

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 410**

51 Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23L 33/135 (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2017 PCT/IB2017/000766**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2018 WO18215809**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2017 E 17737636 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3630128**

54 Título: **Composiciones y métodos para disminuir una población de *Bilophila wadsworthia* o inhibir su crecimiento**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2024

73 Titular/es:

COMPAGNIE GERVAIS DANONE (50.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR y
INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE POUR
L'AGRICULTURE, L'ALIMENTATION ET
L'ENVIRONNEMENT (50.0%)

72 Inventor/es:

SOKOL, HARRY;
LANGELLA, PHILIPPE;
NATIVIDAD, JANE;
VEIGA, PATRICK y
VAN HYLCKAMA VLIEG, JOHAN

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 983 410 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 y métodos para disminuir una población de *Bilophila wadsworthia* o inhibir su crecimiento

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a composiciones para su uso en el tratamiento del dismetabolismo de los ácidos biliares.

10 Estado de la técnica anterior

15 Durante las últimas tres décadas, la prevalencia de la obesidad así como las complicaciones metabólicas asociadas, tal como la diabetes tipo 2 y las enfermedades del hígado graso no asociadas, han aumentado significativamente. El aumento de la epidemia se ha relacionado con cambios en las formas de estilo de vida, específicamente, el mayor consumo de una "dieta de estilo occidental", rica en grasas saturadas y azúcar.

Sin embargo, en la intersección entre la dieta y la salud metabólica, un gran número de investigaciones también relacionan la microbiota intestinal en la regulación de estas enfermedades.

20 En este sentido, la observación de que los ratones libres de gérmenes están protegidos de la obesidad inducida por una dieta de alto contenido de grasas saturadas (HFD, por sus siglas en inglés) así como un mejor control glucémico y fenotipo hepático en comparación con sus homólogos colonizados destaca el papel de la microbiota intestinal en la regulación del impacto de dieta sobre el estado metabólico del organismo. La importancia de estos hallazgos iniciales está respaldada por estudios epidemiológicos que muestran que la
25 obesidad está asociada con alteraciones de la microbiota intestinal y que el fenotipo de la microbiota obesa humana se puede transferir a ratones trasplantando la microbiota obesa a ratones libres de gérmenes.

30 Además, se ha demostrado que diferentes dietas alteran de forma rápida y reproducible tanto la composición como la función de la microbiota. Ciertos grupos o cepas de bacterias se han asociado con diferentes tipos de dietas. Por ejemplo, *Bilophila wadsworthia* se ha asociado con dietas de origen animal, así como con dietas ricas en grasas.

35 Por lo tanto, las alteraciones de la microbiota intestinal parecen ser una característica distintiva de la alteración metabólica y, aunque las relaciones causales que subyacen a este proceso son complejas y no se comprenden completamente, se ha intentado reprogramar la composición y función de la microbiota, con el fin de mejorar la salud de los individuos.

40 En este sentido, Odamaki et al. (2016) Beneficial Microbes 7:473-484 señalan que la ingesta de yogur suplementado con *Bifidobacterium longum* desempeña un papel en el mantenimiento de una composición normal de la microbiota, en particular evitando un aumento de la población intestinal de *Bilophila wadsworthia*, en individuos sometidos a una dieta a base de carne (es decir, dieta de origen animal). Sin embargo, estos autores no demuestran que el control de la población de *Bilophila wadsworthia* por
45 *Bifidobacterium longum* esté asociado con beneficios para la salud de los individuos. Además, siempre existe la necesidad de agentes alternativos para controlar las poblaciones bacterianas.

Ni et al. (2017) Journal of Applied Microbiology 122:3, 770-784 señalan que la abundancia intestinal de *B. wadsworthia* disminuyó en un grupo de individuos tratados con *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Cheng-Chih et al. (2014) The Scientific World Journal, 1-10 señala que *L. rhamnosus* mostró actividad hidrolasa de sales biliares *in vitro*.

50 El documento de Patente US 2010/028449 A1 describe lactobacilos que tienen actividad hidrolasa de sal biliar.

El documento de Patente US 2015/297646 A1 divulga *L. rhamnosus* CNCM I-3690 para su uso en el tratamiento de trastornos metabólicos.

55 Características de la invención

La presente invención se base en el inesperado descubrimiento de que la bacteria *Lactobacillus* tiene la capacidad de disminuir o inhibir *Bilophila wadsworthia in vivo*, lo que conduce a una mejora de las alteraciones metabólicas asociadas y las disfunciones del organismo que incluyen, entre otros, los ácidos biliares.

60 La invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 6.

La presente invención se refiere a una composición que comprende, o está acondicionada por, al menos una bacteria *Lactobacillus* para su uso en la reducción de ácidos biliares en un individuo.

65

Descripción detallada de la invención

- 5 Como se define en el presente documento, "al menos una bacteria *Lactobacillus* o una composición que comprende la misma" se entenderá como una composición que comprende al menos una bacteria *Lactobacillus*.
- 10 Como se define en el presente documento, una composición "condicionada de este modo" significa que la composición comprende secreciones de bacterias del ácido láctico según la presente invención. A modo de ejemplo, la composición acondicionada por bacterias lácticas según la invención puede comprender el sobrenadante de un cultivo de bacterias lácticas o puede ser un producto lácteo fermentado por bacterias lácticas del que se han eliminado las bacterias lácticas.
- 15 Como se utiliza en el presente documento, el término "sobrenadante" se entenderá como el medio de cultivo en el que se han cultivado bacterias en condiciones adecuadas para el crecimiento. Los medios de cultivo pueden separarse de las células bacterianas y de sus fragmentos mediante centrifugación.
- 20 Como se utiliza en el presente documento, el término "composición estable" se entenderá como una composición que no presenta sedimentación y/o separación del suero.
- Como se utiliza en el presente documento, el término "x % (p/p)" equivale a "x g por 100 g".
- 25 Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término "cucharable" significa un sólido o semisólido que puede consumirse por medio de una cuchara u otro utensilio.
- Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término "fermentación" significa el metabolismo de una sustancia por bacterias, levaduras u otros microorganismos.
- 30 Como se utiliza en el presente documento, el término "ufc" o "UFC" se considerará una abreviatura del término "unidad formadora de colonias".
- Como se utiliza en el presente documento, se entenderá que el término "sobrepeso" significa un IMC (índice de masa corporal) de 25-30.
- 35 Como se utiliza en este documento, se entenderá que el término "obeso" significa un IMC (índice de masa corporal) superior a 30.
- 40 Como se utiliza en el presente documento, el término "CNCM I-" seguido de un número de 4 dígitos se entenderá que se refiere a una cepa depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) en 25 rue du Docteur Roux, París, Francia, en virtud del Tratado de Budapest con un número de acceso correspondiente a dicho número de 4 dígitos, p.e. CNCM I-3690.
- 45 Como se utiliza en el presente documento, se considerará que la referencia a una cepa o especie bacteriana incluye bacterias funcionalmente equivalentes derivadas de la misma, tales como, entre otras, mutantes, variantes o bacterias genéticamente transformadas. Estos mutantes o cepas transformadas genéticamente pueden ser cepas en las que uno o más genes endógenos de la cepa original han sido mutados, por ejemplo para modificar algunas de sus propiedades metabólicas (por ejemplo, su capacidad para fermentar azúcares, su resistencia a la acidez, su supervivencia al transporte en el tracto gastrointestinal, sus propiedades post-acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa original para añadir uno o más genes de interés, por ejemplo para dar a dichas cepas genéticamente transformadas características fisiológicas adicionales, o para permitirles expresar proteínas de interés terapéutico o profiláctico que se desee administrar a través de dichas cepas. Estos mutantes o cepas transformadas genéticamente pueden obtenerse a partir de la cepa original mediante técnicas convencionales de mutagénesis aleatoria o dirigida al sitio y transformación genética de bacterias, o mediante la técnica conocida como "genome shuffling". En el presente documento, las cepas, mutantes y variantes derivadas de una especie o cepa original se considerarán abarcadas por referencia a dicha especie o cepa original, p.e. se considerará que las frases "*L. rhamnosus*" y "cepa CNCM I-3690" incluyen cepas, mutantes y variantes derivadas de las mismas.
- 50
- 55
- 60 Por consiguiente, como se utiliza en el presente documento, la referencia a una cepa bacteriana especificada por un número de acceso o depósito se considerará que abarca variantes de la misma que tienen al menos un 80 % de identidad con la secuencia de ARNr 16S de dicha cepa especificada, preferentemente al menos un 85 % de identidad, más preferentemente al menos un 90 % de identidad, más preferentemente al menos un 95 % de identidad (ver: Stackebrandt & Goebel, 1994, Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849). En una realización particularmente preferente, dicha variante tiene al menos un 97 % de identidad con la secuencia de ARNr 16S de dicha cepa especificada, más preferentemente al menos un 98 % de identidad, más preferentemente al menos un 99 % de identidad.
- 65

Las bacterias del ácido láctico comprendidas en la composición según la presente invención pueden ser bacterias vivas o muertas. Preferentemente, al menos algunas de las bacterias del ácido láctico comprendidas en la composición según la presente invención son bacterias vivas. Más preferentemente, la composición según la presente invención comprende de 10^5 a 10^{10} unidades formadoras de colonias de bacterias de ácido láctico por gramo de composición (UFC/g), más preferentemente al menos 10^7 , 10^8 , 10^9 unidades formadoras de colonias de bacterias de ácido láctico por gramo de composición (UFC/g).

La composición según la presente invención es preferentemente una composición alimenticia o nutricional, es decir, un producto alimenticio, más preferentemente un producto lácteo, y lo más preferentemente un producto lácteo fermentado, en particular fermentado por las bacterias del ácido láctico según la presente invención.

Como se define en el presente documento, un producto lácteo fermentado es el producto de la fermentación de una composición a base de leche mediante un cultivo iniciador de microorganismos fermentadores, en particular bacterias, más particularmente bacterias del ácido láctico. El producto lácteo fermentado según la presente invención puede ser, de este modo, una leche fermentada, un yogur, en particular un yogur cuajado, batido o bebible, o un queso fresco tal como un queso blanco o un petit-Suisse. También puede ser un producto lácteo fermentado colado, como un yogur colado, también llamado yogur concentrado o yogur estilo griego.

A los términos "leche fermentada" y "yogur" o "yogurt" se les da su significado habitual en el ámbito de la industria láctea, es decir, productos destinados al consumo humano y procedentes de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo. Estos productos pueden contener ingredientes secundarios como frutas, verduras, azúcar, etc.

La expresión "leche fermentada" se utiliza en la presente solicitud para referirse a un producto lácteo elaborado con un sustrato lácteo que ha sido sometido a un tratamiento al menos equivalente a la pasteurización, sembrado con microorganismos pertenecientes a la especie o especies características de cada producto.

El término "yogur" o "yoghurt" se utiliza para la leche fermentada obtenida, según el uso local, por el desarrollo de bacterias lácticas termófilas específicas conocidas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que deben estar vivos en el producto terminado, en una proporción mínima. En determinados países, las normativas exigen la adición de otras bacterias lácticas a la producción de yogur y, especialmente, el uso adicional de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus casei*. Estas cepas lácticas adicionales están destinadas a aportar diversas propiedades al producto terminado, como favorecer el equilibrio de la flora intestinal o modular el sistema inmunológico.

Por tanto, en la práctica, la expresión "leche fermentada" se utiliza generalmente para designar las leches fermentadas distintas de los yogures. También puede conocerse, según el país, con nombres tan diversos como, por ejemplo, "Kefir", "Kumtss", "Lassi", "Dahi", "Leben", "Filmjolk", "Villi", "Acidophilus milk".

El término "queso blanco" o "petit-Suisse", en la presente solicitud, se utiliza para queso no refinado y no salado, que ha experimentado una fermentación únicamente por bacterias del ácido láctico (y ninguna fermentación distinta de la fermentación láctica).

El producto lácteo fermentado puede prepararse a partir de leche entera y/o leche total o parcialmente desnatada, que puede usarse en forma de polvo que puede reconstituirse mediante la adición de agua. Se pueden añadir otros componentes de la leche tales como nata, caseína, caseinato (por ejemplo caseinato de calcio o sodio), proteínas del suero, en particular en forma de concentrado (WPC, por sus siglas en inglés), proteínas de la leche, en particular en forma de concentrado (MPC, por sus siglas en inglés), hidrolizados de proteínas de leche y mezclas de los mismos.

Como se define en el presente documento, una "bacteria de ácido láctico" es una bacteria Gram-positiva, tolerante a los ácidos, generalmente no esporulante y no respiratoria, ya sea con forma de bastón o de coco, que es capaz de fermentar azúcares en ácido láctico.

Como se define en el presente documento "aumentar o mantener" una población bacteriana, en particular una población intestinal de la misma, significa proteger, favorecer o estimular el crecimiento de dichas bacterias de manera que el recuento de dichas bacterias, o el número relativo de dichas bacterias con respecto a otras bacterias, se mantiene o aumenta.

Como se define en el presente documento, "disminuir" una población bacteriana, en particular una población intestinal de la misma, significa reducir el crecimiento de dichas bacterias de modo que disminuya el recuento

de dichas bacterias, o el número relativo de dichas bacterias con respecto a otras bacterias.

5 Como se define en el presente documento, "inhibir" una población bacteriana, en particular una población intestinal de la misma, significa prevenir el crecimiento de dichas bacterias de modo que no aumente el recuento de dichas bacterias, o el número relativo de dichas bacterias con respecto a otras bacterias.

Como se define en el presente documento, una población intestinal de *Bilophila wadsworthia* se refiere a la bacteria *Bilophila wadsworthia* presente en el intestino, en particular el colon, de un individuo.

10 La determinación de la cantidad de bacterias *Bilophila wadsworthia* en una muestra se puede realizar mediante numerosos métodos bien conocidos por los expertos en la materia. La determinación de la cantidad intestinal de bacterias *Bilophila wadsworthia* en un individuo se puede realizar cultivando muestras de heces del individuo.

