
 gtccaggctg aaaagccgga atattatgga caagacgagc aaccgcggtg g

MATFTTEQAG YQMQUALQVI GYDLLIVVTG GTNPHIGDVT TLASTVPET VKFPSHDGRF HKDNFISERM
 AKRIQRYLAG SCTITAGIHV NQITKAQIAA AAPMTDDLRS QIISWLQAHP VQAEKPEYYG QDEQPR

- En las especies de *L. plantarum* que expresan galato descarboxilasa, y otras especies que expresan galato descarboxilasa, tales como *Streptococcus galloylyticus*, el ácido gálico liberado de los taninos, por ejemplo, por acción de las enzimas tanino acil hidrolasa, puede descarboxilarse a pirogalol, pero estas especies carecen de la capacidad de degradar aún más este producto. Se conocen enzimas galato descarboxilasa de varias fuentes microbianas, incluyendo, pero no limitadas a, *Lactobacillus plantarum*, por ejemplo, *L. plantarum* WCFS1. La actividad galato descarboxilasa está ampliamente presente entre las bacterias del ácido láctico, por ejemplo, *L. brevis*, *L. casei* y *L. fermentum*.
- En una realización, la galato descarboxilasa comprende un polipéptido de galato descarboxilasa C, tal como, pero sin limitarse a, un polipéptido lpdC de *L. plantarum*. En otra realización, un microbio útil en los métodos y composiciones descritos en la presente memoria codifica y expresa polipéptidos de galato descarboxilasa C y B. En tales microbios o composiciones preparadas a partir de ellos, el polipéptido B no está necesariamente unido al polipéptido C, sino que parece ser importante para generar enzima galato descarboxilasa altamente activa. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos lpdC y lpdB de especies de *L. plantarum*, incluyendo, pero sin limitarse a, *L. plantarum* WCFS1, entre otros. Las galato descarboxilasas codificadas y expresadas por otras especies y que catalizan la misma reacción también pueden ser útiles en diversas realizaciones de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, como pueden serlo variantes de origen natural o creadas artificialmente que retienen la capacidad de catalizar la misma reacción.
- Los métodos para expresar o producir galato descarboxilasa recombinante son similares a aquellos para producir enzimas tanino acil hidrolasa recombinantes u otras preparaciones enzimáticas recombinantes. Véase, por ejemplo, Jimenez et al., Appl. Environ. Microbiol. 79: 4253-4263 (2013). La actividad galato descarboxilasa puede ensayarse también como se describe en la misma, y los autores describen adicionalmente cebadores de PCR y amplificación por PCR para identificar especies que codifican actividad enzimática y para preparar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos enzimáticos, por ejemplo, para la clonación en vectores de expresión para sobreexpresión.
- En una realización, una enzima galato descarboxilasa tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con el polipéptido C catalítico de galato descarboxilasa de *L. plantarum* lpdC de la cepa WCFS1 como se describe en la presente memoria y retiene al menos el 50 % de la actividad galato descarboxilasa del polipéptido lpdC cuando se expresa en presencia del polipéptido lpdB. Las variaciones contempladas en una molécula de enzima galato descarboxilasa incluyen, por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos como se define el término en la presente memoria
- Por tanto, en una realización, una enzima galato descarboxilasa tiene 50 o menos, por ejemplo, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 15 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o una o menos sustituciones conservativas de aminoácidos en relación con una enzima galato descarboxilasa de tipo salvaje, o en relación con una enzima galato descarboxilasa codificada y expresada por *L. plantarum* WCFS1, y retiene al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o más actividad, con relación a una enzima de tipo salvaje o la codificada y expresada por *L. plantarum* WCFS1. En otra realización, una enzima galato descarboxilasa tiene al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o más identidad de secuencia con un polipéptido C catalítico de galato descarboxilasa de *L. plantarum* lpdC de la cepa WCFS1 como se describe en la presente memoria y retiene al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o más de la actividad galato descarboxilasa de un polipéptido lpdC cuando se expresa en presencia de un polipéptido lpdB. Se contempla que algunas mutaciones pueden mejorar potencialmente la actividad relevante, de manera que una variante de galato descarboxilasa tiene más del 100 % de la actividad de un polipéptido de tipo salvaje o nativo, por ejemplo, el 110 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 500 %, 1.000 % o más.

Microbios sintetizadores de enzimas de elagitanino (EES)

- Se conocen varias especies microbianas que codifican y pueden producir enzimas tanasa como se describe en la presente memoria, como son especies que codifican y pueden producir galato descarboxilasa como se describe en la presente memoria. En una realización, una especie o cepa microbiana única puede expresar tanto enzimas tanasa como galato descarboxilasa. En otra realización, cada enzima está codificada y puede ser expresada por una especie o cepa diferente; en tales casos, generalmente es beneficioso administrar ambas especies o cepas para proporcionar

el mejor beneficio en términos de metabolismo de elagitaninos y producción de urolitinas. Además de los microbios que pueden expresar de forma nativa las enzimas tanasa y/o galato descarboxilasa, los microbios pueden modificarse por ingeniería para expresar de forma recombinante las enzimas de interés. En una realización, una especie o cepa microbiana puede modificarse de manera que tanto las enzimas tanasa como galato descarboxilasa puedan modificarse por ingeniería para incluir un polinucleótido que codifica las enzimas y, por tanto, pueda expresarse de manera recombinante. En otra realización, una especie o cepa microbiana puede modificarse de manera que se codifiquen enzimas tanasa o galato descarboxilasa y puedan expresarse de manera recombinante.

Es posible identificar una especie o cepa de microbios que codifica una enzima o grupo de genes de enzimas dado usando, por ejemplo, secuenciación genómica. Una vez que se identifica que una especie o cepa codifica una enzima o grupo de genes de enzimas dado, se puede determinar si la bacteria produce realmente la o las enzimas usando transcriptómica, RT-PCR o análisis de proteínas expresadas mediante transferencia Western u otro ensayo basado en anticuerpos o mediante un ensayo para la actividad enzimática que se conocía previamente.

Lactobacillus plantarum es una especie ejemplar que codifica y puede expresar enzimas tanasa y galato descarboxilasa. En algunas realizaciones, se usa *Streptococcus gallolyticus* (Genetic and biochemical approaches towards unravelling the degradation of gallotannins by *Streptococcus gallolyticus*, Microb Cell Fact. 31 de octubre de 2014; 13:154, doi: 10.1186/s12934-014-0154-8).

Combinaciones

Dado que ciertos factores pueden influir en la cantidad efectiva de la composición de elagitanino y la cantidad efectiva de microbios que codifican y pueden expresar las enzimas tanino acil hidrolasa y galato descarboxilasa, también debe entenderse que diversas combinaciones de cantidad de elagitanino y cantidad de microbios pueden proporcionar una cantidad efectiva para promover la producción de urolitinas en el intestino como se describe en la presente memoria. Así, por ejemplo, una combinación puede incluir una composición de elagitanino, y una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino. En la invención, la una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima tanino acil hidrolasa, una enzima galato descarboxilasa, o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, una composición enzimática puede ser un microbio EES.

En algunas realizaciones, una combinación puede incluir de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 10 g, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 5 g, de 10 mg a aproximadamente 2.500 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 10 g, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 5 g, o de 100 mg a aproximadamente 2.500 mg de una composición de elagitanino. En algunas realizaciones, una combinación puede incluir al menos 10 mg, al menos 50 mg, al menos 100 mg, al menos 150 mg, al menos 200 mg, al menos 250 mg, al menos 300 mg, al menos 350 mg, al menos 400 mg, al menos 450 mg, al menos 500 mg, al menos 550 mg, al menos 600 mg, al menos 650 mg, al menos 700 mg, al menos 800 mg, al menos 850 mg, al menos 900 mg, al menos 950 mg, al menos 1.000 mg (1 g), al menos 1.250 mg, al menos 1.500 mg, al menos 2.000 mg, al menos 2.500 mg, al menos 3.000 mg, al menos 3.500 mg, al menos 4.000 mg, al menos 4.500 mg, al menos 5.000 mg o más de una composición de elagitanino. En algunas realizaciones, una combinación puede incluir como máximo 50 mg, como máximo 100 mg, como máximo 150 mg, como máximo 200 mg, como máximo 250 mg, como máximo 300 mg, como máximo 350 mg, como máximo 400 mg, como máximo 450 mg, como máximo 500 mg, como máximo 550 mg, como máximo 600 mg, como máximo 650 mg, como máximo 700 mg, como máximo 800 mg, como máximo 850 mg, como máximo 900 mg, como máximo 950 mg, como máximo 1.000 mg (1 g), como máximo 1.250 mg, como máximo 1.500 mg, como máximo 2.000 mg, como máximo 2.500 mg, como máximo 3.000 mg, como máximo 3.500 mg, como máximo 4.000 mg, como máximo 4.500 mg, como máximo 5.000 mg, como máximo 5.500 mg, como máximo 6.000 mg, como máximo 6.500 mg, como máximo 7.000 mg, como máximo 7.500 mg, como máximo 8.000 mg, como máximo 8.500 mg, como máximo 9.000 mg, como máximo 9.500 mg, o como máximo 10 g de una composición de elagitanino.

