

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 012 129**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 35/747</b>	(2015.01) <b>A23L 2/52</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/744</b>	(2015.01) <b>A23L 33/135</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/745</b>	(2015.01) <b>A61P 1/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/741</b>	(2015.01)	
<b>A61K 36/06</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/20</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/14</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/16</b>	(2006.01)	
<b>A61K 9/48</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2017** **PCT/IB2017/057980**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018** **WO18109730**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2017** **E 17829025 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024** **EP 3554522**

54 Título: **Probióticos para su uso en el tratamiento de la diverticulosis y la enfermedad diverticular**

30 Prioridad:

**16.12.2016 IT 201600127498**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.04.2025**

73 Titular/es:

**ALFASIGMA S.P.A. (100.00%)**  
**Via Ragazzi del '99, 5**  
**40133 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**BIFFI, ANDREA;**  
**IORE, WALTER y**  
**ROSSI, RUGGERO**

74 Agente/Representante:

**MENDIGUTÍA GÓMEZ, María Manuela**

ES 3 012 129 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

Probióticos para su uso en el tratamiento de la diverticulosis y la enfermedad diverticular

5 La presente invención se refiere al uso de probióticos para controlar el proceso inflamatorio del colon en sujetos con modificaciones estructurales de la pared del colon, preferiblemente en sujetos con diverticulosis, preferiblemente afectados por enfermedad diverticular.

### Estado de la técnica

10 La diverticulosis colónica es la alteración anatómica más frecuente del colon, a menudo detectada durante la colonoscopia. Se refiere a modificaciones estructurales de la pared del colon, que parecen caracterizarse por la presencia de bolsas denominadas divertículos.

15 Aunque la mayoría de las personas con diverticulosis colónica permanecen asintomáticas, alrededor del 20 % de los pacientes desarrollan síntomas. Esta afección se define como enfermedad diverticular.

20 Una situación en la que existen síntomas abdominales persistentes atribuidos a los divertículos en ausencia de colitis o diverticulitis macroscópicamente manifiestas se define como enfermedad diverticular sintomática no complicada. La diverticulitis, por el contrario, es una inflamación macroscópica aguda de los divertículos, que puede ser simple o complicada, según se observen o no en la tomografía computarizada características de complicaciones como abscesos, peritonitis, obstrucción, fístulas o hemorragias.

25 Los mecanismos patológicos que causan la formación de divertículos colónicos siguen sin estar claros. Estas formaciones son probablemente el resultado de complejas interacciones entre la dieta, la microbiota intestinal, factores genéticos, la motilidad del colon y la inflamación microscópica. Todos estos factores también deben considerarse como posibles dianas del tratamiento de la enfermedad diverticular. Entre ellos, la alteración de la microbiota intestinal podría tener un papel importante. Recientemente, en efecto, se han puesto a disposición diversas informaciones preliminares sobre el impacto de las modificaciones de la población microbiana en sujetos con enfermedad diverticular, que podrían ser la causa de un proceso de disbiosis tal que favoreciera el desarrollo de varios síntomas y que, al mismo tiempo, podría predisponerlos a un episodio de diverticulitis.

30 Así mismo, en los últimos años, numerosos hallazgos han sugerido un papel significativo de la inflamación en la determinación de los síntomas y en el desarrollo de complicaciones.

35 De hecho, se ha observado que la enfermedad diverticular presenta un importante infiltrado inflamatorio microscópico. Esta inflamación microscópica, que oscila entre una mayor infiltración linfocitaria crónica y un infiltrado neutrofílico activo, parece estar ligada a la gravedad de la enfermedad.

40 Además, la enfermedad diverticular muestra una mayor expresión de citocinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$ . La inflamación persistente, tanto endoscópica como histológica, se ha identificado recientemente como un factor de riesgo significativo para la recurrencia de la diverticulitis.

45 El documento WO2014068338 describe un preparado probiótico que comprende bacterias probióticas viables y metabólicamente activas en un sustrato líquido no lácteo, para su uso en el tratamiento de la diverticulitis y/o la enfermedad diverticular.

50 El documento US2009098088 describe métodos y kits para el tratamiento de la enfermedad diverticular, la diverticulitis y combinaciones de las mismas. Los métodos comprenden administrar a un mamífero que necesite tratamiento una composición que comprenda un probiótico, solo o en combinación con un antiinflamatorio o un antibiótico.

Tursi y col. J Clin Gastroenterol, 2006 investiga la eficacia y seguridad de la mesalazina, con o sin *Lactobacillus casei*, en la prevención de la recurrencia de la enfermedad diverticular sintomática del colon.

55 Tursi y col. Alimentary Pharmacologic and Therapeutics, 2013 investiga la eficacia de la mesalazina y/o los probióticos para mantener la remisión en el SUDD.