15 Preferentemente, el individuo según la presente invención es un individuo humano. En una realización, el individuo según la presente invención es un individuo sano o un individuo que no padece enfermedades intestinales o enfermedades del tacto gastrointestinal.

20 Como se define en el presente documento, "no terapéutico" significa que el individuo que recibe o consume la composición según la invención no recibe tratamiento de una enfermedad mediante la composición. En otras palabras, dentro del marco de los usos y métodos no terapéuticos según la presente invención, la composición según la presente invención no es ni un medicamento ni una composición farmacéutica. La invención aquí descrita pertenece al menos a una bacteria *Lactobacillus* para usos tal como se describen a continuación, y en realizaciones adicionales a las composiciones y productos. La bacteria del ácido láctico es
25 *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690. La cepa *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 ha sido depositada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) (Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, París, Francia) en virtud del Tratado de Budapest el 9 de noviembre de 2006, con el número I-3690.

30 Composiciones

La presente invención también se refiere a una composición que comprende, o está acondicionada por, al menos una bacteria *Lactobacillus* para su uso en la reducción de ácidos biliares.

35 La composición para uso según realizaciones de la presente invención es adecuada para consumo o ingestión, preferentemente por medios orales. Por consiguiente, la composición comprende o consiste en materia comestible. Se prefiere particularmente que las composiciones de las realizaciones de la invención estén sustancialmente libres de materia patógena o toxicogénica. La composición según realizaciones de la presente invención puede ser un medicamento o una composición farmacéutica. En una realización particularmente preferente, la composición según la presente invención puede ser una composición no
40 terapéutica, preferentemente una composición nutracéutica, una composición nutricional y/o una composición alimentaria.

45 En una realización, dichos ácidos biliares son ácidos biliares séricos o cecales. Se prefiere particularmente que dichos ácidos biliares estén tauroconjugados; en otra realización preferente, dichos ácidos biliares se seleccionan del grupo que consiste en ácido taurocólico (TCA, por sus siglas en inglés) y AUDC.

En una realización, dicho dismetabolismo de los ácidos biliares es un trastorno asociado o causado por la *Bilophila wadsworthia* intestinal.

50 Preferentemente, la composición comprende al menos 10^6 , más preferentemente al menos 10^7 y lo más preferentemente al menos 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *L. rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según a realizaciones de la presente invención. Preferentemente también la composición según realizaciones de la presente invención comprende al menos aproximadamente 10^{11} , más preferentemente al menos 10^{10} y
55 lo más preferentemente al menos 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención. En otra realización, la bacteria del ácido láctico es *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

60 En realizaciones, la composición comprende de 10^6 a 10^{11} unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias de ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención. En realizaciones, la composición comprende de 10^7 a 10^{11} unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de
65 composición según realizaciones de la invención. En realizaciones, la composición comprende de 10^8 a 10^{11} unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*,

según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención. En realizaciones, la composición comprende de 10^9 a 10^{11} unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la invención. En realizaciones, la composición comprende de 10^{10} a 10^{11} unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención.

En realizaciones, la composición comprende de 10^6 a 10^{10} unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención. En realizaciones, la composición comprende de 10^6 a 10^9 unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias de ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención. En realizaciones, la composición comprende de 10^6 a 10^8 unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención. En realizaciones, la composición comprende de 10^6 a 10^7 unidad formadora de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención. Se prefiere particularmente que la bacteria del ácido láctico sea *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

Preferentemente, la composición adecuada para los usos y métodos de las realizaciones de la presente invención comprende leche, más preferentemente leche fermentada. Preferentemente, la composición comprende al menos aproximadamente un 30 % (p/p) de leche, más preferentemente al menos aproximadamente un 50 % (p/p) de leche e incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 70 % (p/p) de leche. En realizaciones, la composición comprende del 30 % al 100 % (p/p) de leche. En realizaciones, la composición comprende del 50 % al 100 % (p/p) de leche. En realizaciones, la composición comprende del 70 % al 100 % (p/p) de leche. Preferentemente dicha leche es leche vegetal y/o animal, más preferentemente leche de soja, almendra, avena, cáñamo, espelta, coco, arroz, cabra, oveja, camello, yegua o vaca, y lo más preferentemente leche de vaca. Preferentemente, dicha leche o leches se tratan térmicamente, normalmente pasteurizadas, para garantizar la esterilidad. Preferentemente, dicho tratamiento térmico se lleva a cabo antes de la preparación de la composición de leche fermentada.

Preferentemente dicha leche comprende una o más de leche desnatada, parcialmente desnatada o no desnatada. Preferentemente dicha leche o leches pueden estar en forma líquida, en polvo y/o concentrada. En una realización, dicha leche comprende además componentes de la leche seleccionados preferentemente del grupo que consiste en crema, caseína, caseinato (por ejemplo caseinato de calcio o sodio), proteínas del suero, en particular en forma de un concentrado (WPC), proteínas de la leche, en particular en forma de un concentrado (MPC), hidrolizados de proteínas de leche y mezclas de los mismos. En una realización, dicha mezcla comprende además jugos de plantas y/o frutas. En una realización, dicha leche o leches pueden enriquecerse o fortificarse con otros componentes de la leche u otros nutrientes tales como, entre otros, vitaminas, minerales, oligoelementos u otros micronutrientes.

Preferentemente, la composición comprende más de aproximadamente 0,3 g por 100 g en peso de ácido láctico libre, más preferentemente más de aproximadamente 0,7 g o 0,6 g por 100 g en peso de ácido láctico libre. En realizaciones, la composición comprende de 0,3 g a 0,7 gramos por 100 g en peso de ácido láctico libre.

Preferentemente, la composición comprende un contenido de proteína al menos equivalente al de la leche o leches de las que se deriva, preferentemente al menos aproximadamente 2,5 %, más preferentemente al menos aproximadamente 3 % o 3,5 % (p/p). Preferentemente, la composición tiene un pH igual o inferior a 5, preferentemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4,5 y más preferentemente entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5.

Preferentemente, la composición tiene una viscosidad inferior a 200 mPa.s, más preferentemente inferior a 100 mPa.s y lo más preferentemente inferior a 60 mPa.s, a 10°C , a una velocidad de cizalla de 64 s^{-1} . En realizaciones, la composición tiene un rango de viscosidad de 1 a 200 mPa.s, de 1 a 100 mPa.s o de 1 a 60 mPa.s, a 10°C , a una velocidad de cizalla de 64 s^{-1} . En realizaciones, la composición tiene un rango de viscosidad de 10 a 200 mPa.s, de 10 a 100 mPa.s o de 10 a 60 mPa.s, a 10°C , a una velocidad de cizalla de 64 s^{-1} . En realizaciones, la composición tiene un rango de viscosidad de 30 a 200 mPa.s, de 30 a 100 mPa.s o de 30 a 60 mPa.s, a 10°C , a una velocidad de cizalla de 64 s^{-1} .

La composición según las realizaciones de la presente invención es preferentemente un producto seleccionado del grupo que comprende yogur, yogur cuajado, yogur batido, yogur vertible, bebida de yogur, yogur helado, kéfir, suero de leche, requesón, crema agria, queso fresco y queso. En una realización, la composición según las realizaciones de la invención es una composición bebible, más preferentemente una

bebida de leche fermentada tal como, entre otras, una bebida de yogur, kéfir, etc. En una realización alternativa, la composición según las realizaciones de la invención es una composición que se puede tomar con cuchara, tal como un yogur cuajado o batido o equivalente del mismo.

5 Preferentemente, la composición, según realizaciones de la invención, se puede almacenar, transportar y/o distribuir a una temperatura de 1°C a 10°C durante al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos aproximadamente 90 días desde el envasado y seguir siendo aptos para el consumo.

10 Preferentemente, la composición es un producto envasado que comprende al menos 10⁶, más preferentemente al menos 10⁷ y lo más preferentemente al menos 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias de ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la invención posterior al almacenamiento, transporte y/o distribución a una temperatura de 1°C a 10°C durante al menos
15 aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos aproximadamente 90 días desde el envasado. Se prefiere particularmente que la bacteria del ácido láctico sea *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

20 En realizaciones, la composición es un producto envasado que comprende de 10⁶ a 10⁸ o de 10⁶ a 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias del ácido láctico, preferentemente *Lactobacillus rhamnosus*, según realizaciones de la presente invención por gramo (g) de composición según realizaciones de la presente invención posterior al almacenamiento, transporte y/o distribución a una temperatura de 1°C a 10°C durante al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos
25 aproximadamente 90 días desde el envasado. Se prefiere particularmente que la bacteria del ácido láctico sea *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690.

Según otra realización, la composición comprende además una preparación intermedia que comprende una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos tales como saborizantes y/o colorantes. Dicha preparación intermedia puede contener en particular espesantes (fibras solubles e insolubles, alginatos, carragenos,
30 goma xantana, pectina, almidón, en particular gelatinizado, goma gelano, celulosa y sus derivados, goma guar y algarroba, inulina) o edulcorantes (aspartamo, acesulfamo, K, sacarina, sucralosa, ciclamato) o conservantes. Ejemplos de aromas son: manzana, naranja, fresa, kiwi, aroma de cacao, etc. Ejemplos de colorantes son: betacaroteno, carmín, rojo cochinita. Además, la preparación de las frutas antes mencionadas puede comprender frutas enteras o en trozos, en gelatina o en mermelada, lo que permite, por
35 ejemplo, obtener yogures de frutas.

Preferentemente, la composición según realizaciones de la presente invención comprende hasta aproximadamente el 30 % (p/p) de dicha preparación intermedia, p.e. hasta aproximadamente 10%, 15%,
40 20%, 25% (p/p). En una realización, la composición según las realizaciones de la presente invención comprende del 1% al 30% (p/p) de dicha preparación intermedia. En realizaciones alternativas, la composición según realizaciones de la presente invención comprende del 1 % al 25 % (p/p) de dicha preparación intermedia. En otras realizaciones alternativas, la composición según realizaciones de la presente invención comprende del 1% al 20% (p/p) de dicha preparación intermedia. En otras realizaciones, la composición según realizaciones de la invención comprende del 1% al 15% (p/p) de dicha preparación
45 intermedia. En otras realizaciones, la composición según realizaciones de la presente invención comprende del 1% al 10% (p/p) de dicha preparación intermedia.

Preferentemente, la composición, según realizaciones de la presente invención, se proporciona en un recipiente sellado o sellable que contiene aproximadamente 50 g, 60 g, 70 g, 75 g, 80 g, 85 g, 90 g, 95 g, 100
50 g, 105 g, 110 g, 115 g, 120 g, 125 g, 130 g, 135 g, 140 g, 145 g, 150 g, 200 g, 300 g, 320 g o 500 g o aproximadamente 1 oz, 2 oz, 3 oz, 4 oz, 5 oz, 6 oz o 12 oz de producto en peso.

En realizaciones, la composición, según realizaciones de la presente invención, se proporciona en un recipiente sellado o sellable que contiene aproximadamente de 50 g a 500 g, de 60 g a 500 g, de 70 g a 500
55 g, de 75 g a 500 g, de 80 g a 500 g, de 85 g a 500 g, de 90 g a 500 g, de 95 g a 500 g, de 100 g a 500 g, de 105 g a 500 g, de 110 g a 500 g, de 115 g a 500 g, de 120 g a 500 g, de 125 g a 500 g, de 130 g a 500 g, de 135 g a 500 g, de 140 g a 500 g, de 145 g a 500 g, de 150 g a 500 g, de 200 g a 500 g, de 300 g a 500 g, de 320 g a 500 g o 500 g de producto en peso. En realizaciones, la composición, según realizaciones de la presente invención, se proporciona en un recipiente sellado o sellable que contiene aproximadamente 1 oz a
60 12 oz, 2 oz a 12 oz, 3 oz a 12 oz, 4 oz a 12 oz, 5 oz a 12 oz, 6 oz a 12 oz o 12 oz de producto en peso.

Métodos para la preparación de productos lácteos fermentados.

Los métodos para la preparación de productos lácteos fermentados, tales como yogures o equivalentes de
65 los mismos, son bien conocidos en el estado de la técnica y se describen únicamente con fines ilustrativos.

Preferentemente, los productos lácteos fermentados se preparan utilizando leche que ha sido sometida a un tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización. Preferentemente, dicho tratamiento térmico se lleva a cabo antes de la preparación de la composición.

5 Normalmente, la leche se pasteuriza mediante las siguientes etapas sucesivas:

- 1) estandarización de las sustancias grasas de la materia prima para obtener una sustancia estandarizada,
- 10 2) enriquecimiento con materia seca de la sustancia estandarizada obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia enriquecida.
- 3) precalentamiento de la sustancia enriquecida obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia de partida,
- 4) pasteurización y mantenimiento de la sustancia de partida obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia pasteurizada y mantenida,
- 15 5) una etapa opcional de homogeneización de la sustancia pasteurizada y mantenida obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia pasteurizada, mantenida y opcionalmente homogeneizada,
- 6) enfriamiento inicial de la sustancia pasteurizada, mantenida y opcionalmente homogeneizada obtenida en la etapa anterior, para obtener una sustancia de partida pasteurizada que ha sido mantenida, opcionalmente homogeneizada y enfriada.

20 Como se utiliza en el presente documento, se entiende por "estandarización de las sustancias grasas" una etapa para llevar la cantidad de grasas presentes en la sustancia de partida a un nivel predeterminado. El enriquecimiento con materia seca implica la adición de proteínas y sustancias grasas para modificar la firmeza de la cuajada.

25 En el sentido aquí utilizado, se entiende por "mantenimiento" un calentamiento rápido de la leche y que permite destruir la flora microbiana vegetativa, incluidas las formas patógenas. Su duración es generalmente de 4 a 10 minutos, en particular de 5 a 8 minutos, y en particular aproximadamente de 6 minutos.