En algunas realizaciones, una composición puede incluir aproximadamente 10^5 UFC a 10^{12} UFC, aproximadamente 10^5 UFC a 10^{10} UFC, o aproximadamente 10^8 UFC a 10^{12} UFC de uno o más microbios EES. En algunas realizaciones, una composición puede incluir al menos 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , 5×10^6 , 10^7 , 5×10^7 , 10^8 , 5×10^8 , 10^9 , 5×10^9 , 10^{10} , 5×10^{10} , 10^{11} , 5×10^{11} , 10^{12} o más de uno o más microbios EES.

La cantidad de una composición de elagitanino efectiva para promover la producción de urolitinas variará con, por ejemplo, la cantidad y/o actividad de los microbios en el intestino que pueden metabolizar elagitaninos. Por tanto, cuando se consume o administra una composición de elagitanino con una preparación o formulación que comprende microbios que codifican y expresan enzimas tanino acil hidrolasa y/o galato descarboxilasa, la cantidad de composición de elagitanino efectiva para promover la producción de urolitinas será generalmente menor que en el caso en el que se consumen o administran elagitaninos sin tales microbios. Debe entenderse que cuando los niveles de expresión de enzimas de microbios que codifican y expresan enzimas tanino acil hidrolasa y/o galato descarboxilasa pueden variar, la cantidad de microbios necesaria para promover la producción de urolitinas variará con tales niveles de expresión; es decir, la cantidad de una cepa o cepas microbianas dadas puede ajustarse para su efecto dependiendo de los niveles relativos de enzimas tanino acil hidrolasa y/o galato descarboxilasa que se producen. También debe observarse que la presencia de elagitaninos puede inducir la expresión de enzimas necesarias para metabolizarlos en microbios que pueden codificar tales enzimas - véase, por ejemplo, el Ejemplo 2. Por lo tanto, cuando los microbios

se exponen o se han expuesto recientemente a elagitaninos una cantidad de microbios necesaria para promover la producción de urolitinas puede ser menor que una cantidad necesaria cuando los microbios no se han expuesto de este modo antes de la administración o el consumo.

En una realización, el tratamiento efectivo puede determinarse mediante un aumento en la concentración de urolitinas en orina excretada en al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 % en comparación con el nivel de urolitinas en orina antes del tratamiento con una composición que comprende una composición de elagitanino o una composición de elagitanino en combinación con microbios que codifican y expresan una tanino acil hidrolasa y/o una galato descarboxilasa como se describe en la presente memoria. En algunas realizaciones, la eficacia se puede evaluar midiendo el grado de estrés oxidativo de las células en una muestra biológica antes y después de la administración de una composición como se describe en la presente memoria. El grado de estrés oxidativo de las células puede evaluarse, por ejemplo, midiendo la expresión de biomarcadores de estrés oxidativo, tales como proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP) o determinando la relación de formas oxidadas a reducidas de glutatión. Los niveles elevados de estrés oxidativo pueden ser citotóxicos, por lo que el grado de estrés oxidativo puede medirse evaluando la concentración de proteínas intracelulares presentes en la circulación sistémica de células inflamadas o lisadas, por ejemplo, el estrés oxidativo de cardiomiocitos puede determinarse evaluando los niveles de troponina-I en sangre. El estrés oxidativo del hígado puede determinarse por la presencia de niveles aumentados de enzimas hepáticas en el torrente sanguíneo, incluyendo, pero sin limitarse a, alanina transaminasa (ALT), aspartato transaminasa (AST), fosfatasa alcalina (ALP) y gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT).

En algunas realizaciones, el tratamiento efectivo puede determinarse mediante un aumento en la concentración de urolitinas en el intestino de un sujeto en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 % en comparación con el nivel de urolitinas en el intestino antes del tratamiento con una composición que comprende una composición de elagitanino o una composición de elagitanino en combinación con microbios que codifican y expresan una tanino acil hidrolasa y/o una galato descarboxilasa como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, el tratamiento efectivo puede determinarse mediante un aumento en la concentración de urolitinas en el plasma de un sujeto en al menos un 10 %, al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 % o al menos un 50 % en comparación con el nivel plasmático de urolitinas antes del tratamiento con una composición que comprende una composición de elagitanino o una composición de elagitanino en combinación con microbios que codifican y expresan una tanino acil hidrolasa y/o una galato descarboxilasa como se describe en la presente memoria.

En algunas realizaciones, un sujeto se evalúa usando uno o más procedimientos de diagnóstico adicionales, por ejemplo, mediante imagenología médica, examen físico, prueba(s) de laboratorio, historial clínico, historial familiar y prueba genética. Las técnicas de imagenología médica son métodos bien documentados. Como tal, la imagenología médica se puede seleccionar de cualquier método conocido de imagenología, incluyendo, pero sin limitarse a, ultrasonidos, exploración por tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada por emisión de fotones e imagenología por resonancia magnética.

Biodisponibilidad de una composición de elagitanino

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo sustancial e importante de fenilpropanoides producidos por plantas como metabolitos secundarios con el propósito de la defensa química contra depredadores y participar en la reproducción, así como en la interferencia planta-planta. Estructuralmente, los compuestos fenólicos tienen un anillo aromático con varios grupos hidroxilo unidos a él. Los compuestos fenólicos se clasifican en diferentes grupos basándose en su función, el número de anillos fenólicos que contienen y los radicales que unen estos anillos entre sí. Un factor importante en la determinación de la actividad antioxidante de un compuesto fenólico dado es tanto el número como la posición de los grupos hidroxilo. Por ejemplo, los flavonoides tienen más grupos hidroxilo que otros compuestos fenólicos y esta estructura está asociada con una mayor actividad antioxidante. Además de proporcionar actividad antioxidante, la estructura de un compuesto fenólico puede afectar a la solubilidad del fenol y/o impartir efectos estéricos con respecto a la interacción con otras moléculas.

Se ha informado que la estructura de tales compuestos puede desempeñar un papel en su biodisponibilidad. Si un compuesto está biodisponible depende de la formulación, las características de absorción, la velocidad de vaciado gástrico, la vía de administración, la cinética de degradación y eliminación en un sujeto dado. Por tanto, la biodisponibilidad de un compuesto puede variar de un individuo al siguiente. La biodisponibilidad puede evaluarse usando un ensayo para medir los niveles de un compuesto dado en la circulación sistémica, y en particular, en sangre, plasma y/u orina.

Otro determinante importante de la biodisponibilidad es la "bioaccesibilidad," que se refiere a la cantidad de un constituyente alimentario, nutriente (por ejemplo, polifenoles) etc. que se libera desde la matriz alimentaria al intestino y puede absorberse a través de la barrera intestinal. La bioaccesibilidad se refiere al grado en el que se mastica un alimento, si el alimento está cocinado o sin tratar, al tiempo de vaciado gástrico, al tiempo de tránsito intestinal, a la cantidad de fibra o grasa en el alimento, lo que se consume junto con el alimento, a los cofactores necesarios para la absorción, a la presencia de microorganismos particulares y a la complejidad de la estructura de la matriz del alimento.

Un compuesto biodisponible puede no ser bioactivo simplemente porque se absorbe. Por ejemplo, algunos nutrientes no son directamente activos y requieren metabolismo a un metabolito bioactivo. Además, algunos polifenoles son

compuestos de alto peso molecular que se unen principalmente a la fibra o proteína dietética que permanece insoluble en el disolvente habitual y requiere una etapa adicional de hidrólisis durante la extracción para hacerlos solubles y biodisponibles.

- 5 Los compuestos fenólicos pueden tener grados variables de biodisponibilidad en base a su estructura, procesamiento del alimento y características de la matriz, y del huésped, entre otros. Por ejemplo, la biodisponibilidad de los fenoles varía en un amplio intervalo del 0,3 % estimado para antocianinas hasta el 43 % en el caso de isoflavonas.