60 A la luz de lo anterior, existe una necesidad extremadamente sentida de identificar productos que permitan controlar el proceso inflamatorio a nivel del colon, en particular para prevenir/controlar/tratar la enfermedad diverticular y sus síntomas y prevenir las complicaciones de la misma.

65 El solicitante ha encontrado en el uso de probióticos basados en bacterias y/o levaduras y/u otros microorganismos una solución a las necesidades descritas anteriormente. En particular, la presente solución propone probióticos que comprenden bacterias para su uso en el tratamiento de y/o en la prevención de y/o en la reducción de los síntomas asociados a la enfermedad diverticular, en sujetos afectados por enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUDD+AD, por sus siglas en inglés) y en donde dichas bacterias son *Lactobacillus*

*paracasei* DG, CNCM I-1572. De hecho, tras la administración de los probióticos, como se describe más adelante en detalle, se observa una regulación a la baja de la expresión de la iNOS, de las citocinas proinflamatorias y de la liberación de NO en sujetos sanos y, sobre todo, en sujetos afectados por diversas formas de diverticulosis sometidos a estimulación/tratamiento con bacterias patógenas como la *E. coli* enteroinvasiva. Por lo tanto, la administración de probióticos según las reivindicaciones, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento y/o prevención de los síntomas asociados a la enfermedad diverticular, en sujetos afectados de enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUUD+AD).

#### Descripción de las figuras

La presente invención se describirá en detalle a continuación, también con ayuda de las siguientes figuras y con ejemplos que no pretenden tener ningún carácter limitativo.

En particular:

- La figura 1 muestra los niveles basales de expresión de iNOS y la liberación de NO y S100B en las muestras recogidas (Control, Diverticulosis, SUDD, SUDD+AD).
- La figura 2 muestra los niveles basales de la expresión de A) IL-1 $\beta$ , B) IL-6 y C) IL-10 en las muestras recogidas (Control, Diverticulosis, SUDD, SUDD+AD).
- La figura 3 muestra los niveles de expresión de iNOS antes y después de la estimulación bacteriana en las muestras examinadas (A-Control, B-Diverticulosis, C-SUDD, D-SUDD+AD).
- La figura 4 muestra los niveles de NO liberado antes y después de la estimulación bacteriana en las muestras examinadas (A-Control, B-Diverticulosis, C-SUDD, D-SUDD+AD).
- La figura 5 muestra los niveles de liberación de la proteína S100B antes y después de la estimulación bacteriana en las muestras examinadas (A-Control, B-Diverticulosis, C-SUDD, D-SUDD+AD).

#### Descripción detallada

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a probióticos que comprenden bacterias para su uso en el tratamiento de y/o en la prevención de y/o en la reducción de los síntomas asociados a la enfermedad diverticular, en sujetos afectados por enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUDD+AD) y en donde dichas bacterias son *Lactobacillus paracasei* DG, CNCM I-1572. La enfermedad diverticular es la enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUDD+AD). La diverticulosis, asociada a la enfermedad diverticular sintomática o asintomática, a la que en general hace referencia la presente invención, está asociada a una sobreexpresión de NO y/o iNOS y/o al menos una citocina proinflamatoria, preferiblemente seleccionada entre TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6b, IL-10 y combinaciones de los mismos. A efectos de la presente invención, los probióticos pueden tomarse como coadyuvantes de cualquier terapia destinada a tratar o prevenir la diverticulosis en las formas descritas anteriormente, es decir, la toma de probióticos, preferiblemente de forma regular tal y como se describe con mayor detalle a continuación, demuestra favorecer un resultado positivo de los tratamientos actualmente disponibles destinados a tratar y/o prevenir esta patología en sus diferentes formas. Por lo tanto, el uso de probióticos destinados a tratar y/o prevenir y/o mejorar los síntomas asociados a la enfermedad diverticular, en sujetos afectados de enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUUD+AD), puede asociarse o combinarse con otras estrategias terapéuticas, preferiblemente de tipo farmacológico o socio-conductual, por ejemplo un estilo de vida o una dieta saludables.

En este contexto, la definición de “probiótico” es la formulada por un grupo de expertos convocado conjuntamente en 2001 por la FAO y la OMS: “Microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador”. En particular, en Italia, el Ministerio de Sanidad ha definido los probióticos como “microorganismos que demuestran ser capaces, una vez ingeridos en cantidades suficientes, de ejercer funciones beneficiosas para el organismo”, haciéndose eco sustancialmente de la definición de las dos organizaciones antes mencionadas.

Los probióticos a los que se refiere la presente invención se basan en bacterias y, opcionalmente, levaduras y/u otros microorganismos.

Se describen también las bacterias del género *Lactobacillus* que pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus*

*kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus sanfranciscensis*.