30 Como se utiliza en el presente documento, se entiende por "homogeneización" la dispersión de las sustancias grasas en la sustancia de tipo leche en pequeños glóbulos de grasa. La homogeneización se lleva a cabo por ejemplo a una presión de 100 a 280 bares, en particular de 100 a 250 bares, en particular de 100 a 200 bares, en particular aproximadamente 200 bares. Esta etapa de homogeneización es totalmente opcional. En particular, está ausente del proceso de producción de productos con 0% de sustancias grasas.

35 Normalmente, un producto lácteo fermentado se prepara mediante cultivo de leches a una temperatura adecuada con microorganismos adecuados para proporcionar una reducción del pH, preferentemente a un pH igual o inferior a 5, preferentemente entre aproximadamente 3 y 4,5; más preferentemente entre aproximadamente 3,5 y aproximadamente 4,5. El pH se puede ajustar controlando la fermentación por parte del microorganismo y deteniéndola cuando sea apropiado, por ejemplo mediante enfriamiento.

40 La selección de cepas de bacterias de ácido láctico adecuadas está dentro del alcance del experto en la materia y normalmente son bacterias de ácido láctico termófilas. Ejemplos de bacterias de ácido láctico que pueden usarse incluyen, entre otros, *Lactobacillus* (por ejemplo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus delbrueckei*, en particular *L. delbrueckei* subsp. *bulgaricus* o *lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*); *Streptococci* (por ejemplo *Streptococcus thermophilus*); *Lactococci* (por ejemplo *Lactococcus lactis*, normalmente *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Normalmente se puede utilizar una mezcla o asociación de una pluralidad de especies de bacterias del ácido láctico, normalmente una mezcla o asociación de *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Para la preparación de yogur, esto incluye normalmente *Lactobacillus bulgaricus* (también denominado *Lactobacillus delbrueckei* subsp. *bulgaricus*) y *Streptococcus thermophilus*, opcionalmente con microorganismos adicionales tales como, entre otros, especies probióticas u otras especies que pueden proporcionar cualidades organolépticas u otras cualidades deseables a la composición, p.e. *Lactococcus lactis*.

55 Las temperaturas adecuadas para la fermentación de la leche son normalmente de aproximadamente 36°C a aproximadamente 44°C y la temperatura se mantiene durante un tiempo de incubación suficiente para proporcionar la reducción deseada del pH.

60 Para la preparación de un producto lácteo fermentado, la temperatura al inicio de la fermentación es normalmente de aproximadamente 36°C a aproximadamente 43°C, en particular de aproximadamente 37°C a aproximadamente 40°C, la temperatura al final de la fermentación es normalmente de aproximadamente 37°C a aproximadamente 44 °C, en particular aproximadamente 38 °C a aproximadamente 41 °C. El tiempo de fermentación suele ser de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas.

65 Después de la fermentación la leche fermentada se enfría. Opcionalmente, se puede realizar una etapa de

enfriamiento intermedio de la leche fermentada para proporcionar una leche fermentada preenfriada que tenga una temperatura de entre aproximadamente 22°C y aproximadamente 4°C. Normalmente, el tiempo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, en particular de aproximadamente 1 hora 30 minutos a aproximadamente 2 horas. La leche fermentada preenfriada normalmente se almacena hasta 40 horas o menos.

Preferentemente, se realiza una etapa de enfriamiento final de la leche fermentada de manera que la temperatura al inicio del enfriamiento final sea inferior a aproximadamente 22°C y la temperatura al final del enfriamiento final sea de aproximadamente 4°C a aproximadamente 10°C. El producto enfriado puede entonces almacenarse, transportarse y/o distribuirse a una temperatura de aproximadamente 1°C a aproximadamente 10°C durante al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 60 días o al menos aproximadamente 90 días.

Según otra realización, el proceso para la preparación de un producto lácteo fermentado como se define anteriormente comprende opcionalmente una etapa de agitación a una presión de al menos 20 bares, o realizar un alisado dinámico, para obtener una composición que tiene la viscosidad deseada, normalmente una viscosidad de hasta 20 mPa.s. Las operaciones de agitación o alisado dinámico proporcionan cierto cizallamiento a la composición que normalmente permite una reducción de la viscosidad. Tales operaciones son conocidas por el experto en la materia y pueden realizarse con el equipo convencional adecuado. Esta etapa se realiza normalmente a temperatura fría, por ejemplo a una temperatura de 1 °C a 20 °C. Sin perjuicio, se cree que aplicar algo de cizallamiento a temperatura fría, normalmente agitando a alta presión o realizando un alisado dinámico, puede conducir a la formación de un gel fluido dentro de la composición, que proporciona una estabilidad mejorada incluso a una baja viscosidad de hasta 20 mPa.s.

Según otra realización, el proceso para la preparación de un producto lácteo fermentado como se define anteriormente comprende opcionalmente una etapa de adición de una preparación intermedia antes o después de la fermentación, comprendiendo dicha preparación intermedia una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos tales como saborizantes y/o colorantes.

La invención se ilustrará mejor mediante las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

Descripción de las figuras

Figuras 1-12. *B. wadsworthia* hace sinergia con la HFD para desencadenar un deterioro metabólico más fuerte.

Figura 1: Cambio de multiplicación de *B. wadsworthia* en relación con el día 0 en ratones alimentados con una dieta de control (CD, por sus siglas en inglés) o una dieta con alto contenido de grasas (HFD, por sus siglas en inglés) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+) (n=16-28/grupo).

Figura 2: Carga de *B. wadsworthia* en el contenido fecal y cecal del intestino delgado (SI, por sus siglas en inglés) después de 9 semanas de CD o HFD.

Figura 3: Aumento de peso corporal (n=37-40/grupo) en ratones alimentados con dieta control (CD, por sus siglas en inglés) o dieta con alto contenido de grasas (HFD, por sus siglas en inglés) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I- 3690 (Lr+).

Figura 4: Glucosa en sangre en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 5: Insulina en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 6: Evaluación del modelo homeostático-resistencia a la insulina (HOMA-IR, por sus siglas en inglés) después de 6 h de ayuno en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 7: Nivel de glucosa en sangre antes y después de la exposición a la tolerancia oral a la glucosa (OGGT; 2 g/kg de ratón; n = 27-40/grupo) en ratones alimentados con dieta de control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 8: Área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de OGGT en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 9: Área lipídica, calculada como % de área de interés (AOI, por sus siglas en inglés), en secciones transversales de hígado teñidas con H&E en ratones alimentados con dieta de control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratado con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 10: Imágenes representativas de hígado teñido con H&E en ratones alimentados con dieta de control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 11: Triglicéridos hepáticos después de 6 h de privación de alimento en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 12: Correlación de Spearman de glucosa en ayunas y carga de *B. wadsworthia* en el contenido cecal. La comparación estadística se realizó probando primero la normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y a continuación ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis con Bonferroni o la prueba post hoc de Dunn en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figuras 13-17. *B. wadsworthia* aumenta el dismetabolismo de los ácidos biliares inducido por la HFD.

Figura 13: Relación entre ácidos biliares primarios y secundarios en el ciego de ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 14: Barra apilada que muestra la concentración de ácidos biliares en el ciego de ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 15: Concentración de ácidos biliares diferentes en el ciego (* $p < 0,05$ vs HFD-ASF, + $p < 0,05$ vs HFD-ASF^{Bw+}; n=5-6/grupo) en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 16: Barra apilada que muestra la concentración de ácidos biliares en el suero de ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 17: Concentración de ácidos biliares diferentes en el suero (* $p < 0,05$, ** $p < 0,05$; n=5-6/grupo). La comparación estadística se realizó probando primero la normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y a continuación ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis con Bonferroni o la prueba post hoc de Dunn en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figuras 18-25 *B. wadsworthia* potencia la disfunción e inflamación de la barrera intestinal inducida por la HFD.

Figura 18: CD14 soluble (sCD14) en el suero en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 19: Concentración de FITC-dextrano en plasma 3 h después de la alimentación forzada en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 20: Concentración de lipocalina en las heces de ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 21: Producción de citoquinas de células de ganglios linfáticos mesentéricos después de 48 h de estimulación con PMA-ionomicina en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 22: Citoquinas procedentes de homogenados ileales en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

Figura 23: Citoquinas procedentes de homogenados yeyunales en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

5

Figura 24: Citoquinas procedentes de homogenados de hígado en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

10

Figura 25: Producción de citoquinas de células esplénicas después de 48 h de estimulación con PMA-ionomicina. La comparación estadística se realizó probando primero la normalidad utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov y a continuación ANOVA o la prueba de Kruskal-Wallis con Bonferroni o la prueba post hoc de Dunn (*p-valor vs a HFD, +p-valor vs HFD^{Bw+}; n=6-16/grupo) en ratones alimentados con dieta control (CD) o dieta con alto contenido de grasas (HFD) e inoculados con *B. wadsworthia* (Bw+) y tratados con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr+).

15

Ejemplos

Animales y diseño del estudio.

20

Para el experimento convencional, se adquirieron ratones machos C57BL/6J de Janvier (Francia) y se utilizaron después de 1 semana de su recepción. Los ratones de 5 semanas de edad fueron alimentados ad libitum con una dieta de control purificada (CD, Envigo MD.120508) o una dieta con alto contenido de grasas (HFD, 18% de grasa láctea, Envigo MD.97222) o durante 9 semanas. Para la inoculación deliberada de *B. wadsworthia*, después de mantener a los ratones en HFD o CD durante 2 semanas, se inocularon los ratones mediante sonda oral con $\sim 10^7$ UFC de *B. wadsworthia* ATCC 49260 suspendido en 200 μ l de medio (esculina biliar de Bacteroides con taurina al 1 % y 0,5 mg/ml de cisteína) o medio solo durante 3 días consecutivos. Para el tratamiento con *L. rhamnosus* CNCM I-3690, 1 semana después de la última inoculación de *B. wadsworthia*, los ratones fueron alimentados diariamente con 10^9 UFC de *L. rhamnosus* CNCM I-3690 suspendidos en 200 μ l de vehículo (solución salina tampón fosfato con glicerol al 15%) o vehículo durante 5 semanas. Para el experimento de ciclosporina, 1 semana después de la última inoculación de *B. wadsworthia*, se inyectó ciclosporina i.p. a los ratones (25 mg/kg; Sandimmun Novartis) o vehículo (PBS) 3 veces por semana durante 5 semanas.

25

30

35

Para el experimento de flora Schaedler alterada (ASF, por sus siglas en inglés), se obtuvieron ratones macho C57BL/6J libres de gérmenes (GF, por sus siglas en inglés) de Transgenese et Archivage Animaux Modeles (CNRS, UPS44, Orleans, Francia) y se utilizaron después de 1 semana de su recepción. La esterilidad se confirmó microscópicamente y mediante técnica microbiológica. Los ratones colonizados con PPA fueron amablemente proporcionados por E. Verdu de la Universidad McMaster (Canadá). Se suspendieron muestras fecales frescas de ratones colonizados con PPA y se diluyeron en NaCl estéril al 0,9% previamente reducido con glicerol al 15% (1 g en 10 ml) en condiciones anaeróbicas. Se almacenaron alícuotas de suspensión cecal de PPA a -80°C. Se inocularon ratones GF (5 semanas de edad) mediante sonda oral con 200 μ l de suspensión cecal de ASF y se mantuvieron en HFD o CD. 3 semanas después de la inoculación de la PPA, se administró a los ratones *B. wadsworthia* o medio por vía oral durante 3 días consecutivos. 1 semana después de la última inoculación de *B. wadsworthia*, los ratones fueron alimentados diariamente con 10^9 UFC de *L. rhamnosus* CNCM I-3690 o vehículo durante 4 semanas.

40

45

Se midió el consumo semanal de alimentos. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 horas antes del sacrificio y a continuación se durmieron con isoflurano. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se recolectaron los tejidos apropiados. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el Comité de Ética en Experimentación Animal.

50

Prueba de tolerancia oral a la glucosa.

55

La prueba de tolerancia oral a la glucosa se realizó 3-5 días antes del sacrificio. Los ratones se mantuvieron en ayunas quitándoles la comida y el material de cama 1 hora antes del inicio del ciclo de luz. Después de 6 horas de ayuno, se administró solución de glucosa (2 g/kg) mediante sonda oral. Se analizó el nivel de glucosa en sangre en el momento 0 (glucosa en ayunas, tomada antes de la sonda de glucosa) y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la sonda de glucosa utilizando un glucómetro OneTouch (Roche). El nivel de glucosa se representó frente al tiempo y las áreas bajo la curva de glucosa (AUC) se calcularon siguiendo la regla trapezoidal. La concentración de insulina en plasma (recogida en tubos recubiertos con EDTA) en el tiempo 0 (insulina en ayunas) y 30 minutos se analizó a partir de sangre de la vena de la cola (recogida en tubos recubiertos con EDTA) utilizando un kit ELISA de insulina de ratón ultrasensible (Alpco). La evaluación del modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó según la fórmula: glucosa en ayunas (nmol/L) x insulina en ayunas (microU/L)/22,5.

60

65

Mediciones de parámetros plasmáticos.

5 Se recogieron muestras de sangre en tubos recubiertos de heparina mediante punción cardíaca, se centrifugaron y a continuación las muestras de plasma se almacenaron a -80°C. La medición del colesterol plasmático, los triglicéridos, las lipoproteínas de alta densidad (HDL), la aspartato transaminasa (AST) y la alanina transaminasa (ALT) se realizó mediante la Plateforme de Biochimie (CRI, UMR 1149, París) utilizando el analizador químico Olympus AU400.

10 Mediciones de ácidos biliares.

10 La medición de la composición y concentración de ácidos biliares (BA, por sus siglas en inglés) en plasma y contenido intestinal fue realizada por el departamento de química del Hospital Saint Antoine (UMR 7203, Francia) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Agilent 1100, Francia) acoplada en serie con un espectrómetro de masas (QTRAP 2000, Canadá), como se describió anteriormente.