- 10 Los taninos hidrolizables y las proantocianidinas son polifenoles que tienen un alto grado de extracción del alimento y, por tanto, biodisponibilidad para el huésped. Se cree que la bioactividad de los taninos depende del grado de polimerización y su solubilidad en el intestino, por ejemplo, los taninos altamente polimerizados tienen baja biodisponibilidad en el intestino delgado y no son fermentados fácilmente por la microflora colónica. Las bajas tasas de fermentación reducen la biodisponibilidad de metabolitos aguas abajo, por ejemplo, urolitinas. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe una composición administrada para modificar o aumentar la biodisponibilidad de las urolitinas en el intestino.

- 15 En algunas realizaciones, un método es un método para aumentar la biodisponibilidad de una composición de elagitanino para un sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de biodisponibilidad de un elagitanino de la composición de elagitanino en el intestino de un sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende comparar el nivel de biodisponibilidad del elagitanino de la composición de elagitanino en el intestino del sujeto con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es un nivel de referencia de biodisponibilidad histórico para un elagitanino, un nivel de biodisponibilidad de un elagitanino en el intestino del sujeto antes de recibir una combinación; o nivel de biodisponibilidad de un elagitanino en el intestino de un sujeto comparable que no ha recibido la combinación.

- 20 En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de urolitina producida en el plasma de un sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende comparar el nivel de urolitina en el plasma de un sujeto con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es una concentración de urolitina en plasma, por ejemplo, 0,2-20 μM (Espin JC, Larrosa M, Garcia-Connea MT, Tomás-Barberán F. Biological significance of urolitins, the gut microbial elagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:270418. doi:10.1155/2013/270418). En algunas realizaciones, un nivel de referencia es una concentración de urolitina en plasma de al menos 0,1 μM , al menos 0,2 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM , al menos 5 μM , al menos 10 μM o al menos 15 μM . En algunas realizaciones, un nivel de referencia es una concentración de urolitina en plasma de al menos 0,5 μM , como máximo 1 μM , como máximo 5 μM , como máximo 10 μM , como máximo 15 μM , como máximo 20 μM , o como máximo 25 μM .

En algunas realizaciones, un nivel de referencia, ya sea en el intestino o plasma, es un nivel de referencia histórico de una urolitina, un nivel de urolitina en el intestino del sujeto antes de recibir una combinación, o un nivel de urolitina en el intestino de un sujeto comparable que no ha recibido una combinación.

- 35 La concentración de urolitina A puede alcanzar hasta niveles micromolares (μM) en plasma sin ningún efecto tóxico aparente in vivo. Por ejemplo, tras el consumo de zumo de granada por seres humanos, los niveles plasmáticos máximos de UA pueden alcanzar de 14 a 40 μM , pero puede haber amplias variaciones entre individuos (véase, por ejemplo, Cerda et al., Eur. J. Nut. 43: 205-220). Es probable que una amplia variación entre individuos se deba a diferencias en la microbiota. Selma et al. identificaron bacterias en monocultivo (*Gordonibacter urolitinfaciens* y *Gordonibacter pamelaee* DSM 19378T) que pueden metabolizar ácido elágico para producir ácido lúteo, urolitina M-5, urolitina M-6 y urolitina C. Sin embargo, estas bacterias cultivadas eran incapaces de producir productos aguas abajo, urolitina A y urolitina B; véase Selma et al., Food & Nut. 5: 1779-1784 (2014).

Métodos de tratamiento

- 45 La presente divulgación reconoce que las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser útiles en el tratamiento de sujetos. Los métodos proporcionados por la presente divulgación, pero no parte de la invención reivindicada, incluyen métodos para el tratamiento de ciertas enfermedades, trastornos y afecciones. En algunas realizaciones, las enfermedades, trastornos y afecciones relevantes pueden ser o incluir enfermedades y afecciones hepáticas o trastornos asociados con disfunción mitocondrial.

- 50 Generalmente, los métodos de tratamiento proporcionados por la presente divulgación implican administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un probiótico solo o en combinación con una composición de elagitanino como se describe en la presente memoria a un sujeto que necesita, o que se ha determinado que necesita, dicho tratamiento.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento proporcionados en la presente memoria son terapéuticos, por ejemplo, se pueden administrar a sujetos después del desarrollo de síntomas significativos de enfermedades o trastornos asociados con disfunción mitocondrial.

- 55 En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento proporcionados se administran a un sujeto que es un mamífero, por ejemplo, un mamífero que experimenta una enfermedad, trastorno o afección como se describe en la presente

memoria; en algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano o un sujeto veterinario no humano, por ejemplo, un simio, gato, perro, mono o cerdo.

En muchas realizaciones, "tratamiento" implica mejorar al menos un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección asociada con enfermedades o trastornos asociados con disfunción mitocondrial. En algunas realizaciones, un método de tratamiento puede ser profiláctico.

En algunas realizaciones, los métodos pueden incluir la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un probiótico y/o una composición de elagitanino antes, durante (por ejemplo, simultáneamente con) o después de la administración de un tratamiento que se espera que esté asociado con enfermedad o trastornos hepáticos asociados con disfunción mitocondrial.

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en la presente memoria pueden administrarse en una forma que contiene uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados se han descrito previamente y varían con la forma y modo de administración deseados de una composición. Por ejemplo, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden incluir diluyentes o excipientes tales como cargas, aglutinantes, agentes humectantes, disgregantes, agentes tensioactivos, deslizantes y lubricantes. Típicamente, un vehículo puede ser un sólido (incluyendo polvo), líquido o cualquier combinación de los mismos. Cada vehículo es preferiblemente "aceptable" en el sentido de ser compatible con otros ingredientes en la composición y no perjudicial para un sujeto. Un vehículo puede ser biológicamente aceptable e inerte (por ejemplo, permite que la composición mantenga la viabilidad del material biológico hasta que se suministre al sitio apropiado).

Las composiciones orales pueden incluir un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para fines de administración terapéutica oral, un compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, pastillas para chupar, pastillas, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Las composiciones orales también se pueden preparar combinando una composición de la presente divulgación con un alimento. En algunas realizaciones, los microbios pueden formularse en un artículo alimenticio. Algunos ejemplos no limitantes de artículos alimenticios que se van a usar con los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen: polos, quesos, cremas, chocolates, leche, carne, bebidas, vegetales encurtidos, kéfir, miso, chucrut, etc. En otras realizaciones, los artículos alimenticios pueden ser zumos, bebidas refrescantes, bebidas de té, preparaciones de bebidas, bebidas de gelatina y bebidas funcionales; bebidas alcohólicas tales como cervezas; alimentos que contienen hidratos de carbono tales como productos alimenticios de arroz, fideos, panes y pastas; productos pastosos tales como pescado, jamones, salchichas, productos pastosos de marisco; productos de bolsa de retorta tales como grosellas, alimentos aliñados con una salsa amilácea espesa y sopas chinas; sopas; productos lácteos tales como leche, bebidas lácteas, helados y yogures; productos fermentados tales como pastas de soja fermentadas, bebidas fermentadas y encurtidos; productos de judía; diversos productos de confitería, incluyendo bizcochos, galletas y similares, caramelos, gomas de mascar, chicles, postres fríos, incluyendo jaleas, caramelos cremosos y postres congelados; alimentos instantáneos, tales como sopas instantáneas y sopas instantáneas de soja; y similares. Se prefiere que las preparaciones de alimentos no requieran cocción después de la mezcla con la o las cepas microbianas para evitar matar a cualquier microbio.

En una realización, un alimento usado para la administración se enfría, por ejemplo, agua con sabor a hielo. En ciertas realizaciones, el artículo alimenticio no es un alimento potencialmente alergénico (por ejemplo, no es soja, trigo, cacahuete, nueces de árbol, productos lácteos, huevos, mariscos o pescado). Los agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o esterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, aroma de naranja u otros aromatizantes adecuados. Estos son solo con fines de ejemplo y no pretenden ser limitantes.

En una realización relacionada, se contempla que las composiciones descritas en la presente memoria comprendan uno o más microbios como se describe en la presente memoria en combinación con una bacteria de ácido láctico viable en combinación con cualquier material que se va a absorber, incluyendo, pero sin limitarse a, suplementos nutricionales, productos alimenticios, vitaminas, minerales, medicamentos, composiciones terapéuticas, antibióticos, hormonas, esteroides y compuestos similares, donde es deseable asegurar la absorción eficiente y sana de materiales desde el tracto gastrointestinal a la sangre. La cantidad de material incluida en la composición puede variar ampliamente dependiendo del material y del propósito previsto para su absorción, de manera que la composición no debe considerarse como limitante.