5 A efectos de la presente invención, el probiótico es la cepa bacteriana *L. casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM I1572) que fue depositada por SOFAR S.p.A. en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur de París el 05/05/1995, con el número de depósito CNCM I-1572.

10 Se describen también las bacterias del género *Bifidobacterium* que pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum* y *B. tsurumense*.

15 Se describen asimismo las bacterias del género *Bacillus* pertenecientes al menos a una de las siguientes especies: *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolitus* y *Bacillus marinus*.

20 Se describen asimismo las bacterias del género *Propionibacterium* pertenecientes al menos a una de las siguientes especies: *P. shermanii*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulorum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* y *P. thoenii*.

25 Se describen asimismo las bacterias del género *Streptococcus* pertenecientes al menos a una de las siguientes especies: *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus zooepidemicus*.

35 Se describen asimismo las bacterias del género *Lactococcus* pertenecientes al menos a una de las siguientes especies: *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* y *L. taiwanensis*.

40 Se describen asimismo las bacterias del género *Aerococcus* pertenecientes al menos a una de las siguientes especies: *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaeequi* y *A. urinaehominis*. Se describen asimismo las bacterias del género *Enterococcus* pertenecientes al menos a una de las siguientes especies: *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus malodoratus*, *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus raffinosus* y *Enterococcus solitarius*.

45 Se describen asimismo las levaduras pertenecientes preferiblemente al género *Saccharomyces*, más preferiblemente a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y/o *Saccharomyces boulardii*.

50 La presente invención se refiere a probióticos que comprenden bacterias para su uso en el tratamiento de y/o en la prevención de y/o en la reducción de los síntomas asociados a la enfermedad diverticular, en sujetos afectados por enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUDD+AD) y en donde dichas bacterias son *Lactobacillus paracasei* DG, CNCM I-1572.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende los probióticos reivindicados.

55 Los microorganismos de la composición están preferiblemente vivos, por lo que la composición también puede definirse como probiótica. Como alternativa, los microorganismos que pueden utilizarse están muertos o tinalizados.

En realizaciones adicionales, los microorganismos están en forma de lisado o extracto y, por tanto, la composición también puede definirse como paraprobiótico, o como un componente único, o varios componentes del mismo, presentes a nivel de la pared bacteriana.

60 En otras realizaciones adicionales de la invención, la composición comprende además los bioproductos metabólicos generados por microorganismos, definidos como postbióticos, y/o cualquier otro producto de derivación bacteriana. Por lo tanto, la composición de la presente invención es también un probiótico o un paraprobiótico o un postbiótico, conocido o presunto, o un componente de la pared bacteriana.

65

En general, los microorganismos incluidos en la composición de la presente invención son microorganismos individuales o combinaciones de cualquier especie microbiana incluida en la lista QPS de la EFSA.

5 Preferiblemente, las bacterias incluidas en la composición son capaces de sobrevivir al tránsito gastrointestinal y, por tanto, de llegar vivas al colon.

10 Los microorganismos de la presente invención se administran preferiblemente en una cantidad que oscila entre 1000 y 100 000 millones, más preferiblemente entre 10 000 y 75 000 millones, aún más preferiblemente entre 15 000 y 50 000 millones, más preferiblemente entre 20 000 y 30 000 millones de células, preferiblemente células bacterianas, por administración.

Según un aspecto preferido, la administración de microorganismos, preferiblemente de bacterias, tiene lugar al menos 1-2 veces al día.

15 En la presente invención se contemplan todas las vías de administración. Preferiblemente, la administración de la composición y/o probióticos es oral, más preferiblemente en forma de píldoras, cápsulas, comprimidos, polvo granulado, cápsulas duras, gránulos de disolución oral, sobres, pastillas para chupar o viales bebibles.

20 Como alternativa, la composición y/o los probióticos se formulan en forma líquida, por ejemplo, como jarabe o bebida, o bien se añaden a los alimentos, por ejemplo, a un yogur, queso o zumo de frutas. Como alternativa, la composición de la invención y/o los probióticos se formulan en una forma capaz de ejercer una acción tópica, por ejemplo, como enema.

25 La formulación oral de la composición y/o probióticos, comprende además excipientes generalmente aceptados para la producción de productos probióticos y/o farmacéuticos.

Según un aspecto preferido de la invención, la composición comprende además antiaglomerantes, preferiblemente dióxido de silicio o estearato de magnesio.

30 Según un aspecto preferido de la invención, la composición comprende además agentes de recubrimiento, preferiblemente gelatina.

35 En realizaciones adicionales de la invención, la composición de la invención comprende vitaminas, oligoelementos, preferiblemente zinc o selenio, enzimas y/o sustancias prebióticas, preferiblemente fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), inulina, goma guar o combinaciones de los mismos.