15 Mediciones de SCFA.

20 La medición de los ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés) del contenido fecal se realizó mediante la plataforma de espectrómetro de masas de la Universidad de Nantes (IRS-UN, Francia) mediante cromatografía de gases junto con espectrometría de masas, como se describió anteriormente.

Cuantificación de citoquinas.

25 Se aislaron suspensiones de células individuales del ganglio linfático mesentérico (MLN, por sus siglas en inglés) y del bazo rompiendo las células en una malla de 70 µm. Se sembraron 1 x 10⁶ células en una placa de 24 pocillos y a continuación se estimularon con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, 50 ng/ml; Sigma-Aldrich) e ionomicina (1 µM; Sigma Aldrich) durante 48 h a 37 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se utilizaron para el análisis de citoquinas.

30 50 mg de muestras de tejido intestinal y hígado se suspendieron en reactivo de extracción de proteínas tisulares T-PER (Thermo Scientific) y se homogeneizaron con FastPrep (6 m/s en 40 s). Los homogeneizados se centrifugaron y los sobrenadantes se utilizaron para el análisis de concentración de citoquinas y proteínas totales. La concentración de proteína total de los homogeneizados de tejido se analizó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific). Las concentraciones de citoquinas se normalizaron de acuerdo con la concentración de proteína medida.

35 Las citoquinas se midieron utilizando el panel de inflamación de ratón Legendplex (Biolegend) o el kit ELISA individual (R&D Mouse DuoSet IL-6; kits ELISA Mabtech IFN-γ, IL-17a; kit ELISA Ebioscience TNF-α).

40 Histología hepática y medición de triglicéridos hepáticos.

45 Se fijó una porción del lóbulo izquierdo del hígado en PFA al 4% durante 48 h y a continuación se transfirió a etanol, se fijó en parafina, se recortó, se procesó, se seccionó en láminas de aproximadamente 3 µm de grosor, se montó en un portaobjetos de vidrio y se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E). Los lípidos hepáticos se evaluaron y cuantificaron como se describió anteriormente.

Permeabilidad intestinal *in vivo* y medición de sCD14 en plasma.

50 El ensayo *in vivo* de la función de la barrera intestinal se realizó utilizando el método de dextrano conjugado con fluoresceína (FITC-dextrano, 3-5 kDA), como se describió anteriormente (Martin et al, 2015). Brevemente, el día del sacrificio, se administró FITC-dextrano (0,6 mg/g de peso corporal) a los ratones mediante sonda oral y 3 horas después, se recogieron muestras de sangre en tubos recubiertos con heparina. La intensidad de la fluorescencia se midió en el plasma utilizando un lector de microplacas (Tecan). La concentración plasmática de CD14 soluble (sCD14) se midió utilizando el kit CD14 ELISA (R&D).

55 Cuantificación de LCN2 fecal.

60 Las muestras fecales congeladas se pesaron y reconstituyeron en PBS frío. A continuación, las muestras se agitaron en una máquina batidora de perlas FastPrep durante 40 s en la configuración 6 usando perlas de vidrio de 4,5 mm para obtener una suspensión fecal homogénea. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 g (40C) y los sobrenadantes claros se recogieron y almacenaron a -20 °C hasta el análisis. Los niveles de LCN2 se estimaron utilizando el kit Elisa LCN2 murino DuoSet (R&D) según las instrucciones del fabricante y se expresaron como pg/mg de heces.

B. wadsworthia empeora el deterioro metabólico del organismo inducido por una dieta rica en grasas.

Para determinar las consecuencias de la presencia de *B. wadsworthia* en el estado metabólico del organismo, se evaluaron los parámetros metabólicos en ratones después de un período de alimentación con una dieta con alto contenido de grasas (HFD). Los ratones HFDBw+ mostraron niveles más altos de glucosa en ayunas. Además, se observó un aumento significativo en las concentraciones séricas de aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) en todos los grupos con HFD en comparación con los ratones alimentados con dieta control (CD), pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos con HFD y HFDBw+. El análisis de la histología hepática reveló que el contenido de lípidos hepáticos aumentó significativamente en ratones HFDBw+. Paralelamente, los triglicéridos hepáticos totales fueron significativamente mayores en el grupo HFDBw+ que en el grupo HFD, lo que sugiere que *B. wadsworthia* tiene efectos perjudiciales sobre esta característica metabólica. Todos los ratones alimentados con HFD, independientemente del tratamiento, tenían niveles significativamente elevados de colesterol total y HDL en el plasma. Por último, se observó una estrecha correlación positiva entre la glucosa en ayunas y la carga de *B. wadsworthia* en el ciego. En conjunto, estos resultados mostraron que la elevada presencia de *B. wadsworthia* potencia el síndrome metabólico del organismo inducido por la HFD, con una notable disregulación de la homeostasis de la glucosa y la función hepática.

La prevención de la sobreabundancia de *B. wadsworthia* en la DFH revierte las disfunciones metabólicas asociadas a *B. wadsworthia*

Los inventores probaron la capacidad de la cepa *L. rhamnosus* CNCM I-3690 en el modelo mencionado anteriormente. La alimentación oral diaria de *L. rhamnosus* CNCM I-3690 (Lr) indujo una disminución significativa en la carga fecal de *B. wadsworthia* (Figura 1). De manera similar, *L. rhamnosus* CNCM I-3690 fue capaz de reducir aún más la proliferación de *B. wadsworthia* en el ciego y el intestino delgado (Figura 2).

Los ratones HFDBw+ tratados con *L. rhamnosus* (HFDBw+Lr+) mostraron niveles reducidos de glucosa en ayunas, insulina plasmática y respuesta HOMA-IR (Figuras 3-6). La OGGT reveló además que los ratones HFDBw+Lr+ tendían a controlar el nivel de glucosa mejor que los HFDBw+ (Figuras 7-8). *L. rhamnosus* CNCM I-3690 también corrigió el efecto de la HFD en el nivel de insulina (S4B).

B. wadsworthia mejora aún más el dismetabolismo de los ácidos biliares inducido por una dieta rica en grasas.

Los datos transcriptómicos del organismo revelaron que *B. wadsworthia* modula una serie de genes implicados en el metabolismo de la taurina, que está relacionado con la homeostasis de los ácidos biliares. Los ácidos biliares son cada vez más reconocidos como importantes factores de señalización y reguladores del metabolismo. Como tal, los inventores investigaron el perfil de ácidos biliares de ratones que albergan una microbiota compleja. Los inventores descubrieron que la alimentación con HFD conduce a cambios en la composición de ácidos biliares en el ciego, caracterizados por ácidos biliares totales significativamente elevados y conjugados de ácidos biliares primarios elevados en comparación con los conjugados secundarios y una proporción disminuida de ácidos biliares como DCA y HDCA (Figuras 13-15). *B. wadsworthia* tiende a disregular aún más la composición de ácidos biliares en el ciego con niveles más altos de ácido taurocólico (TCA), un ácido biliar conjugado con taurina, así como otros ácidos biliares como UDCA y MCA-β. Además, en el suero de ratones alimentados con HFD, la concentración de ácidos biliares conjugados con taurina fue más de 100 veces mayor en comparación con la CD, con un aumento aún mayor en el grupo HFDBw+ (Figuras 16-17). Por el contrario, HFDBw+Lr+ mostró ácidos biliares totales y conjugados con taurina más bajos en comparación con HFDBw+, lo que sugiere la eficiencia de *L. rhamnosus* CNCM I-3690 para revertir el efecto de HFD y *B. wadsworthia* sobre los ácidos biliares.

B. wadsworthia induce una disfunción de la barrera intestinal y amplifica la inflamación provocada por la HFD que puede revertirse con *L. rhamnosus* CNCM I-3690.

Según los estudios simplificados de microbiota de los inventores, la presencia de *B. wadsworthia* reguló positivamente la síntesis global de LPS por parte de las colonias microbianas intestinales y se asoció además con un nivel más alto de LPS sistémico. Guiados por estos resultados, los inventores evaluaron de manera similar la disponibilidad de LPS en el compartimento sistémico en un modelo de ratones convencionales con HFD. De acuerdo con los resultados obtenidos de ratones colonizados con PPA, el nivel de sCD14 en suero fue significativamente mayor en ratones HFDBw+ que en ratones HFD (Figura 18). *L. rhamnosus* CNCM I-3690 mejoró este fenotipo.

La disfunción de la barrera intestinal es una característica importante en la obesidad y el síndrome metabólico. Los inventores plantearon la hipótesis de que este parámetro puede ser la base de la mayor biodisponibilidad sistémica del LPS. Así, los inventores evaluaron la permeabilidad intestinal utilizando un marcador de permeabilidad clásico FITC-dextrano. Los ratones HFDBw+ mostraron una mayor permeabilidad intestinal como lo demuestran los niveles más altos de FITC-dextrano en suero después de la sonda oral

(Figura 19). Este fenotipo fue reducido por *L. rhamnosus* CNCM I-3690. En general, estos resultados muestran que el aumento de la presencia de *B. wadsworthia* aumenta el impacto de las alteraciones de la barrera intestinal inducidas por la HFD y *L. rhamnosus* CNCM I-3690 revierte parcialmente este efecto.

5 La alteración de la barrera intestinal puede permitir una mayor permeabilidad intestinal a las endotoxinas bacterianas, como el LPS, y a su vez puede aumentar la inflamación de la mucosa y provocar inflamación sistémica. Por lo tanto, los inventores examinaron a continuación si *B. wadsworthia* aumenta aún más la respuesta inflamatoria inducida por HFD en ratones convencionales. Los inventores caracterizaron en primer lugar el estado de inflamación de la mucosa cuantificando los niveles de lipocalina en las heces en diferentes momentos durante la duración del experimento (Figura 20). La alimentación con HFD tendió a mostrar niveles más altos de lipocalina en las heces en comparación con la CD, pero esto aumentó aún más y significativamente en los ratones HFDBw+, particularmente en las semanas 7 y 9. Los niveles de citoquinas en MLN, íleon y yeyuno de HFDBw+ fueron igualmente mayores en comparación con CD o HFD o ambos grupos, lo que subraya un estado de respuesta inmune mucosa intensificada en el grupo HFDBw+ (Figuras 21-23). El tratamiento con *L. rhamnosus* CNCM I-3690 fue capaz de atenuar algunas de estas respuestas, particularmente para los niveles de lipocalina fecal, TNF- α e IFN- γ (Figuras 20-23).

Los inventores evaluaron además el estado de inflamación sistémica y observaron un patrón similar con una producción significativamente mayor de varias citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL-6 en el bazo y el hígado de ratones HFDBw+ (Figuras 24-25). De manera similar a la respuesta inmune de la mucosa, la administración de *L. rhamnosus* CNCM I-3690 corrigió globalmente la inflamación sistémica inducida por *B. wadsworthia*. En conjunto, estos resultados mostraron que *B. wadsworthia* tiene sinergia con la HFD para inducir estados más elevados de inflamación sistémica y de las mucosas, que pueden revertirse al menos parcialmente con *L. rhamnosus* CNCM I-3690.

25 DISCUSIÓN

Las dietas con alto contenido de grasas saturadas (HFD) se asociaron sistemáticamente con una mayor presencia de *B. wadsworthia*, una bacteria implicada en el aumento de la gravedad de la colitis en ratones il-107. Sin embargo, aún no se comprende bien el impacto de *B. wadsworthia* en un organismo no genéticamente susceptible y si su proliferación podría promover una función metabólica deteriorada y cómo. En este caso, los inventores utilizaron un enfoque basado en hipótesis para analizar cómo *B. wadsworthia* es capaz de modular la respuesta metabólica del organismo a la HFD. A continuación, los inventores probaron la hipótesis en un modelo murino HFD convencional. Los resultados mostraron que, además de los efectos proinflamatorios intestinales, *B. wadsworthia* promueve defectos de la barrera intestinal, inflamación sistémica, dismetabolismo de los ácidos biliares y cambios en el perfil funcional del microbioma, lo que lleva al empeoramiento de los efectos metabólicos inducidos por la HFD. Además, los inventores demostraron que *L. rhamnosus* CNCM I-3690 era capaz de revertir la mayoría de las alteraciones metabólicas e inflamatorias del organismo provocadas por *B. wadsworthia*.

40 Se había demostrado previamente que *B. wadsworthia* proliferaba en presencia de ácidos biliares conjugados con taurina, especialmente ácido taurocólico (TCA). De manera similar, los inventores observaron que *B. wadsworthia* crece *in vitro* 1 log de unidades formadoras de colonias más en presencia de taurina (1%). Por lo tanto, en conjunto con resultados anteriores, esto sugiere que la taurina y sus derivados, particularmente el TCA, pueden no ser necesarios para la supervivencia de *B. wadsworthia*, pero sí son esenciales para su mayor aptitud y crecimiento.

Los ácidos biliares se sintetizan a partir del colesterol. En el hígado, la taurina, junto con la glicina, se utilizan para conjugar ácidos biliares para producir ácidos biliares primarios. Los ácidos biliares pasan por circulación enterohepática, que incluye la circulación en el intestino, donde la microbiota desconjuga los ácidos biliares primarios y los convierte en ácidos biliares secundarios. Anteriormente se había demostrado que las grasas saturadas de origen animal promueven la producción de ácidos biliares conjugados con tauro, como el TCA. Los inventores demostraron que la HFD regula significativamente los genes implicados en el metabolismo de la taurina con una mayor concentración de ácidos biliares conjugados con taurina y una menor proporción de ácidos biliares secundarios. *B. wadsworthia* desregula aún más la desproporción de ácidos biliares en el contexto de HFD y esto puede revertirse mediante el tratamiento con *L. rhamnosus* CNCM I-3690. Los ácidos biliares secundarios desempeñan un importante papel de retroalimentación negativa en la disminución de la síntesis de ácidos biliares; por lo tanto, el aumento de los ácidos biliares totales en suero y ciego en el grupo HFDBw+ puede verse agravado por la disminución de la proporción de ácidos biliares secundarios. Además, a diferencia de los ácidos biliares conjugados, los ácidos biliares no conjugados, como el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico, son fuertes agonistas de los receptores de ácidos biliares como el receptor farnesoide X y el receptor transmembrana acoplado a proteína G. La señalización a través de estos receptores activa redes transcripcionales y cascadas de señalización relevantes para el metabolismo del colesterol y los lípidos, el mantenimiento de la glucosa y la homeostasis hepática, así como genes implicados en la supresión de la inflamación y el fortalecimiento de la función de la barrera intestinal. Asimismo, estudios previos han demostrado las propiedades proinflamatorias de los ácidos biliares primarios. En conjunto, esto

sugiere que el impacto de *B. wadsworthia* en el metabolismo de los ácidos biliares puede ser la base del mecanismo por el cual la bacteria potencia el deterioro metabólico inducido por la HFD y las disfunciones del organismo, particularmente la inflamación y la disfunción de la barrera.