Composiciones farmacéuticas

En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden microbios probióticos o combinaciones de microbios probióticos y composiciones de elagitanino. En algunas realizaciones, tales composiciones se usan para tratar enfermedades o trastornos hepáticos asociados con disfunción mitocondrial en un sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones para su uso de acuerdo con la presente divulgación son composiciones

farmacéuticas, por ejemplo, para la administración (por ejemplo, administración oral) a un mamífero (por ejemplo, un ser humano). Las composiciones farmacéuticas incluyen típicamente un agente activo (por ejemplo, cepas microbianas individuales o combinaciones de cepas microbianas con composiciones de elagitanino), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ciertos vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen, por ejemplo,

solución salina, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente divulgación puede incluir y/o puede administrarse junto con uno o más compuestos activos suplementarios; en ciertas realizaciones, tales agentes activos suplementarios pueden incluir jengibre, curcumina, probióticos (por ejemplo, cepas probióticas de uno o más de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, y/o *Escherichia coli* (véase, Fijan, Int J Environ Res Public Health. mayo 2014; 11(5): 4745-4767); prebióticos (ingredientes alimentarios no digeribles que ayudan a soportar el crecimiento de microbios probióticos, por ejemplo, fructanos tales como fructooligosacáridos (FOS) e inulinas, galactanos tales como galactooligosacáridos (GOS), fibras dietéticas tales como almidón resistente, pectina, beta-glucanos y xilooligosacáridos (Hutkins et al., Curr Opin Biotechnol. 2016 feb; 37: 1-7) y combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas se formulan típicamente para que sean compatibles con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración oral. Se han descrito métodos para formular composiciones farmacéuticas adecuadas, véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª ed., 2005; y los libros en la serie Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY). Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Para dar solo algunos ejemplos, en algunas realizaciones, una formulación oral puede ser o comprender un jarabe, un líquido, un comprimido, un trocisco, una gominola, una cápsula, por ejemplo, cápsulas de gelatina, un polvo, un gel, una película, etc.

En algunas realizaciones, los agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de una composición farmacéutica. En algunas realizaciones particulares, una composición farmacéutica puede contener, por ejemplo, uno cualquiera o más de los siguientes ingredientes inactivos, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Esterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja. En algunas realizaciones, las composiciones pueden tomarse tal cual o rociarse sobre o mezclarse en un alimento o líquido (tal como agua). En algunas realizaciones, una composición que puede administrarse a mamíferos como se describe en la presente memoria puede ser o comprender un artículo ingerible (por ejemplo, un alimento o bebida) que comprende (por ejemplo, está suplementado) con una cepa microbiana individual o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero, extractos de la misma y/o componentes de la misma.

En algunas realizaciones, un alimento puede ser o comprender una o más de barritas, caramelos, productos horneados, cereales, aperitivos salados, pastas, chocolates y otros alimentos sólidos, así como alimentos líquidos o semisólidos que incluyen yogur, sopas y estofados, y bebidas tales como batidos de frutas, batidos, zumos y otras bebidas carbonatadas o no carbonatadas. En algunas realizaciones, los alimentos se preparan por un sujeto mezclando cepas microbianas individuales o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero, extractos de las mismas y/o componentes de las mismas.

Las composiciones pueden incluirse en un kit, recipiente, envase o dispensador, junto con instrucciones para la administración o para su uso en un método descrito en la presente memoria.

Los expertos en la técnica, leyendo la presente divulgación, apreciarán que, en algunas realizaciones, una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) como se describe en la presente memoria puede ser o comprender una o más células, tejidos u organismos (por ejemplo, células, tejidos u organismos vegetales o microbianos) que producen (por ejemplo, han producido y/o están produciendo) un compuesto relevante.

En algunas realizaciones, una cepa microbiana individual o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero que se han eliminado (por ejemplo, eliminados por calor). Alternativamente, en algunas realizaciones, una cepa microbiana individual o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero pueden incluir células que son viables o están vivas.

En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento como se describen en la presente memoria implican administrar una cepa microbiana individual viable o viva o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero. En algunas de tales realizaciones, se administra una cepa microbiana individual viable o viva o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero según un régimen que logra la población del microbioma del sujeto con células administradas.

En algunas realizaciones, una cepa microbiana individual viable o viva o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero como se describe en la presente memoria comprende y/o se formula mediante el uso de uno o más cultivos celulares y/o sobrenadantes o sedimentos de los mismos, y/o un polvo formado a partir de los mismos.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria puede promover la colonización de una cepa microbiana individual o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero, particularmente cepa(s) microbiana(s) que se ha identificado, caracterizado o evaluado que disminuyen la gravedad o incidencia de una enfermedad o afección de mamífero, en un mamífero que padece de o está en riesgo de la enfermedad o afección de mamífero. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria puede atenuar la colonización de una cepa microbiana individual o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero, particularmente cepa(s) microbiana(s) que se ha identificado, caracterizado o evaluado que aumentan la gravedad o incidencia de una enfermedad o afección de mamífero, en un mamífero que padece de o está en riesgo de la enfermedad o afección de mamífero. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en la presente memoria puede promover la colonización de una cepa microbiana individual o combinaciones de cepas microbianas de un microbioma de mamífero, particularmente cepa(s) microbiana(s) que se ha identificado, caracterizado o evaluado que no afectan a la gravedad o incidencia de la enfermedad o afección de mamífero pero se ha identificado, caracterizado o evaluado que son capaces de competir con ventaja frente a una o más cepas microbianas que se ha identificado, caracterizado o evaluado que aumentan la gravedad o incidencia de una enfermedad o afección de mamífero, en un mamífero que padece de o está en riesgo de la enfermedad o afección de mamífero.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica se adapta a un mamífero específico (por ejemplo, un sujeto humano específico) basado en el microbioma de ese mamífero (por ejemplo, el ser humano). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica es específica para un microbioma de un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica es específica para microbiomas de una población de mamíferos (por ejemplo, seres humanos). Las poblaciones de mamíferos pueden incluir, pero no se limitan a: familias, mamíferos en la misma ubicación regional (por ejemplo, vecindario, ciudad, estado o país), mamíferos con la misma enfermedad o afección, mamíferos de una edad o intervalo de edad particular, mamíferos que consumen una dieta particular (por ejemplo, alimento, fuente de alimentos o ingesta calórica).

Tratamiento de trastornos asociados con disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial es una incapacidad de las mitocondrias para experimentar los procesos asociados con la función normal, y puede surgir como resultado de, por ejemplo, problemas con el transporte de electrones y la síntesis de ATP, la falta de sustratos esenciales o el bajo número de mitocondrias en la célula. Varios trastornos mitocondriales están asociados con disfunción mitocondrial, incluyendo, por ejemplo, miopatía mitocondrial, diabetes mellitus y sordera (DAD), neuropatía óptica hereditaria de Leber, síndrome de Leigh, encefalopatía gastrointestinal mioneurogénica, epilepsia mioclónica con fibras rojas rasgadas, síndrome de agotamiento de ADN mitocondrial, demencia de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), retardo mental, sordera y ceguera, diabetes, obesidad, enfermedad cardiovascular, accidente cerebrovascular y enfermedades autoinmunitarias tales como esclerosis múltiple, síndrome de Sjogrens, lupus y artritis reumatoide.

La mitofagia es un proceso de autofagia que se dirige específicamente a mitocondrias no funcionales o disfuncionales y es crucial para mantener la homeostasis mitocondrial. Los niveles de nutrientes y los estresantes nutricionales pueden conducir a cambios en el recambio mitocondrial relacionado con la mitofagia e impactar en la función mitocondrial general. La urolitina A puede inducir mitofagia en el tejido muscular e intestinal, al tiempo que también potencia la biogénesis mitocondrial, lo que conduce a una función mitocondrial mejorada. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe métodos de tratamiento de trastornos mitocondriales y composiciones diseñadas para dicho tratamiento.

Se sabe que muchas enfermedades humanas están asociadas con mitocondrias disfuncionales, incluyendo, pero no limitado a, diversos cánceres, enfermedades neurodegenerativas y trastornos metabólicos. En algunas realizaciones, la presente divulgación puede conducir a cambios en la función mitocondrial para mejorar la salud general. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la presente divulgación describe la mejora de la función mitocondrial mediante el aumento de la biodisponibilidad de diversos nutrientes, incluyendo, pero no limitado a, elagitaninos y sus metabolitos asociados.