### Ejemplo

40 El estudio experimental en el que se basa la presente invención se basa en muestras de biopsia aisladas de 40 pacientes. De este modo, se estratificaron los sujetos:



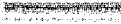
- 10 pacientes con diverticulosis asintomática, 3 de ellos mujeres; edad: 59-77);
- 45 – 10 pacientes con enfermedad diverticular asintomática no complicada (SUDD), 3 de ellos mujeres; edad: 44-92);
- 10 pacientes con enfermedad diverticular asintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda, 2 de ellos mujeres; edad: 31-77);
- 50 – 10 pacientes sin problemas gastrointestinales, 6 de ellos mujeres; edad: 33-75).

Se obtuvieron seis muestras de biopsia del colon sigmoide de cada paciente; en los pacientes con divertículos, las biopsias se aislaron en su proximidad.

55 Se obtuvo el consentimiento informado de todos los pacientes y la aprobación del comité de ética de la Universidad de Nápoles Federico II. Las biopsias polarizadas se colocaron en una rejilla metálica esterilizada con la cara mucosa hacia abajo y la cara serosa hacia arriba. A continuación, la rejilla metálica se colocó en el centro de una placa de cultivo de órganos durante 24 horas y se mantuvo en DMEM-F12 a 37 °C, en presencia de un 95 % de oxígeno y un 5 % de CO<sub>2</sub>. A continuación, las biopsias se estimularon con las bacterias patógenas y/o probióticas a nivel de la cara serosa, como se indica en la tabla I.

Tabla I

	0h	2.5 h	24h
BASAL (solo medio)			
EIEC	+EIEC		
EIEC + LCDG	+ EIEC	+ LCDG	
LCDG + EIEC	+LCDG	+ EIEC	
EIEC y LCDG	+EIEC y LCDG		

 = MEDIO DE CULTIVO  
 = EIEC  
 = LCDG

Las bacterias patógenas utilizadas en los experimentos fueron: *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC); los probióticos probados fueron *Lactobacillus casei* DG® (*Lactobacillus paracasei* CNCM 11572; LCDG). El primero se eligió por sus efectos nocivos en el tubo digestivo, el segundo por su efecto probiótico.

Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y las biopsias se trataron con tampón RIPA. Ambos se congelaron a -80 °C.

La extracción de proteínas se controló mediante transferencia de Western, como se describe en Turco, F. y col. 2015. Los anticuerpos utilizados fueron: de conejo anti-iNOS (1:500 vol/vol) o de ratón anti- $\alpha$  actina (1:1000 vol/vol).

El óxido nítrico (NO) se midió utilizando la misma técnica ya descrita en Turco, F. y col. 2015.

En el caso del ensayo ELISA (enzimoinmunoanálisis de absorción) que se utilizó para medir S100B, el protocolo seguido fue el descrito en el manual del fabricante.

Los análisis estadísticos incluyeron el análisis de la varianza y la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Los datos presentados son la media  $\pm$  DE de los experimentos. El nivel de significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

Niveles basales de expresión de iNOS y liberación de NO, S100B y citocinas

Se midieron los niveles basales de expresión y liberación de mediadores de la inflamación en el tubo digestivo.

Los pacientes con diverticulosis mostraron un mayor nivel de expresión de iNOS que los sujetos sanos (figura 1A).

Los pacientes con enfermedad diverticular sintomática no complicada (SUDD) y enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUDD+AD) mostraron mayores diferencias en la expresión de iNOS en comparación con los sujetos sanos (+2,04 y +2,86 veces en comparación con el control, figura 1A).

Los pacientes con diverticulosis asintomática y aquellos con SUDD mostraron una liberación de NO ligeramente superior a la de los sujetos sanos (figura 1B). Los pacientes con SUDD+AD mostraron una diferencia más marcada (+7,77 veces en comparación con el control, figura 1B).

Los datos mostrados en la figura 1C indican que no hubo diferencias significativas en la expresión de la proteína S100B (previamente asociada con la liberación de NO).

Además, se demostró un aumento de la liberación de la citocina IL-1 $\beta$ , sobre todo en los pacientes con SUDD+AD en comparación con los sujetos sanos (figura 2A). También se observó el mismo patrón para la citocina IL-6 (figura 2B). En cuanto a la IL-10, se observó un aumento del nivel de liberación en particular en los pacientes SUDD+AD (figura 2C).

Efectos de la estimulación bacteriana sobre la expresión de la iNOS.

Posteriormente se comprobó el efecto de dichos valores tras la estimulación bacteriana sobre la expresión del mediador de la inflamación, tanto en sujetos sanos como en los que padecían los distintos tipos de diverticulosis.