- 5 Para determinar mejor la base mecanística mediante la cual *B. wadsworthia* afecta el metabolismo del organismo y cómo *L. rhamnosus* CNCM I-3690 modula estos efectos, los inventores realizaron análisis transcriptómicos tanto en el organismo como en la microbiota. Para comprender completamente el sistema, los inventores eligieron trabajar en un entorno de microbiota controlado, en el que la función bacteriana y del organismo se puede inferir de un microbio o condición específica. Uno de los hallazgos clave de dichos estudios de metatranscriptómica reveló que la vía de síntesis de LPS está altamente regulada en la microbiota de ratones HFDBw+. Esto fue paralelo a una mayor translocación de LPS, lo que puede explicar, al menos en parte, el aumento de la respuesta inflamatoria sistémica que los inventores observaron en HFDBw+, tanto en ratones colonizados con PPA como en ratones convencionales.
- 10
- 15 *L. rhamnosus* CNCM I-3690 puede estar modulando el fenotipo proinflamatorio en ratones HFDBw+ al disminuir la abundancia de *B. wadsworthia* y/o mediante sus efectos antiinflamatorios intrínsecos.

- Además de la síntesis de LPS, la presencia de *B. wadsworthia* indujo una disminución de la expresión de genes microbianos implicados en el metabolismo del butanoato en ratones colonizados por PPA. Además, la disminución de la producción de butirato se confirmó mediante la dosificación en el lumen del colon. Además de su efecto en la modulación de la respuesta inflamatoria, se ha demostrado que el butirato revierte el aumento de la permeabilidad intestinal mediante el ensamblaje de uniones estrechas. Además, se había demostrado previamente que la suplementación dietética con butirato tenía beneficios preventivos y terapéuticos en modelos animales de obesidad y resistencia a la insulina.
- 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende al menos un *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690, para su uso en el tratamiento del dismetabolismo de los ácidos biliares.
2. Composición para uso según la reivindicación 1, en la que los ácidos biliares séricos o cecales están reducidos.
- 10 3. Composición para uso según la reivindicación 1, en la que los ácidos biliares tauro-conjugados están reducidos.
4. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el individuo tratado tiene una dieta no vegetariana y/o una dieta con alto contenido de grasas.
- 15 5. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición es un producto alimenticio.
- 20 6. Composición para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la composición es un producto lácteo fermentado.