Tratamiento de enfermedades con poliglutamina (poliQ)

Las proteínas con poliglutamina expandida (poliQ) pueden agregarse intracelularmente, por ejemplo, en trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad que incluyen (entre otros) la enfermedad de Huntington. Generalmente, las enfermedades poliQ se caracterizan por una mutación genética en la expansión de la repetición del triplete citosina-adenina-guanina. La mutación conduce a elementos repetidos extendidos de proteína que causan la extensión poliQ. Estas enfermedades se caracterizan por deterioro cognitivo, resultante de la pérdida progresiva de la función neuronal. Los detalles mecanísticos exactos sobre la causa de la toxicidad de poliQ expandida no se entienden completamente. El fenotipo sorprendente es una agregación de proteínas poliQ expandidas. Se sabe que diferentes rutas celulares, incluyendo la ruta de degradación lisosomal, la autofagia y la degradación del proteasoma promueven la eliminación

de la proteína poliQ. En algunas realizaciones, la divulgación describe el descubrimiento de nuestra formulación de producto (extracto de granada y *L. plantarum* MBT501) mitigando los agregados de poliQ en gusanos transgénicos que expresan repeticiones de poliQ.

Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden comprender administrar a un sujeto una composición de elagitanino, una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino, o una combinación como se divulga en la presente memoria de modo que el sujeto esté recibiendo una combinación divulgada en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método es un método para disminuir la formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método es un método para disminuir una cantidad de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, los agregados polipeptídicos son agregados de polipéptido que comprenden una región poliQ (es decir, agregados poliQ). En algunas realizaciones, una región poliQ comprende al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40 o al menos 50 glutaminas. En algunas realizaciones, una célula es o comprende neuronas. En algunas realizaciones, una célula es o comprende tejido del sistema nervioso central.

En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido con un nivel de referencia de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, se determina un nivel de referencia en una célula o tejido de un sujeto al que no se le ha administrado una composición de elagitanino, una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino, o una combinación como se divulga en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método comprende, antes de la administración, determinar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende, después de la administración, determinar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado antes de la administración con un nivel de formación de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado después de la administración.

En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido con un nivel de referencia de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, se determina un nivel de referencia en una célula o tejido de un sujeto al que no se le ha administrado una composición de elagitanino, una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino, o una combinación como se divulga en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método comprende, antes de la administración, determinar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende, después de la administración, determinar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido. En algunas realizaciones, un método comprende comparar un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado antes de la administración con un nivel de agregados polipeptídicos en una célula o tejido determinado después de la administración.

Tratamiento de enfermedades hepáticas

Se ha considerado que la terapia antioxidante es beneficiosa para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo las del hígado. Los niveles de compuestos antioxidantes en el cuerpo pueden verse influenciados por la proteína Nrf2, que se ha mostrado que tiene un papel en enfermedades hepáticas tales como esteatohepatitis no alcohólica, hepatotoxicidad aguda, enfermedad del hígado graso no alcohólica, enfermedad hepática alcohólica, hepatitis viral, fibrosis hepática, IRI hepático y algunos cánceres hepáticos. Se ha informado que bajos niveles de expresión de Nrf2 están asociados con una actividad antioxidante disminuida en la célula. La administración de elagitaninos puede tener efectos positivos sobre la salud del hígado y reducir el daño oxidativo, por ejemplo, protegiendo las células hepáticas del daño celular inducido por etanol a través del aumento de la expresión de Nrf2 para reducir el estrés oxidativo. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe métodos de tratamiento de diversas enfermedades hepáticas a través de la administración de elagitaninos y/o composiciones probióticas solas o combinadas. En algunas realizaciones, dicho tratamiento aumenta la expresión de Nrf2 en una célula hepática, promoviendo la actividad antioxidante en la célula y promoviendo así la salud o función hepática.

El factor 2 derivado del factor nuclear eritroide 2 (NRF2) es un factor de transcripción que regula la expresión de proteínas antioxidantes que protegen contra el daño oxidativo desencadenado por lesión o inflamación. Cuando una célula no está en un estado de estrés, el NRF2 es retenido en el citoplasma por el inhibidor citoplasmático KEAP (proteína 1 asociada a ECH de tipo Kelch) y degradado rápidamente. Sin embargo, cuando una célula está bajo estrés oxidativo, el NRF2 no se degrada y se localiza en el núcleo para inducir la expresión de productos génicos antioxidantes. La localización nuclear de NRF2 puede usarse como una medida indirecta de la actividad de NRF2. Sin embargo, como se ha informado, un método más fácil para determinar la actividad de NRF2 es evaluando los niveles de expresión de genes que están regulados positivamente por NRF2. Tales genes incluyen, pero no se limitan a, NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (Nqo1), glutamato-cisteína ligasa, sulfirredoxina 1 (SRXN1), tioredoxina reductasa 1 (TXNRD1), hemo oxigenasa-1 (HMOX1, HO1), glutatión S-transferasa (GST), UDP-glucuronosiltransferasa (UGT) y proteínas asociadas a resistencia a múltiples fármacos (Mrp).

La presente divulgación proporciona métodos que comprenden administrar a un sujeto una composición de elagitanino, una composición enzimática que comprende una o más enzimas de elagitanino, o una combinación como se divulga en la presente memoria de modo que el sujeto está recibiendo una combinación divulgada en la presente memoria. En algunas realizaciones, un método es un método para modificar un nivel de expresión o un nivel de actividad de Nrf2 en una célula o tejido de un sujeto. En algunas realizaciones, un método es un método para aumentar el nivel de expresión o el nivel de actividad de Nrf2 en la célula o tejido del sujeto.

En algunas realizaciones, un método comprende determinar el nivel de expresión o el nivel de actividad del factor respiratorio nuclear-2 (Nrf2) en la célula o tejido del sujeto. En algunas realizaciones, un método comprende comparar el nivel de expresión o el nivel de actividad de Nrf2 en la célula o tejido con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es un nivel histórico de expresión o actividad de Nrf2, un nivel de expresión o un nivel de actividad del factor respiratorio nuclear-2 (Nrf2) en una célula o tejido comparable del sujeto antes de recibir la combinación, o un nivel de expresión o un nivel de actividad del factor respiratorio nuclear-2 (Nrf2) en una célula o tejido comparable de un sujeto comparable que no ha recibido la combinación. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de expresión o un nivel de actividad de un gen regulado por la expresión de Nrf2 en una célula o tejido del sujeto.

Los compuestos antioxidantes dentro del cuerpo son capaces de proteger a los organismos de procesos reactivos que implican especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, RNS). Estos compuestos pueden proteger al cuerpo humano del estrés oxidativo, que está asociado con enfermedades humanas que incluyen, pero no se limitan a, aterosclerosis, diabetes mellitus, inflamación crónica, trastornos neurodegenerativos y ciertos cánceres. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe una composición y un método de administración para modificar los niveles de antioxidantes en el cuerpo. En algunas realizaciones, un método comprende determinar un nivel de uno o más antioxidantes en una célula o tejido del sujeto. En algunas realizaciones, una célula o tejido de un sujeto comprende una célula hepática o tejido hepático. En algunas realizaciones, un método comprende medir un indicador de la salud o función hepática en un sujeto.

Métodos para aumentar la vida útil

Los métodos de almacenamiento para mejorar la vida útil de los prebióticos y/o probióticos pueden variar dependiendo del organismo implicado. A menudo, las formulaciones probióticas con productos lácteos pueden ser difíciles de almacenar mientras permanecen estables y sabrosas. En algunas realizaciones, la presente divulgación describe un método para aumentar la vida útil de una composición probiótica mediante el uso de uno o más extractos de frutas. En algunas realizaciones, un método para aumentar la vida útil viable de un producto probiótico que comprende un microbio EES como se describe en la presente memoria incluye añadir una composición de elagitanino como se describe en la presente memoria al producto probiótico, donde el microbio EES expresa una o más enzimas de elagitanino descritas en la presente memoria.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir al experto en la técnica cómo hacer y usar los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la identificación de una bacteria, *Lactobacillus planetarium*, que induce la expresión de *gst-4* en el informador de fusión transcripcional CL2166 *dvIs19 [pAF15 (gst-4::gfp-nls)]III^{1,2}* de *C. elegans* usando una pantalla visual cualitativa. *gst-4* codifica glutatión-S-transferasas (GST), un gen antioxidante que está regulado por *skn-1*, un homólogo de Nrf2, un factor de transcripción que desempeña un papel vital en la ruta antioxidante en el ser humano. El factor de transcripción *skn-1* se ha descrito regulando una variedad de genes antioxidantes incluyendo el gen antioxidante *gst-4*³.