En particular, se evaluó la expresión de iNOS en biopsias de mucosa.

En los sujetos sanos (control), la estimulación con EIEC produjo un aumento de la expresión de iNOS (+2,11 en comparación con la basal, figura 3A). La adición de LCDG antes o después de EIEC no alteró la expresión de iNOS, mientras que cuando se añadió LCDG junto con EIEC, se observó una reducción significativa de la expresión de iNOS (-1,50 veces en comparación con la estimulación con EIEC sola, figura 3A).

También en los pacientes con diverticulosis, la presencia de EIEC aumentó la expresión de iNOS (+2,86 veces en comparación con la basal, figura 3B). En este caso, la adición de LCDG produjo una reducción del nivel de expresión de iNOS en comparación con la estimulación con EIEC sola, independientemente del momento en que se añadiera la bacteria a EIEC (figura 3B).

En los pacientes con SUDD y SUDD+AD, la estimulación con EIEC provocó un aumento de la expresión de iNOS (+2,14 en comparación con la basal, figura 3C). En este caso, la acción de LCDG fue más eficaz si se administraba con EIEC (figura 3C). La estimulación con LCDG no produjo en ningún caso un aumento del nivel de expresión de iNOS.

Efectos de la estimulación bacteriana sobre la liberación de NO.

En las muestras de sujetos sanos, la liberación de NO aumentó significativamente tras la estimulación con EIEC (figura 4A). La adición de LCDG antes, después o junto con EIEC alteró significativamente el valor basal de NO.

El mismo efecto se observó en los pacientes con diverticulosis asintomática y SUDD. De hecho, la administración de EIEC aumentó la liberación de NO y la presencia de LCDG anuló este efecto (figuras 4B y 4C) independientemente del momento en que se añadiera LCDG.

Los pacientes SUDD+AD mostraron un nivel basal de liberación de NO muy elevado, por lo que la introducción de EIEC no produjo un aumento significativo en estos sujetos. La adición de LCDG tampoco produjo ningún cambio en los niveles de liberación de NO debido a que el nivel basal era muy elevado (figura 4D).

En los controles, la estimulación con EIEC provocó un aumento de la liberación de S100B (aproximadamente +2,7 veces en comparación con la basal,  $p < 0,05$ , figura 5A). La estimulación simultánea con LCDG y EIEC provocó una reducción del aumento de S100B tras la administración de EIEC (-2,90 veces en comparación con EIEC,  $p < 0,05$ , figura 5A).

Los resultados expuestos anteriormente demuestran que la activación del sistema de inflamación dependiente del NO (y correlacionada con la expresión de iNOS) conduce a una liberación de NO que aumenta progresivamente pasando de sujetos con diverticulosis a SUDD+AD. La expresión de iNOS sigue la misma tendencia. En particular, en la diverticulosis (aumento de 1,5 frente al control), en la SUDD (aumento de 2 frente al control) y en la SUDD+AD (aumento de 3 frente al control). Además, también se demostró que la administración de LCDG previene los efectos observados. En particular, la LCDG es capaz de contrarrestar los efectos de las bacterias patógenas, sobre todo en sujetos con SUDD+AD.

Estos datos demuestran claramente que LCDG puede utilizarse eficazmente como probiótico para la prevención y/o el tratamiento, en sujetos con diverticulosis, en particular enfermedad diverticular SUDD y SUDD+AD, y/o síntomas asociados a la misma.

## REIVINDICACIONES

1. Probióticos que comprenden bacterias para su uso en el tratamiento de y/o en la prevención de y/o en la reducción de los síntomas asociados a la enfermedad diverticular, en sujetos afectados por enfermedad diverticular sintomática no complicada precedida de diverticulitis aguda (SUDD+AD) y en donde dichas bacterias son *Lactobacillus paracasei* DG, CNCM 1-1572.
2. Probióticos que comprenden bacterias para su uso según la reivindicación 1, en donde la diverticulosis está asociada a una sobreexpresión de NO y/o iNOS y/o al menos una citocina proinflamatoria, preferiblemente seleccionada entre TNF $\alpha$ , IL1  $\beta$ , IL-6b, IL-10 y combinaciones de los mismos.
3. Probióticos que comprenden bacterias para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde *Lactobacillus paracasei* DG, CNCM 1-1572 se combina con otras bacterias seleccionadas de: *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*.
4. Probióticos que comprenden bacterias para su uso según la reivindicación 3, en donde las bacterias del género *Lactobacillus* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus chspatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranoferiens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus sanfranciscensis*, preferiblemente la especie bacteriana *Lactobacillus paracasei*.
5. Probióticos que comprenden bacterias para su uso según la reivindicación 3, en donde las bacterias del género *Bifidobacterium* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*, *B. angulatum*, *B. asteroides*, *B. boum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. denticolens*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. inopinatum*, *B. lactis*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum* y *B. tsurumense*.
6. Probióticos que comprenden bacterias para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde *Lactobacillus paracasei* DG, CNCM 1-1572 se combina con otras bacterias seleccionadas del género *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus* y en donde:
  - 1) las bacterias del género *Bacillus* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus insolitus* y *Bacillus marinus*; y/o
  - 2) las bacterias del género *Propionibacterium* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *P. shermanii*, *P. acnes*, *P. australiense*, *P. avidum*, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. granulosum*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, *P. propionicum* y *P. thoenii*; y/o
  - 3) las bacterias del género *Streptococcus* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus canis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus iniae*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus orisratti*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus tigurinus*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus suis*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus viridans* y *Streptococcus zooepidemicus*; y/o
  - 4) las bacterias del género *Lactococcus* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. garvieae*, *L. lactis*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. taiwanensis*; y/o
  - 5) las bacterias del género *Aerococcus* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *A. urinae*, *A. sanguinicola*, *A. christensenii*, *A. suis*, *A. urinaeequi* y *A. urinaehominis*; y/o
  - 6) las bacterias del género *Enterococcus* pertenecen al menos a una de las siguientes especies: *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*,