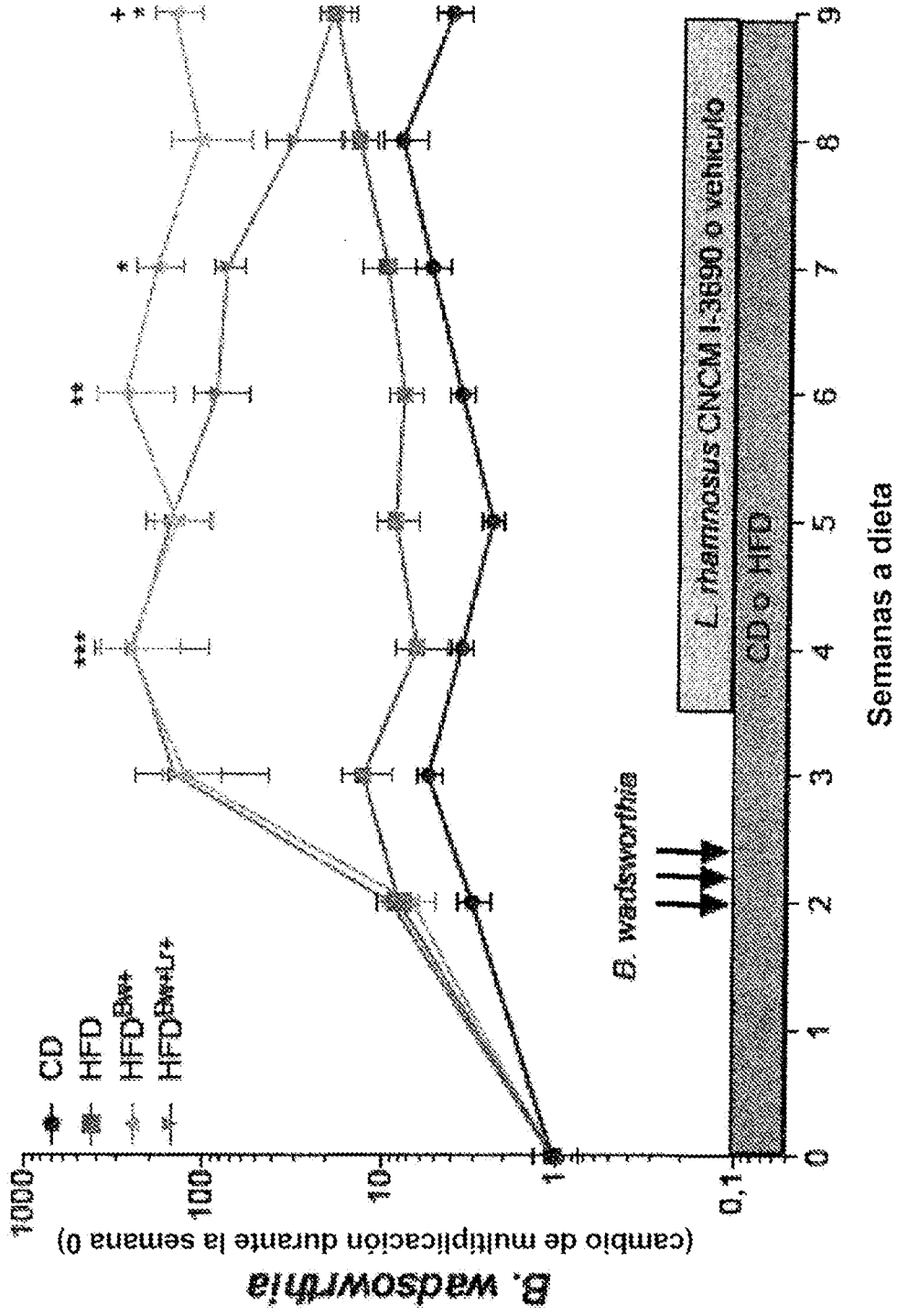


FIGURA 1

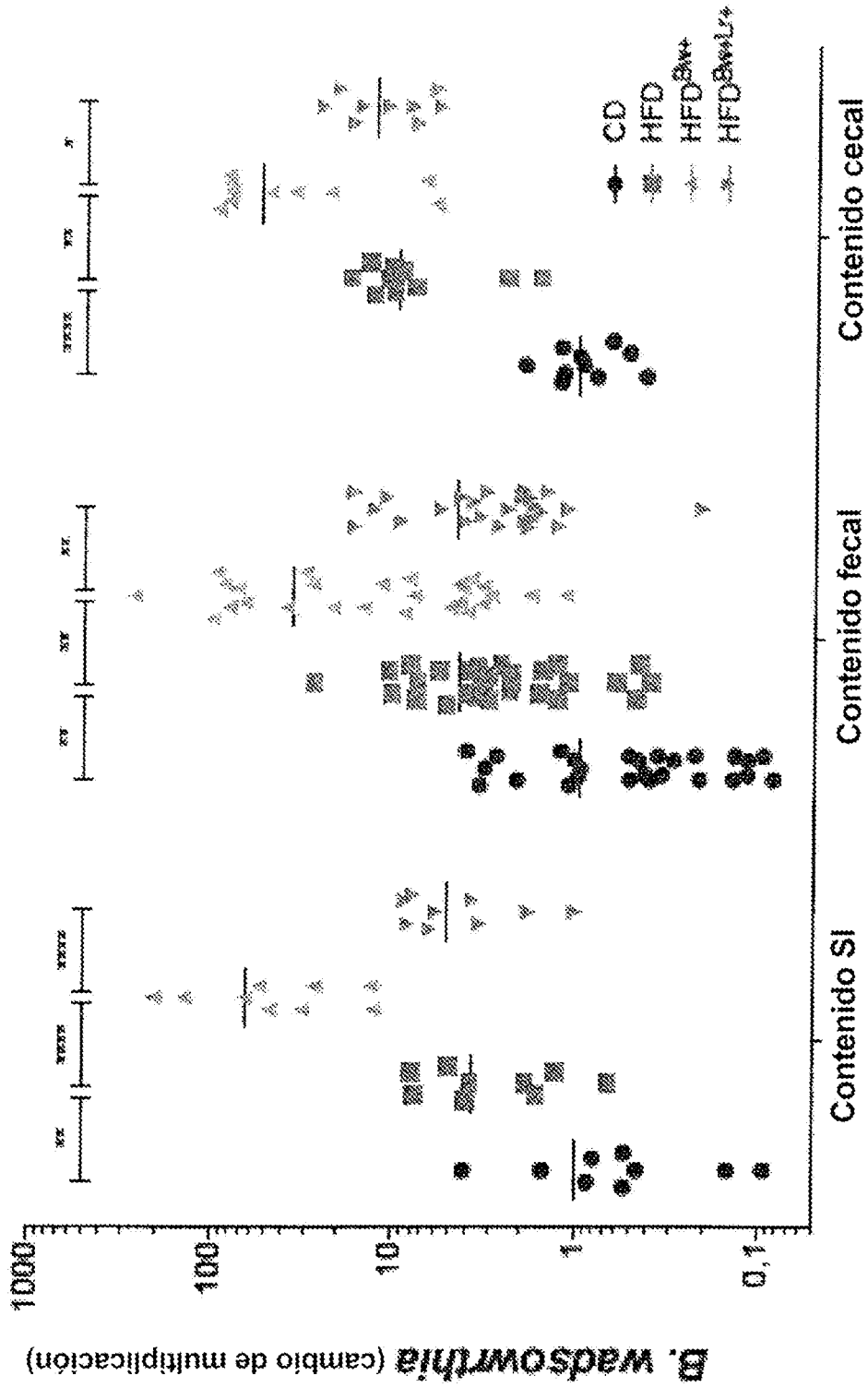


FIGURA 2

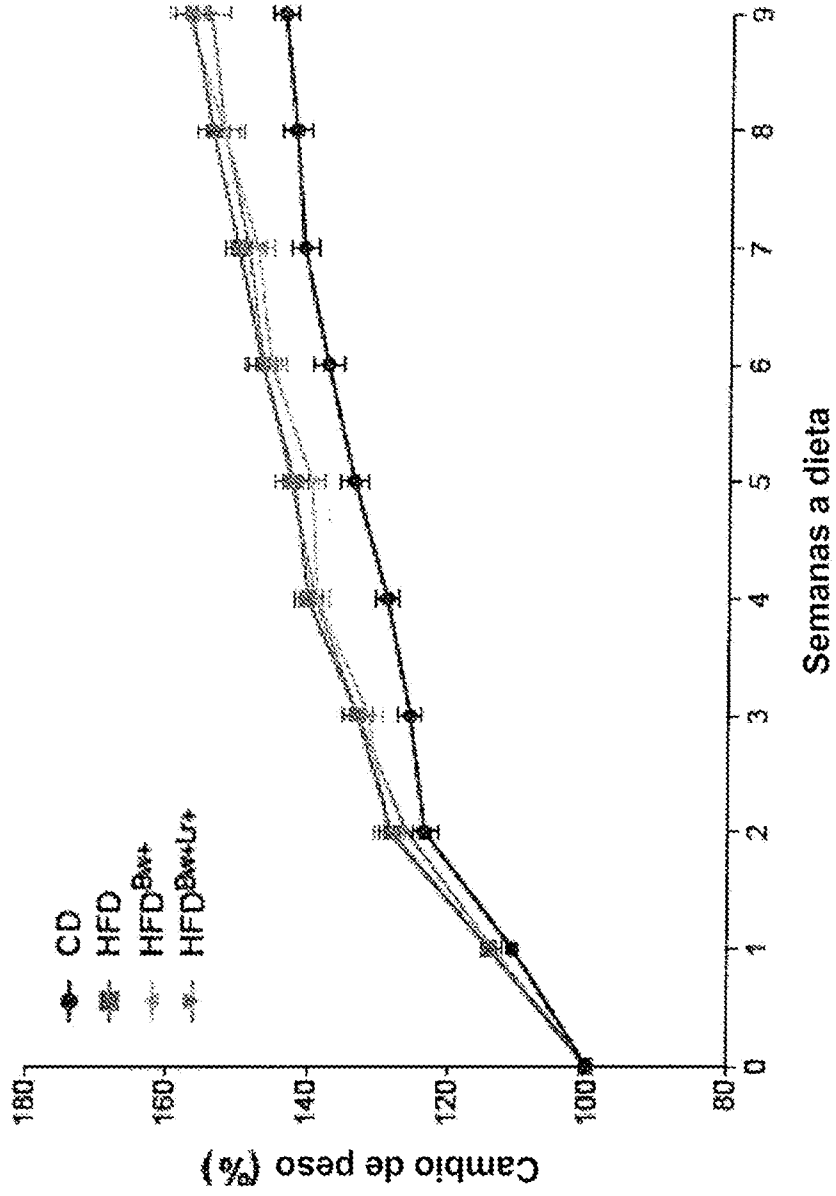


FIGURA 3

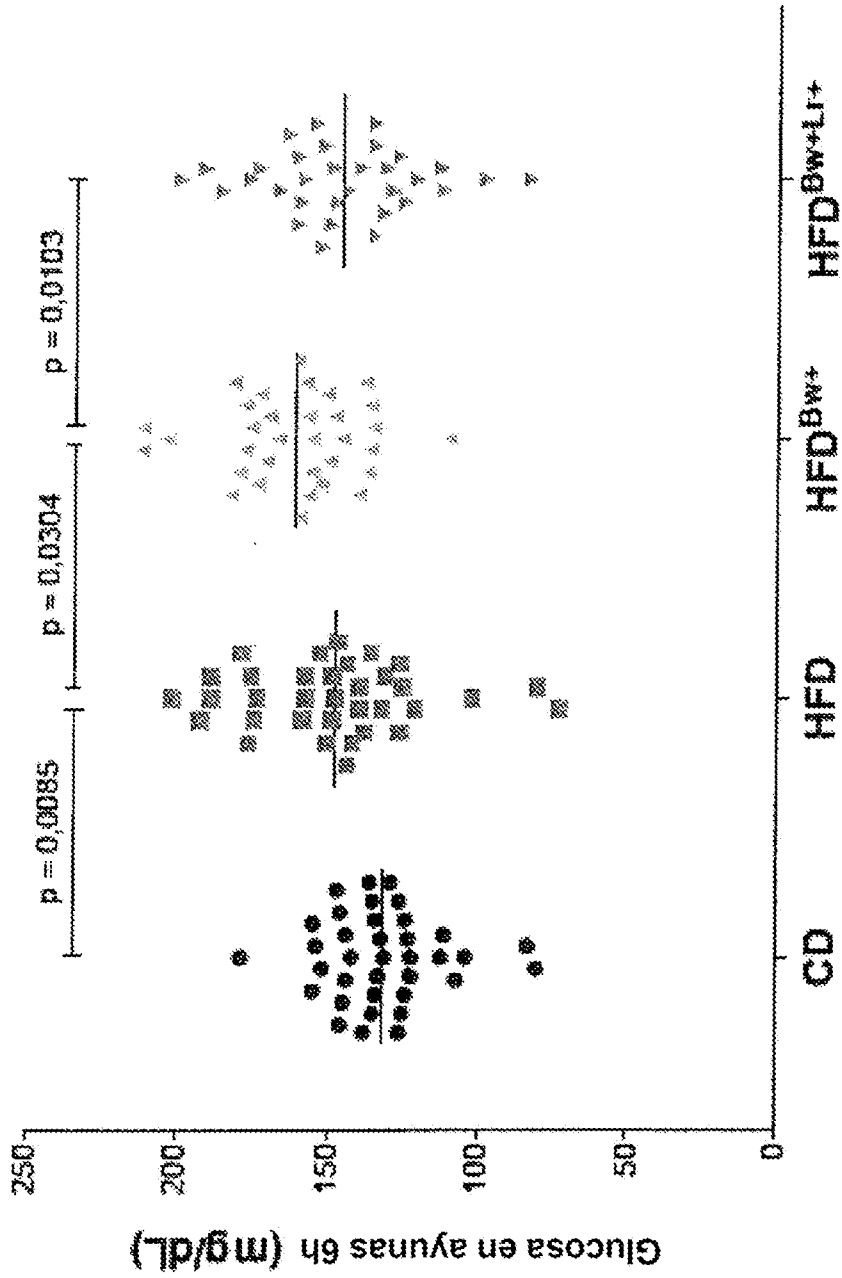


FIGURA 4

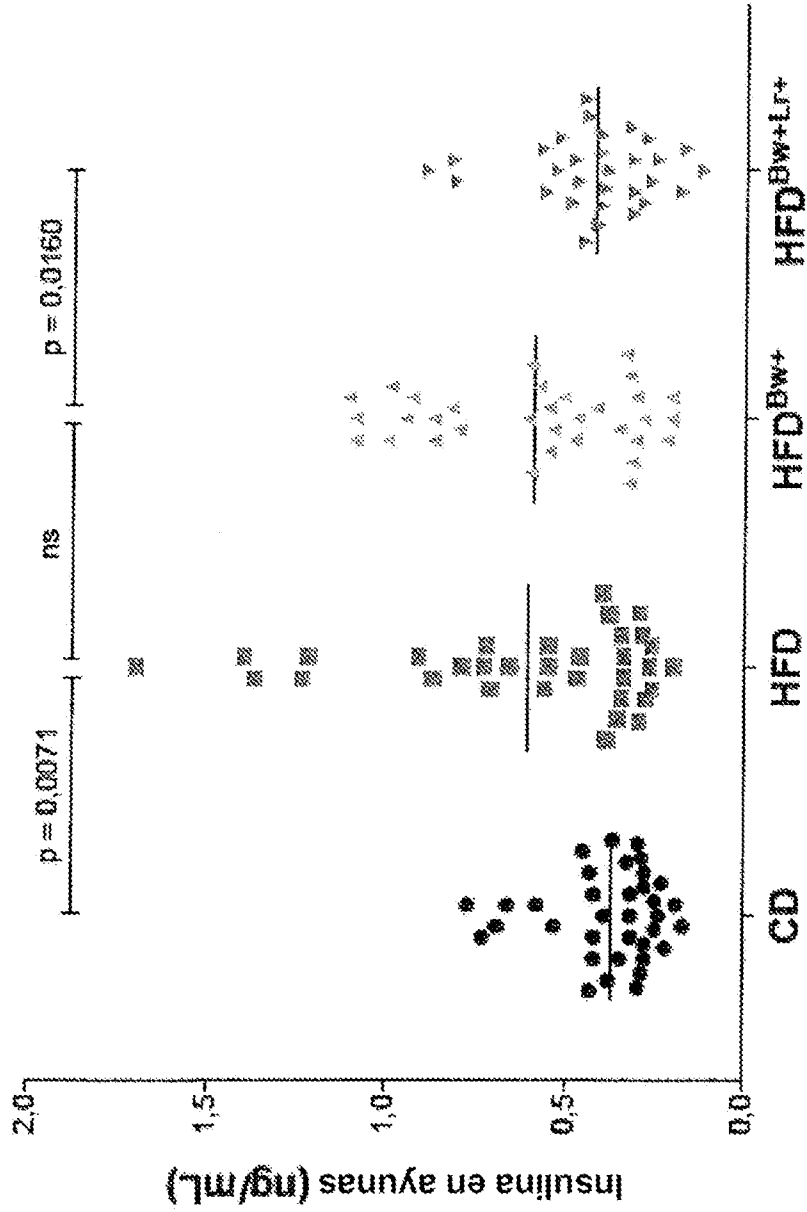


FIGURA 5