Se usó una cepa transgénica CL2166 que expresa GFP sólo en células hipodérmicas cuando se alimenta en *E. coli* OP50 y extracto de granada solamente. Se usó *E. coli* OP50 como control, ya que es una cepa microbiana estándar en la que *Caenorhabditis elegans* se cultiva típicamente en el laboratorio. La bacteria *L. plantarum* sola indujo alguna expresión en el intestino de gusanos. El tratamiento de *L. plantarum* y el extracto de granada en una cepa transgénica CL2166 que expresa GFP indujo la expresión de GFP en todos los intestinos y el cuerpo del gusano (FIG. 1).

Ejemplo 2

Se ensayaron los genes que codifican enzimas de tanasa (*tanB*), galato descarboxilasa (*lpdB*) y galato descarboxilasa (*lpdC*) para determinar si las enzimas están implicadas en el metabolismo de elagitaninos^{4,5}. *L. plantarum* posee la enzima descarboxilasa, que está implicada en la degradación de compuestos polifenólicos, incluyendo extractos de granada, extractos de bayas y extractos de nueces^{6,7} (Fig. 2a). Efecto del extracto de granada o de los compuestos polifenólicos sobre la expresión de genes que codifican enzimas de tanasa (*tanB*), galato descarboxilasa (*lpdB*) y galato descarboxilasa (*lpdC*) se observó mediante qPCR. El tratamiento con extracto de granada prebiótico indujo en gran medida (>3 veces) la expresión de la tanasa (*tanB*), galato descarboxilasa (*lpdB*) y galato descarboxilasa (*lpdC*) (Fig. 2b).

Ejemplo 3

En este método, se ensayó el extracto de granada prebiótico para determinar si puede ayudar en el mantenimiento de *L. plantarum*, p. ej., potenciar la vida útil de la bacteria. Se encontró que el extracto de granada aumenta la vida útil de almacenamiento de *L. plantarum* con el fin de mantener los recuentos de la bacteria *L. plantarum* de manera beneficiosa. *L. plantarum* tratado con extracto de granada mostró el mismo recuento (10 mil millones de UFC) durante 4 semanas. Por el contrario, las bacterias solas mostraron poco más de la mitad del recuento inicial (**Fig. 3a y b**).

Ejemplo 4

La línea celular de hígado humano (HepG) se usó con expresión estable de un gen informador de luciferasa Nrf2 para observar la inducción de Nrf2. Esta línea celular mostró un aumento en la actividad de la luciferasa en respuesta al tratamiento del extracto de granada con *L. plantarum*. La actividad de la luciferasa aumentó a 3 veces en 24 horas de tratamiento, en comparación con bacterias y extracto de granada solos (**Fig. 4a**).

Además, la inducción de Nrf2 se confirmó mediante análisis de transferencia Western de lisados celulares. En un extracto de células completas, se demostró un aumento en la expresión de la proteína Nrf2 mediante el tratamiento de *L. plantarum* con granada. Este aumento fue específico para Nrf2 porque no hubo cambios en la expresión de actina. Por el contrario, no hubo cambios en la expresión de Nrf2 del lisado celular preparado que se trató con *L. plantarum* y extracto de granada solo (**Fig. 4b**).

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que la combinación de la bacteria, *L. planetarium* MBT501 y extracto de granada, mitigó los agregados de poliQ de rmls133 (unc_54p::Q40::YFP) en *C. elegans* usando una pantalla visual cualitativa. Los gusanos adultos jóvenes mostraron que la formación de hasta 140 agregados de repeticiones *PoliQ40* se correlacionan directamente con la observación de la enfermedad humana. Tales agregados pueden contribuir a la toxicidad citoplasmática y enfermedades neurodegenerativas (Morley JF, Brignull HR, Weyers JJ, Morimoto RI. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A. 6 de agosto de 2002; 99(16):10417-22. doi: 10.1073/pnas.152161099. Epub 16 de julio de 2002. PMID: 12122205, PMCID: PMC124929; Kailiang Jia, Anne C. Hart y Beth Levine (2007) Autophagy Genes Protect Against Disease Caused by Polyglutamine Expansion Proteins in *Caenorhabditis elegans*, Autophagy, 3:1, 21-25, DOI: 10.4161/auto.3528; Kokona B, May CA, Cunningham NR, et al. Studying polyglutamine aggregation in *Caenorhabditis elegans* using an analytical ultracentrifuge equipped with fluorescence detection. Protein Sci. 2016; 25(3):605-617, doi:10.1002/pro.2854.

Las repeticiones *PoliQ40* fusionadas con YFP se expresaron en el citoplasma de los músculos de la pared corporal en los gusanos (cepa transgénica unc_54p::Q40::YFP). Se alimentaron los gusanos con: (1) *E. coli* OP50, extracto de granada, (2) *L. planetarium* (MBT501) o (3) *L. planetarium* (MBT501) y extracto de granada. Se usó *E. coli* OP50 como control, ya que es una cepa microbiana estándar en la que *C. elegans* se cultiva típicamente en el laboratorio. Como se muestra, la bacteria *L. plantarum* sola mitigó la formación de agregados *PoliQ40* a algún nivel. Se mostró que el tratamiento de *L. plantarum* y extracto de granada mitigaba la expresión de los agregados *PoliQ40* (**FIG. 5**).

Otras realizaciones

Los expertos en la técnica apreciarán que, a los expertos en la técnica, se les ocurrirán fácilmente diversas alteraciones, modificaciones y mejoras a la presente divulgación. Se pretende que dichas alteraciones, modificaciones y mejoras formen parte de la presente divulgación. Por consiguiente, la descripción y los dibujos anteriores son solo a modo de ejemplo.

Los expertos en la técnica apreciarán estándares típicos de desviación o error atribuibles a valores obtenidos en ensayos u otros procesos como se describe en la presente memoria.

Debe entenderse que, aunque las realizaciones de la invención se han descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación para su uso en medicina que comprende:
 - (a) una composición de elagitanino; y
 - (b) una composición enzimática que comprende un microbio sintetizador de enzima de elagitanino (EES) o un extracto del mismo y una o más enzimas de elagitanino,
 en donde el microbio EES es *Lactobacillus plantarum*;
 en donde la una o más enzimas de elagitanino se seleccionan del grupo que consiste en una enzima tanino acil hidrolasa, una enzima galato descarboxilasa y una combinación de las mismas.
2. La combinación para su uso de la reivindicación 1, en donde la una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima tanino acil hidrolasa, opcionalmente en donde la enzima tanino acil hidrolasa es una enzima tanasa *tanB*.
3. La combinación para su uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima galato descarboxilasa.
4. La combinación para su uso de la reivindicación 3, en donde la enzima galato descarboxilasa es una enzima galato descarboxilasa *lpdB* o una enzima galato descarboxilasa *lpdC*.
5. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima galato descarboxilasa *lpdB* y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*.
6. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la una o más enzimas de elagitanino comprenden una enzima tanasa *tanB*, una enzima galato descarboxilasa *lpdB*, y una enzima galato descarboxilasa *lpdC*.
7. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde a) el microbio EES se encuentra en la naturaleza; y/o b) en donde i) el microbio EES es viable o está vivo, o ii) el microbio EES está liofilizado.
8. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la composición de elagitanino se selecciona del grupo que consiste en un extracto vegetal de granada, fresa, frambuesa, arándano, mora, mora de los pantanos, mora ártica, uvas muscadina, guayaba, una fruta de la familia *Myrtaceae*, nuez, pacana, castaña, anacardo, almendra, pistacho, avellana, nuez de Brasil, vino tinto de macadamia que envejece en barriles de roble, zumo de uvas de muscadina, zumo de granada, té, coñac, grosella de la India, hongos de bistec y combinaciones de los mismos.
9. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un prebiótico, que comprende además opcionalmente un fructooligosacárido, una inulina, un isomaltooligosacárido, un lactilol, una lactosacarosa, una lactulosa, un oligosacárido de soja, un transgalactooligosacárido, un xilooligosacárido o una combinación de los mismos.
10. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la composición de elagitanino, la composición enzimática, o ambas se formulan para administración oral, opcionalmente en donde la formulación para administración oral es un producto lácteo.
11. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la combinación es i) un alimento, una bebida, una composición de pienso o un suplemento nutricional y/o ii) un líquido, jarabe, comprimido, pastilla, goma, cápsula, polvo, gel o película.
12. La combinación para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la combinación es una formulación con recubrimiento entérico.
14. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en el tratamiento o prevención de una afección o trastorno asociado con una cualquiera de disfunción mitocondrial, una enfermedad de poliglutamina (poliQ), una enfermedad hepática, aterosclerosis, diabetes mellitus, inflamación crónica, un trastorno neurodegenerativo y cáncer.
15. La combinación para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la combinación incluye al menos 10^5 UFC del microbio EES.