*Enterococcus haemoperoxidus, Enterococcus hirae, Enterococcus malodoratus, Enterococcus moraviensis, Enterococcus mundtii, Enterococcus pseudoavium, Enterococcus raffinosus y Enterococcus solitarius.*

- 5        **7.**        Probióticos que comprenden bacterias para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las bacterias están vivas y/o muertas y/o tinalizadas y/o como lisados y/o extractos.
- 10       **8.**        Probióticos que comprenden bacterias para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las bacterias se administran en una cantidad que oscila entre 1000 y 100 000 millones, preferiblemente entre 10 000 y 75 000 millones, más preferiblemente entre 15 000 y 50 000 millones, aún más preferiblemente entre 20 000 y 30 000 millones de células por dosis, preferiblemente dicha dosis se suministra 1-2 veces al día.
- 15       **9.**        Probióticos que comprenden bacterias para su uso según la reivindicación 8, en donde dicha dosis de bacterias es para administración oral, preferiblemente como píldoras, cápsulas, comprimidos, polvo granular, cápsulas duras, gránulos de disolución oral, sobres, pastillas para chupar o viales bebibles.
- 20       **10.**       Probióticos que comprenden bacterias para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde las bacterias, se formulan como un líquido, preferiblemente como un jarabe o como una bebida, o se añaden a los alimentos, preferiblemente a un yogur, queso o zumo de frutas; o dichos probióticos, preferiblemente basados en bacterias, están formulados para actuar por vía tópica, preferiblemente en forma de enema.