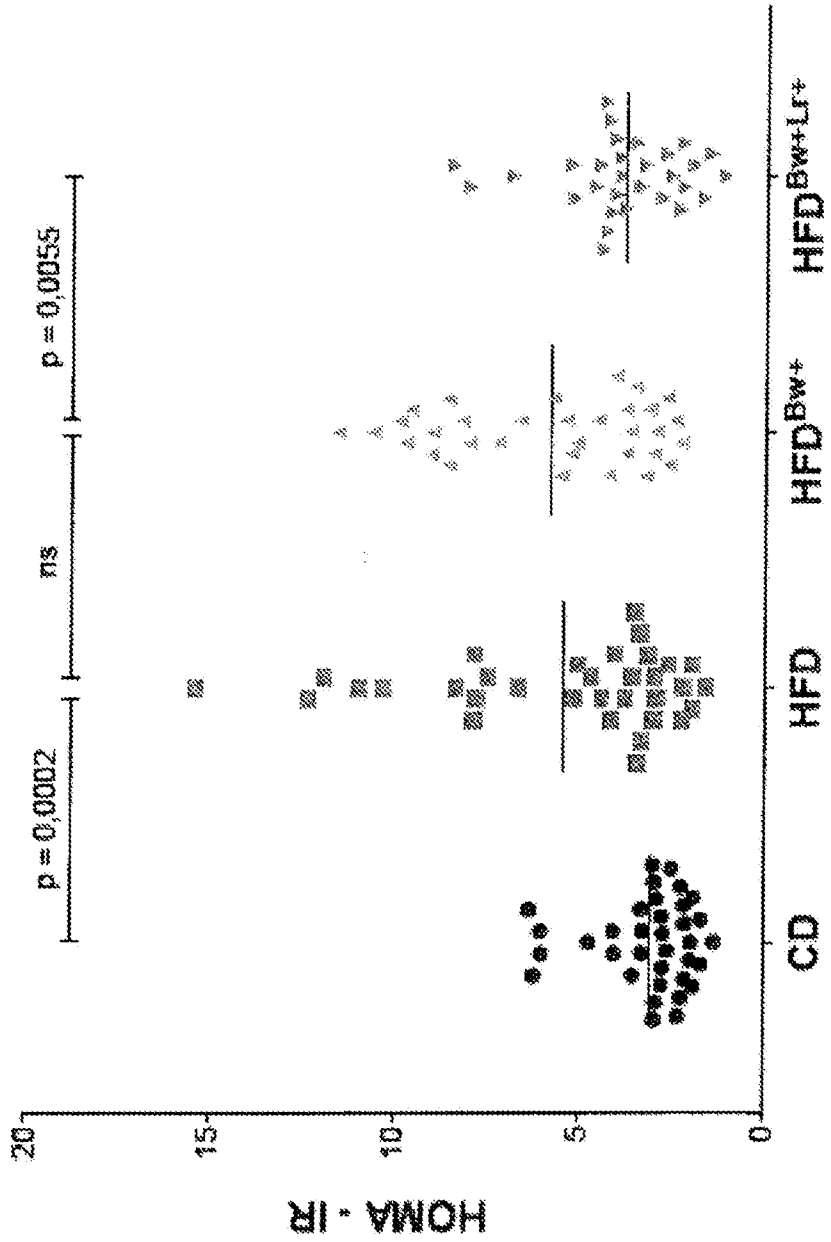


FIGURA 6

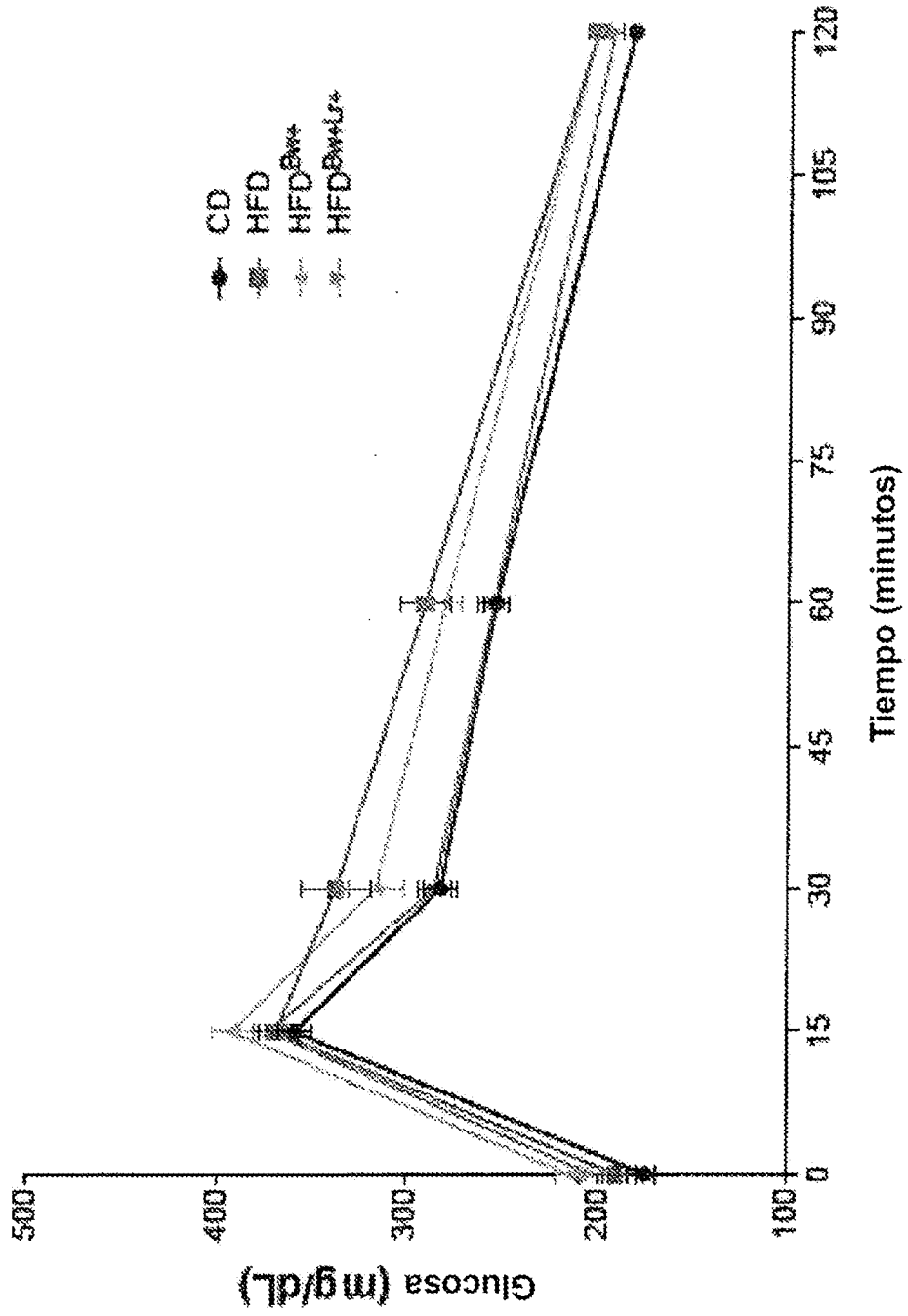


FIGURA 7

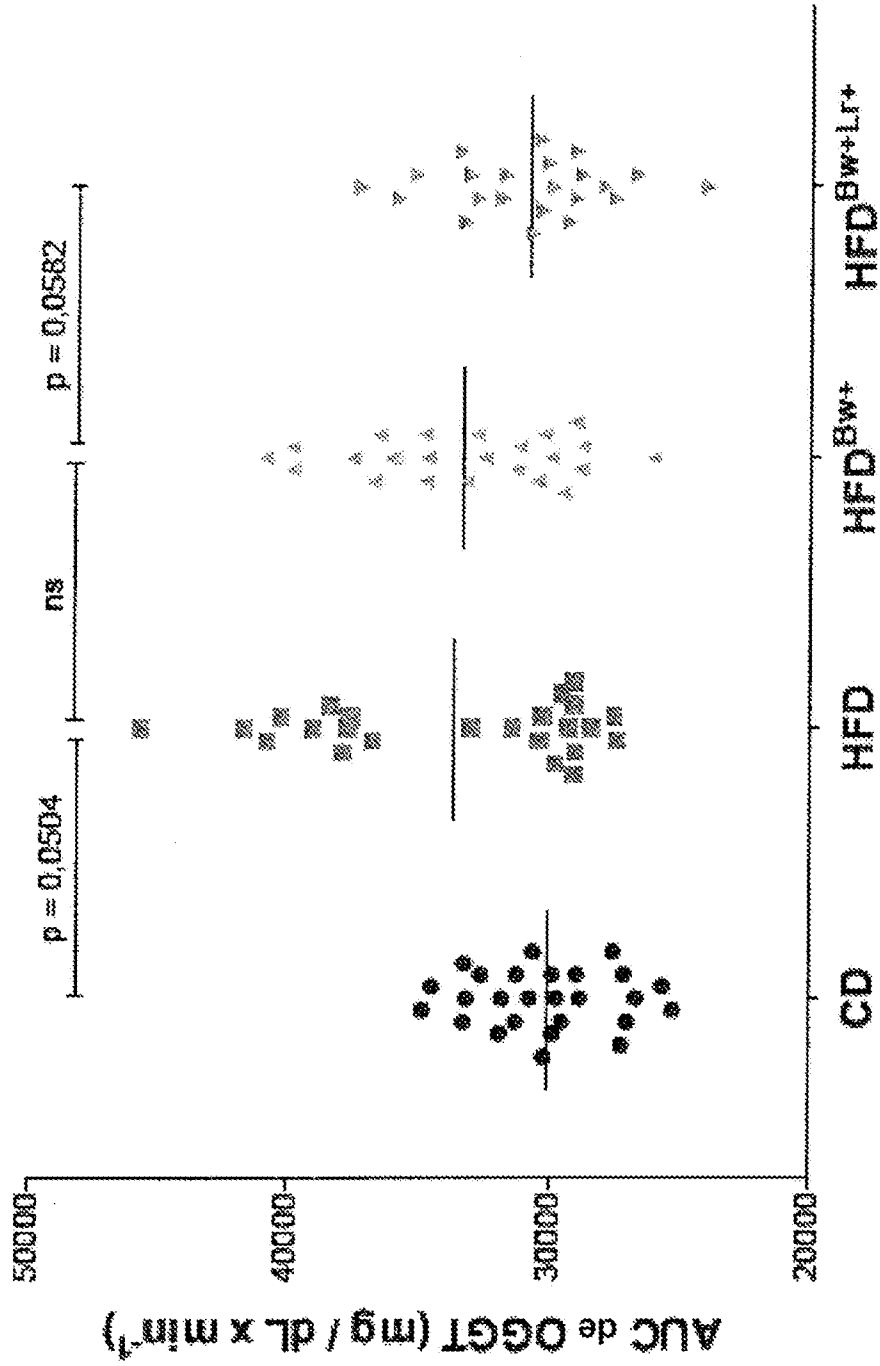


FIGURA 8

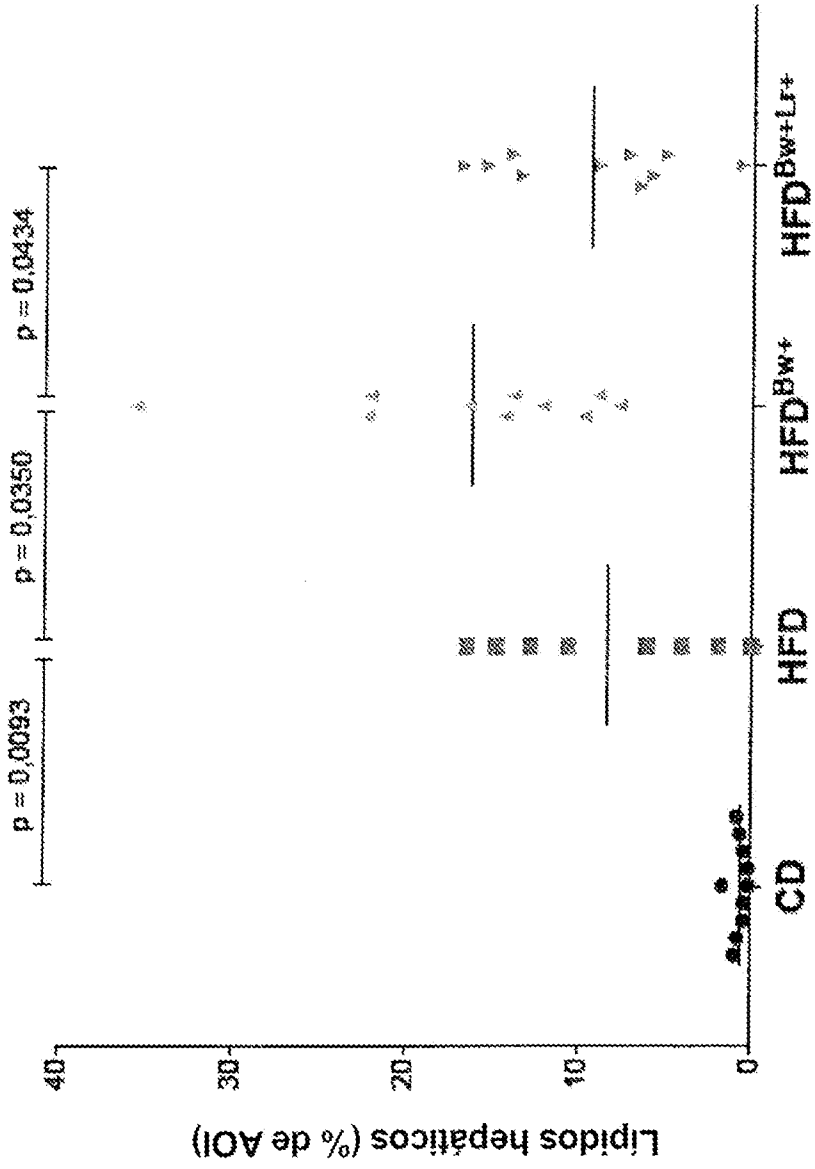


FIGURA 9

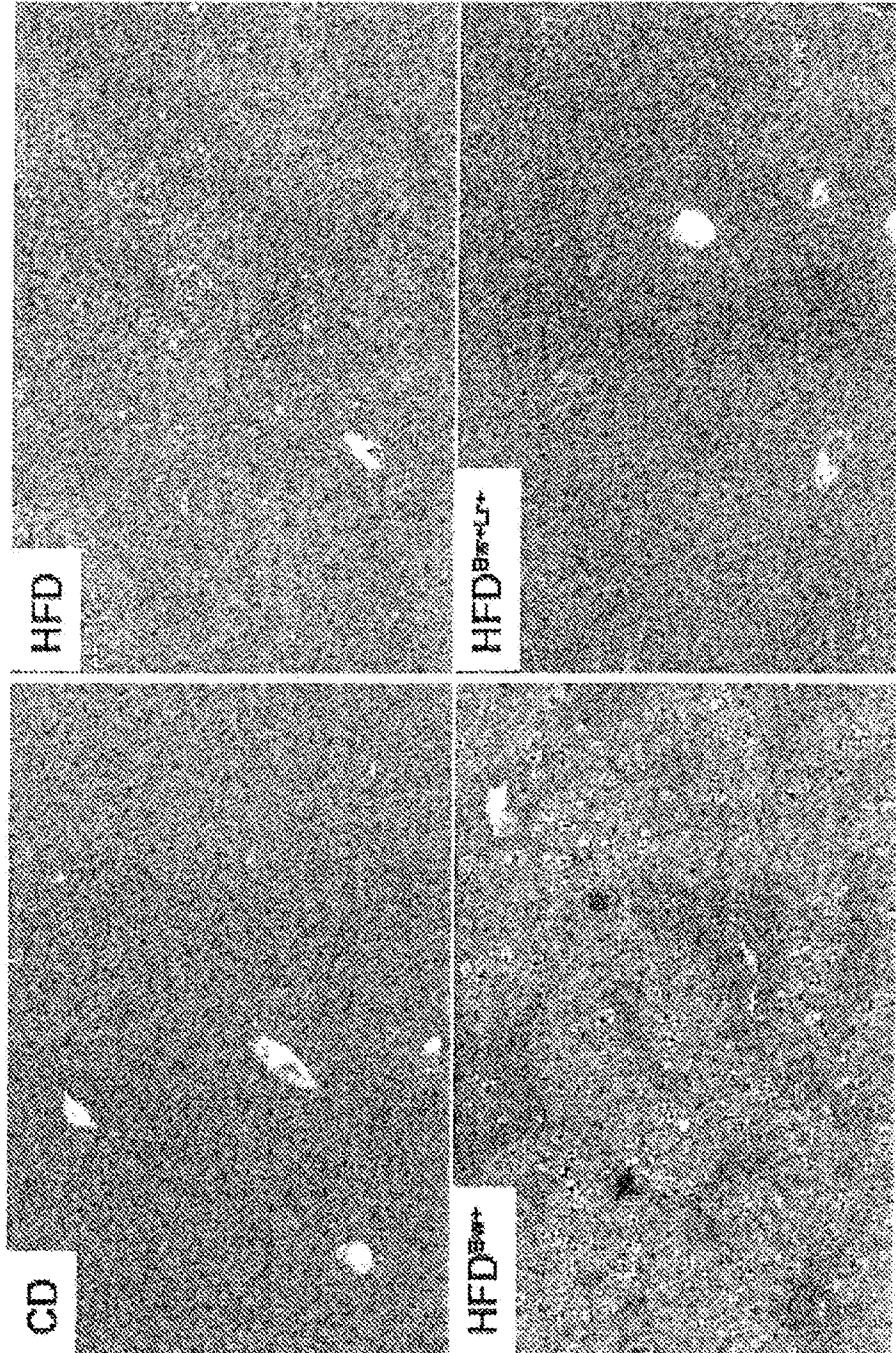


FIGURA 10