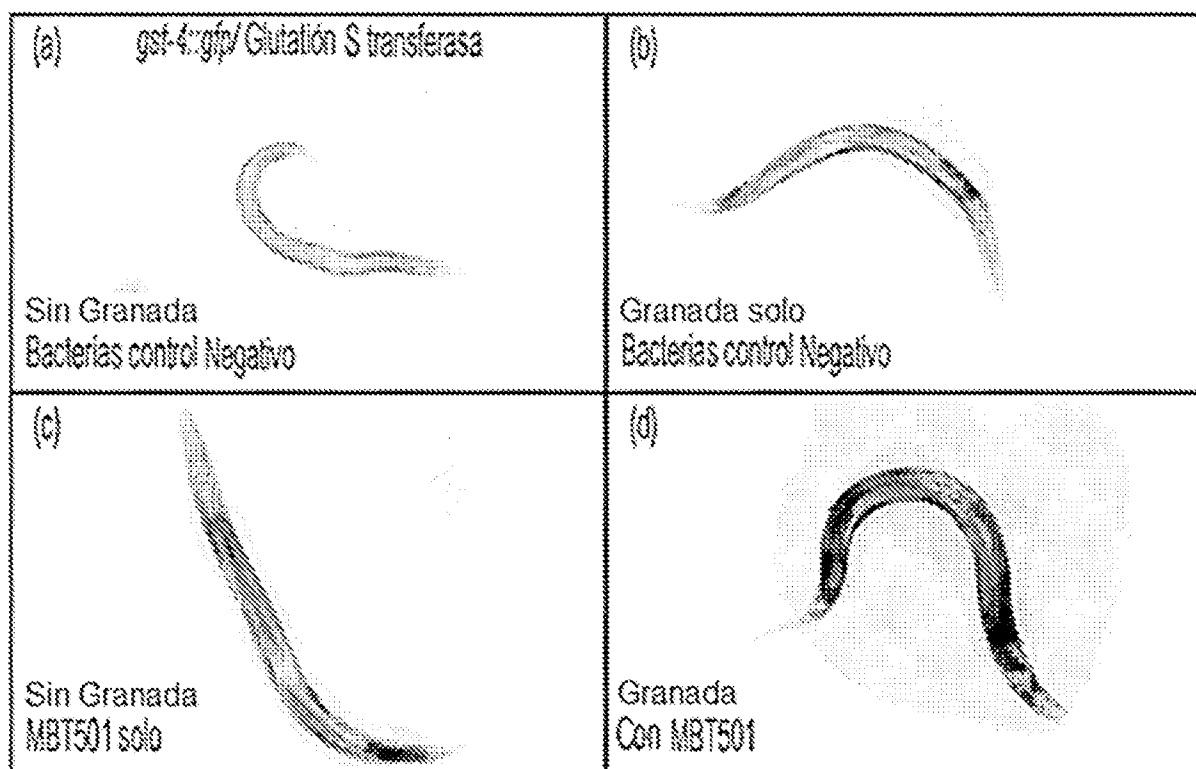
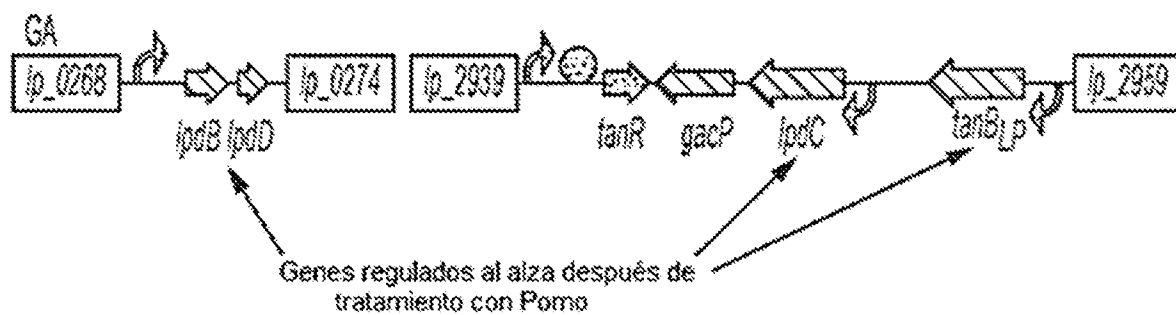


FIG. 1

(A)



(B)