Fig. 1

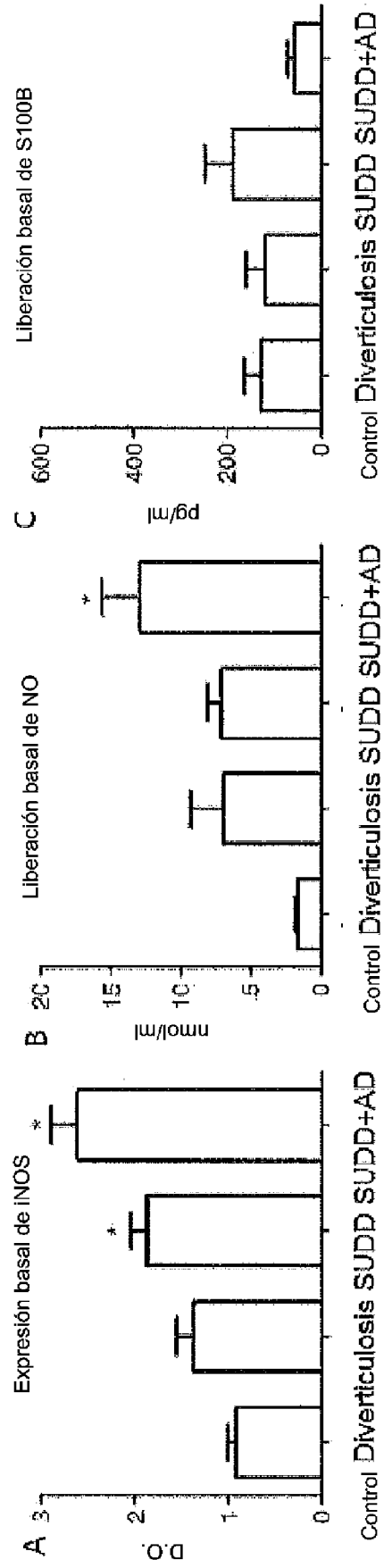


Fig. 2

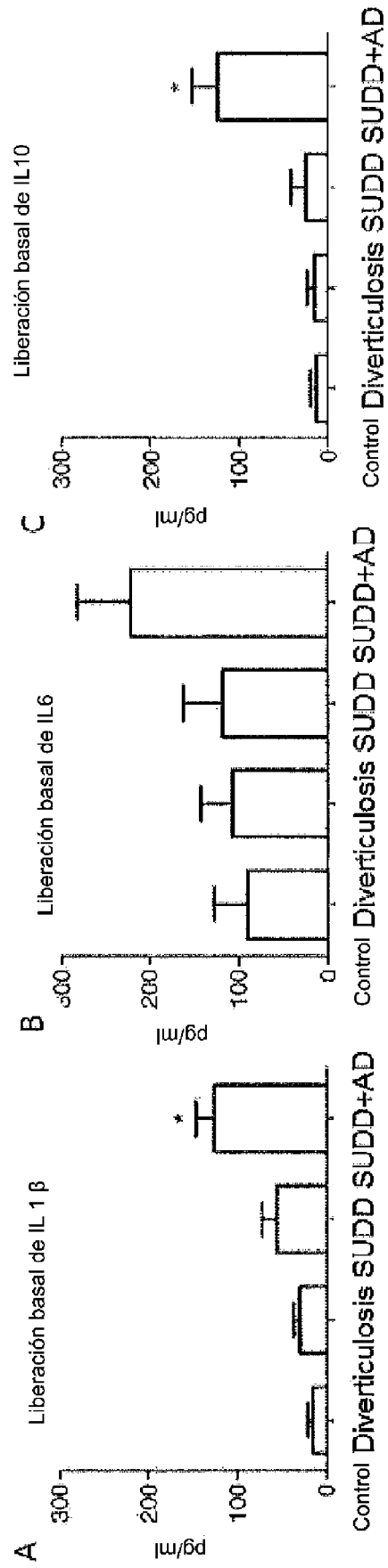


Fig. 3

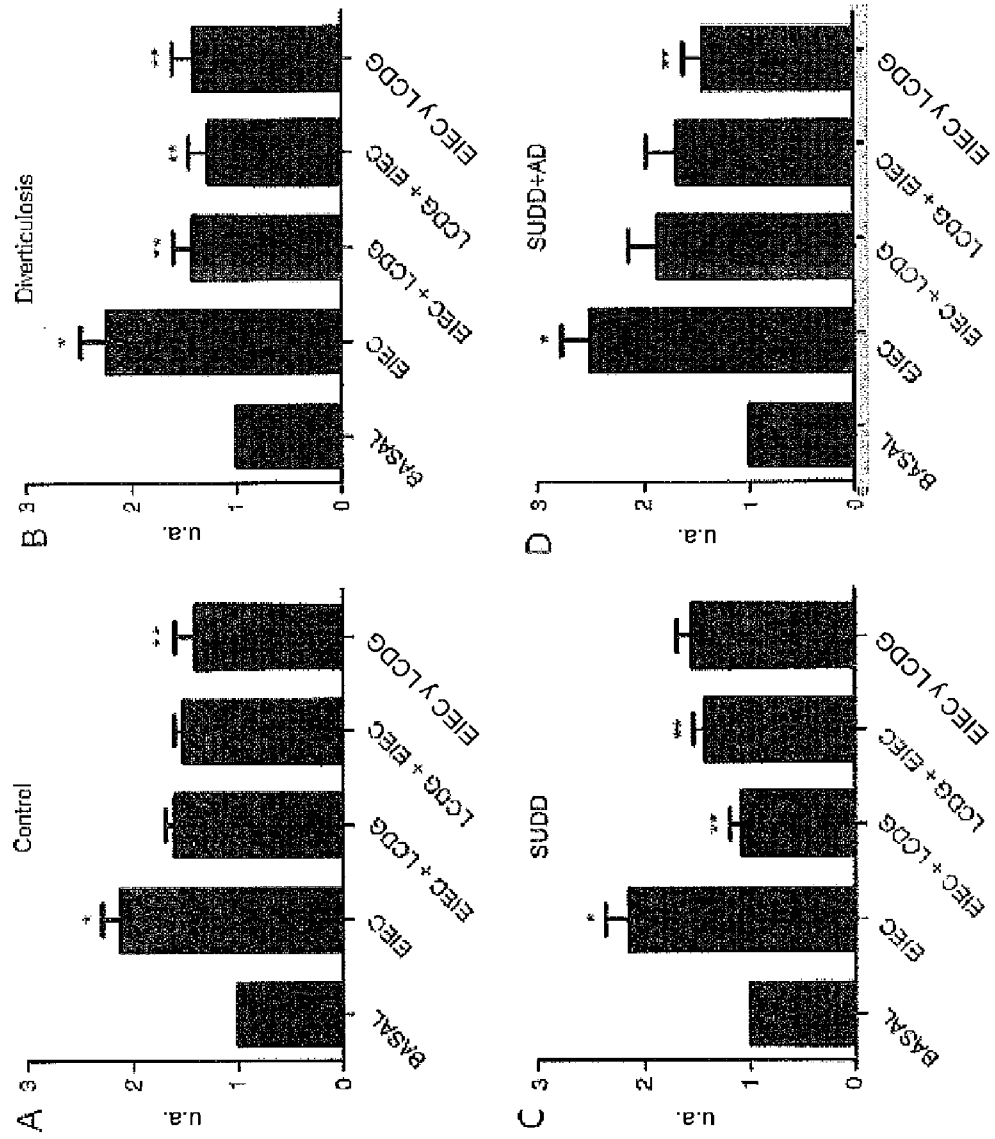


Fig. 4

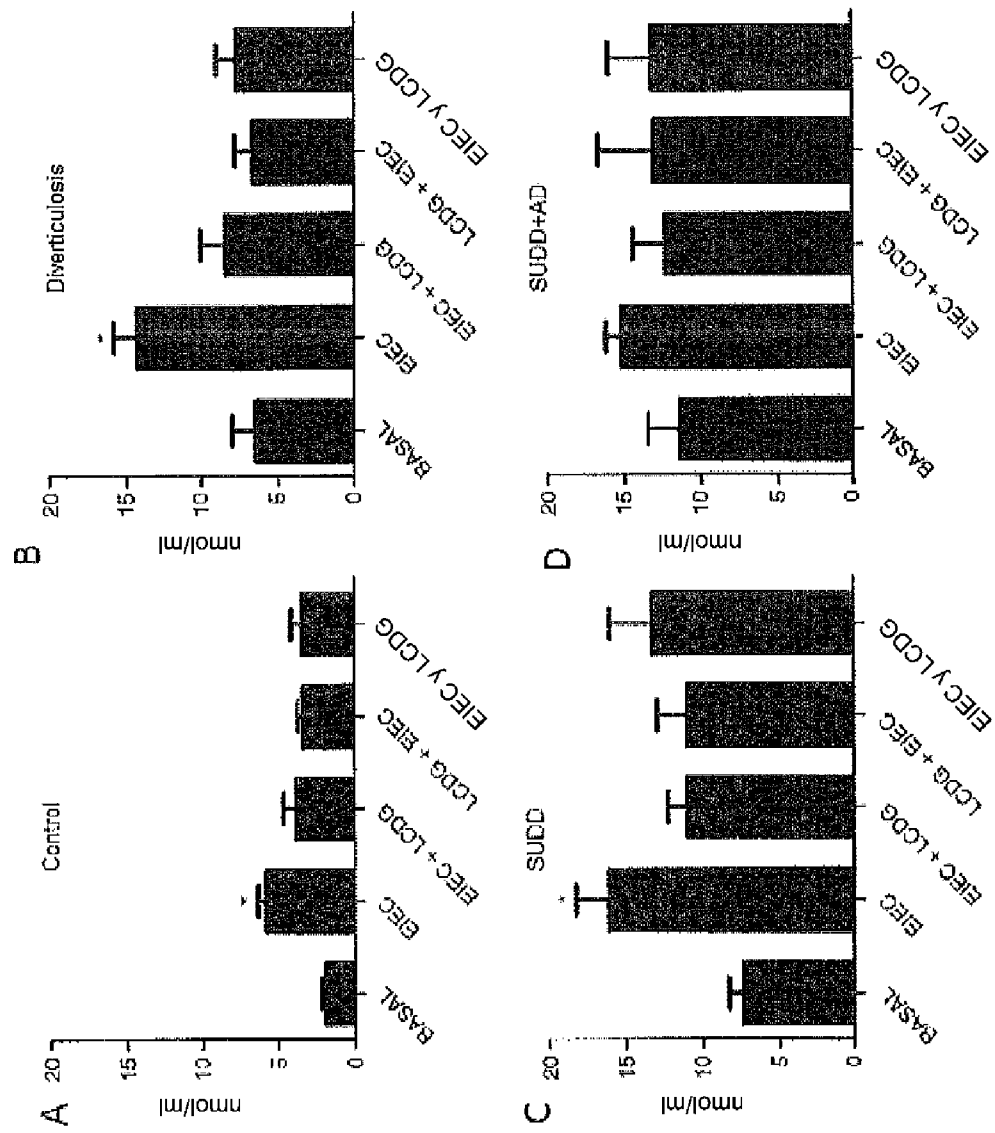


Fig. 5