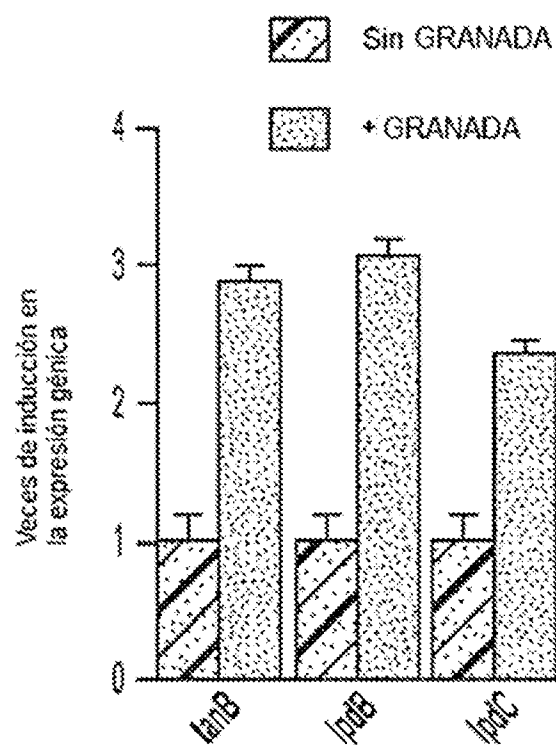


FIG. 2

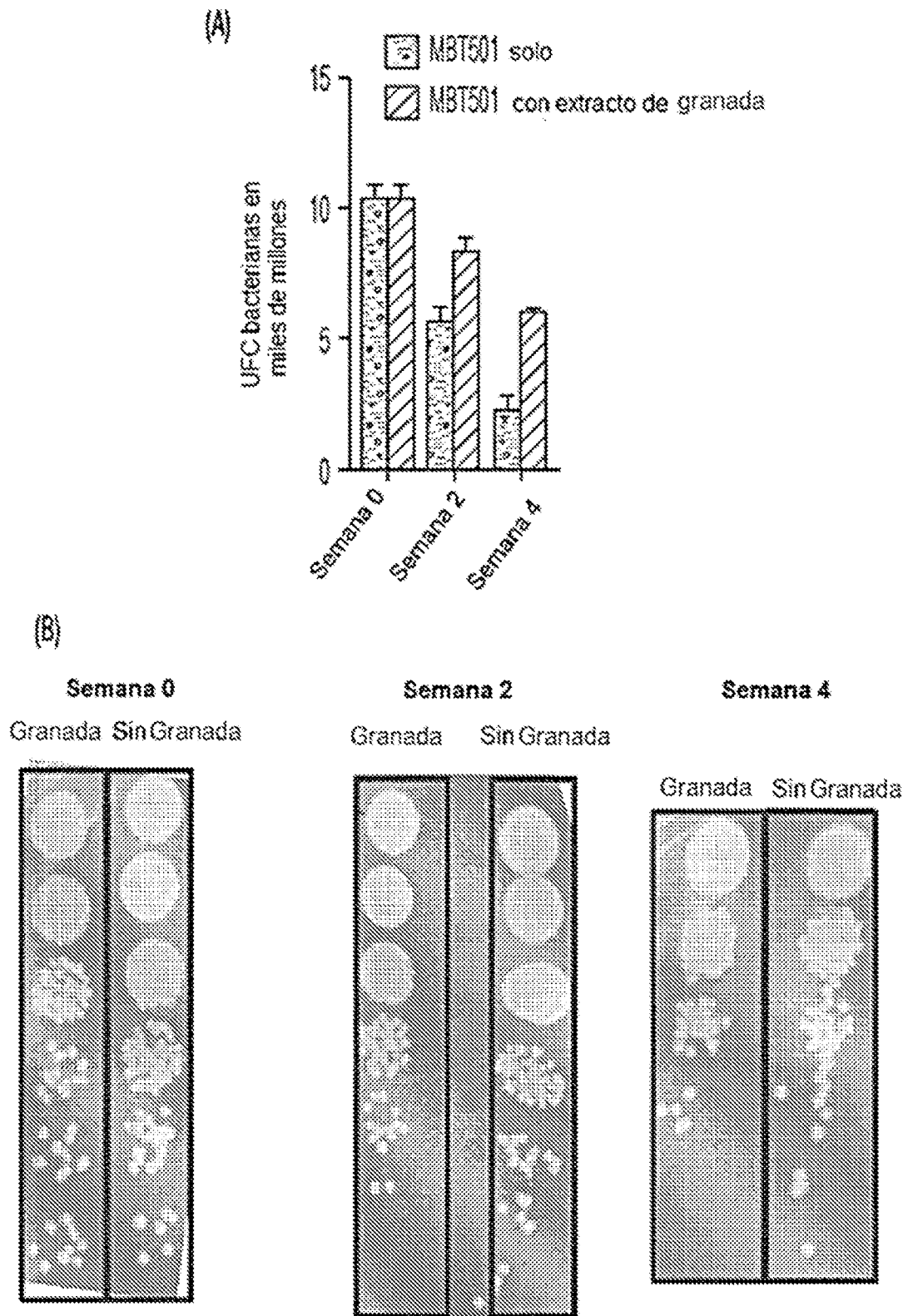


FIG. 3

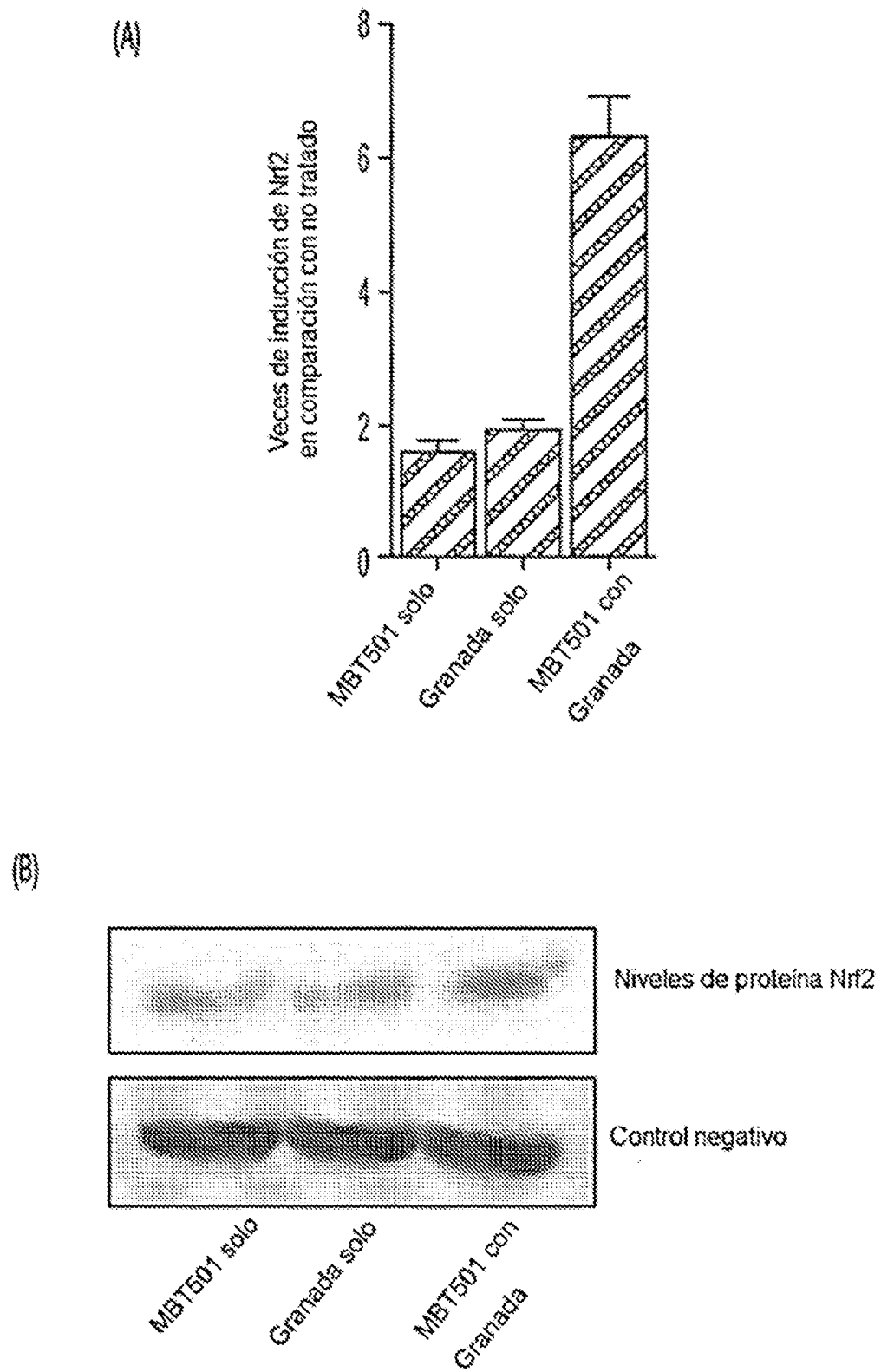


FIG. 4

Acumulación dependiente de la edad de agregados poliQ y mitigación por extracto de Granada+MET501

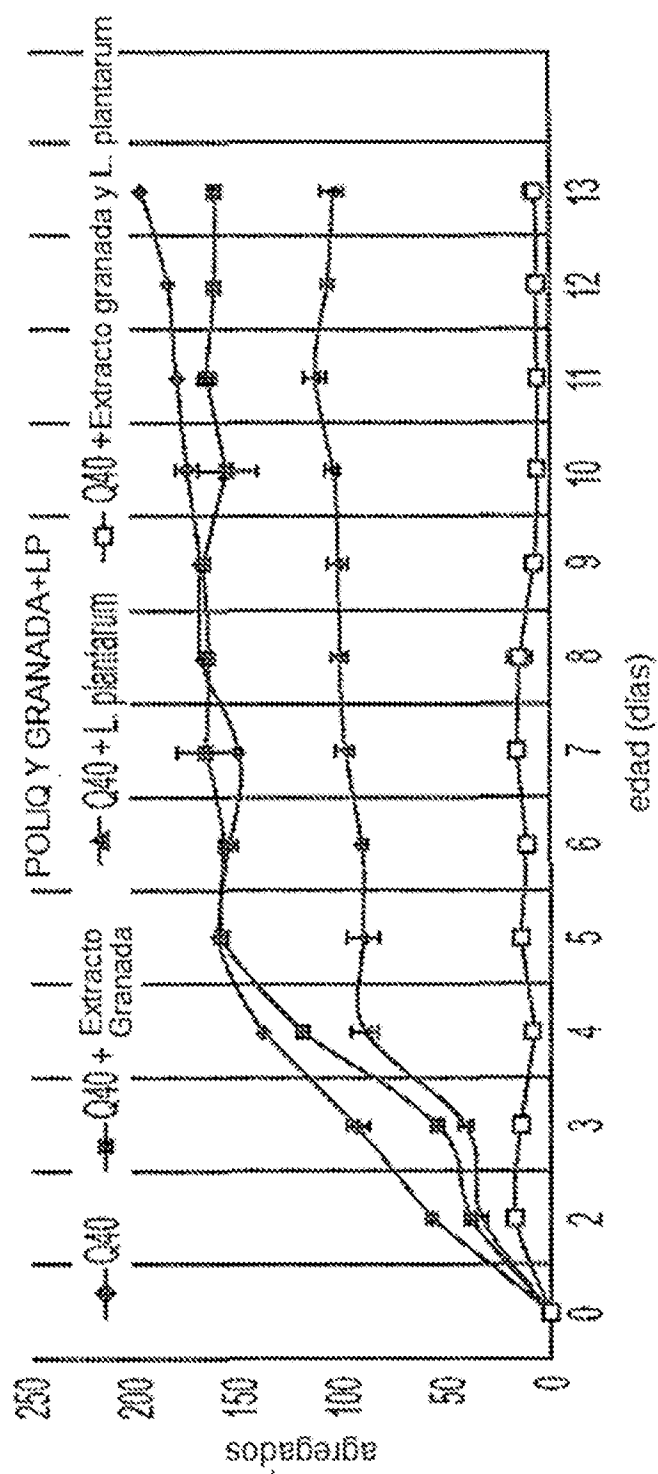


FIG. 5