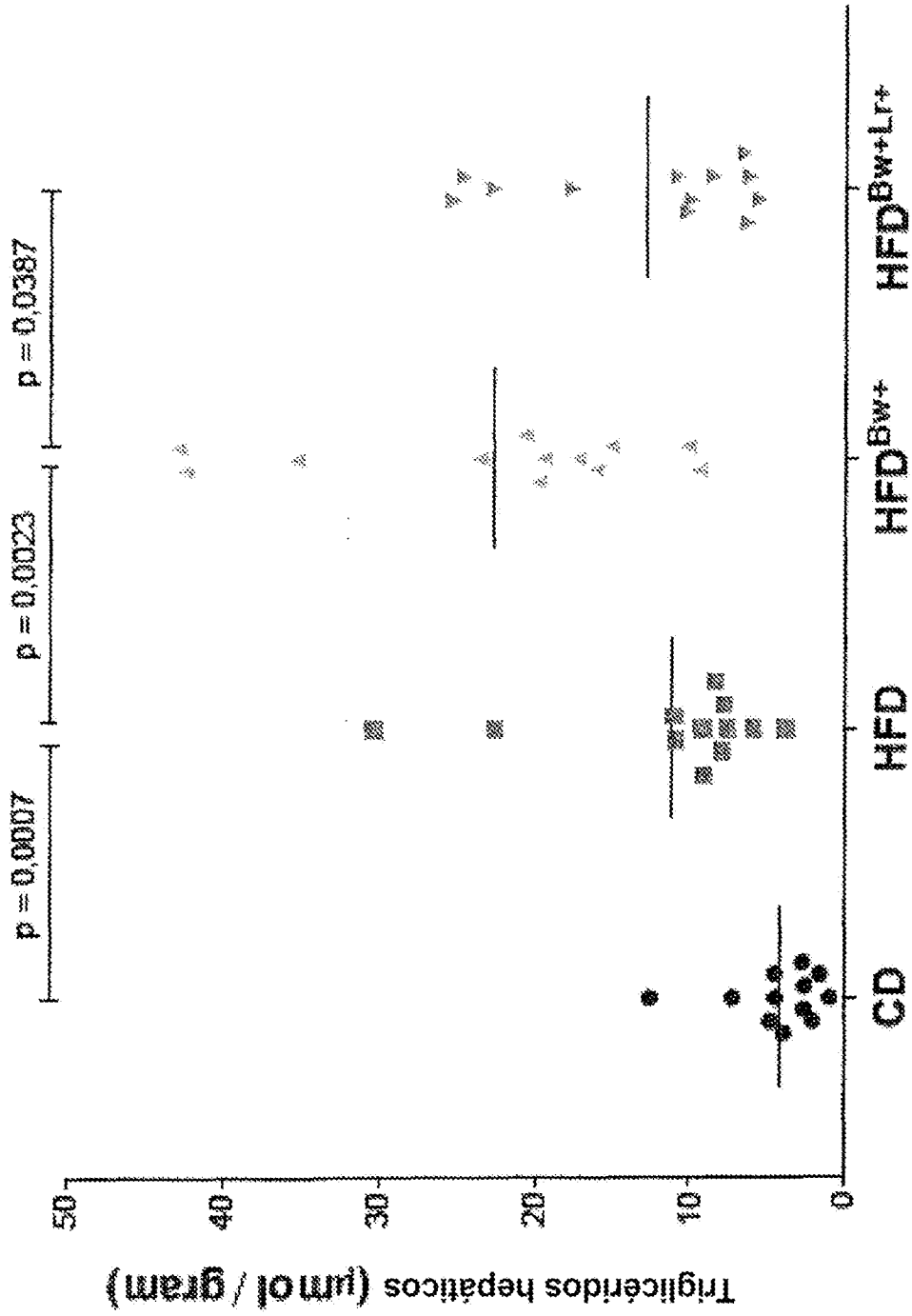
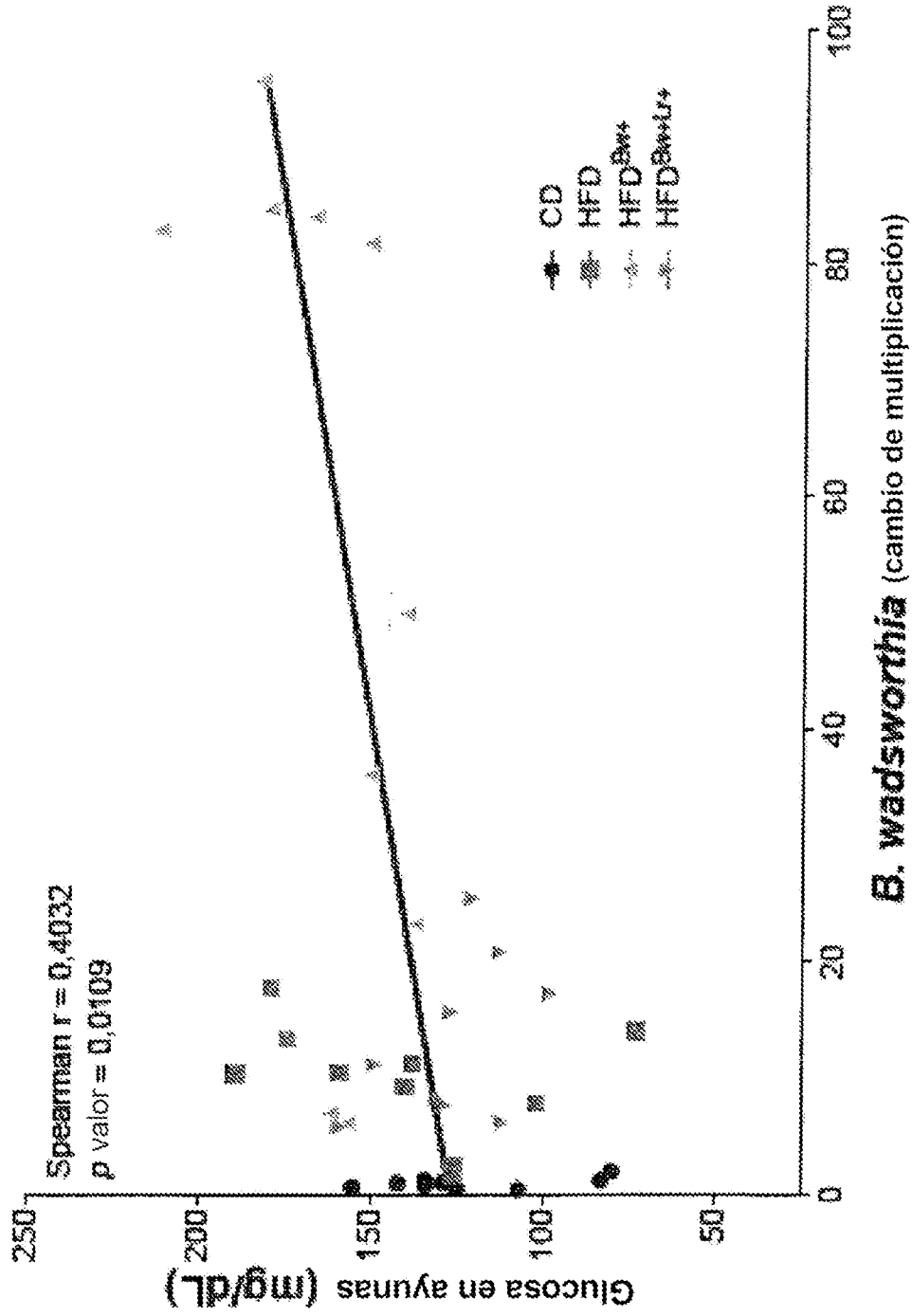


FIGURA 11



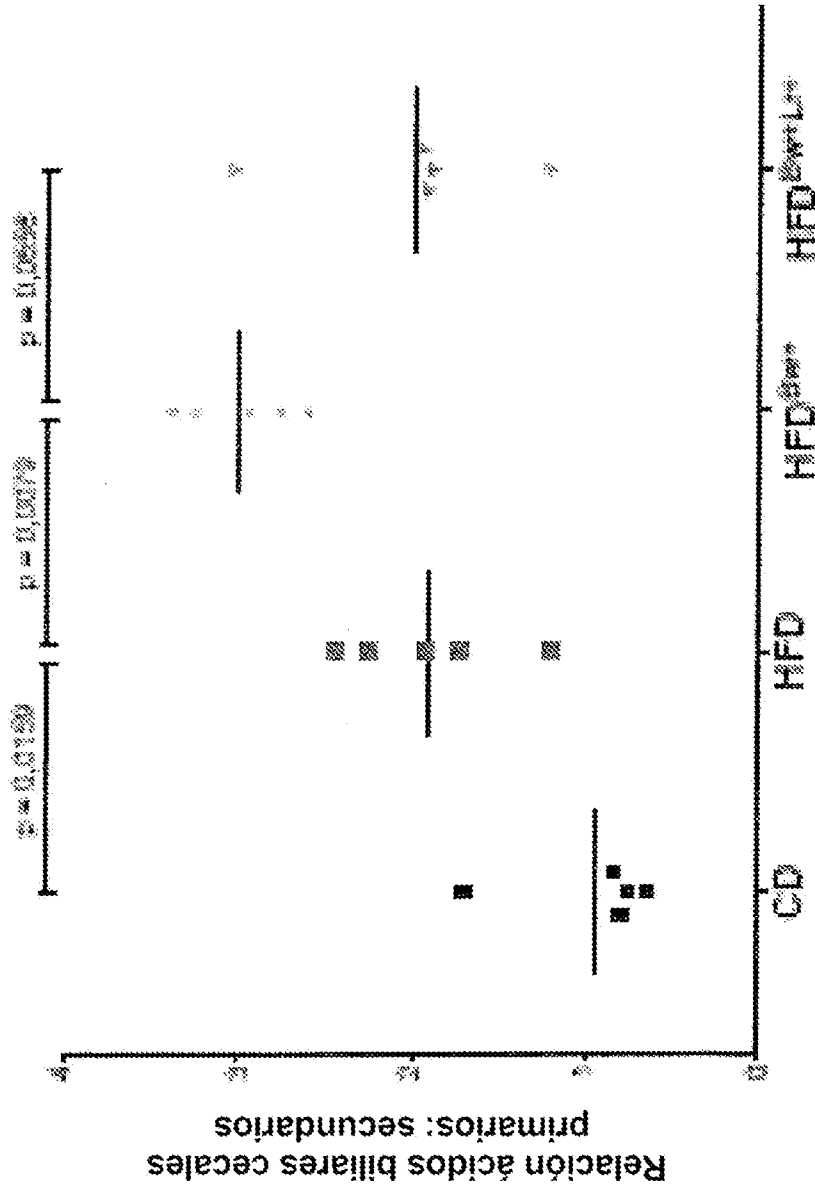


FIGURA 13

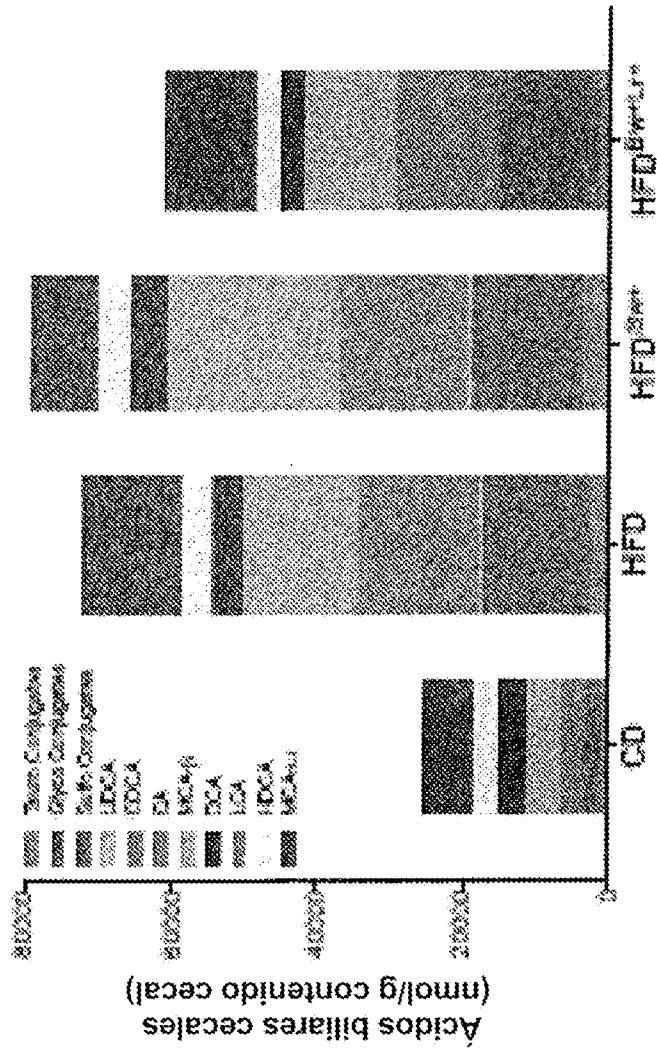


FIGURA 14

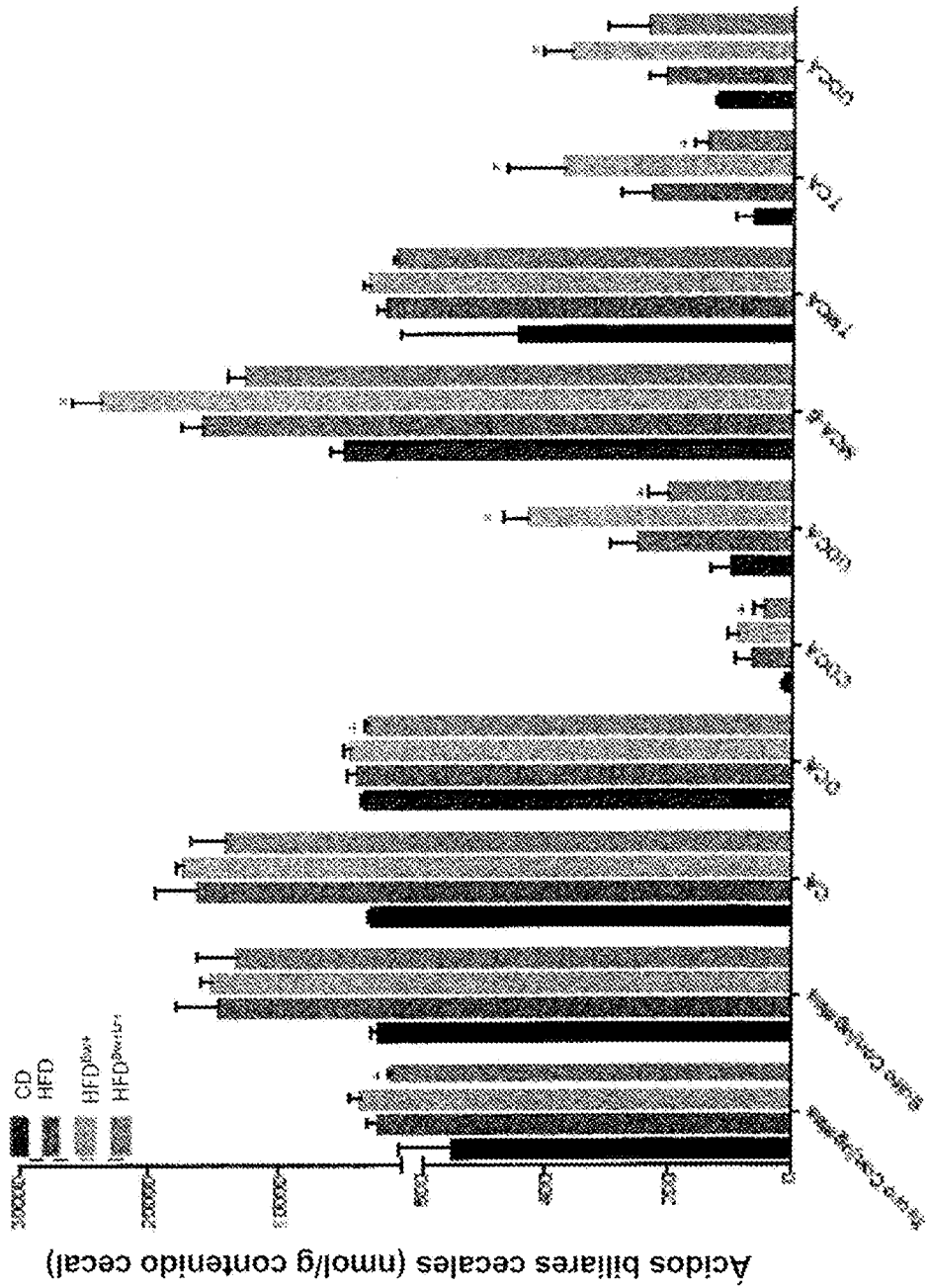


FIGURA 15

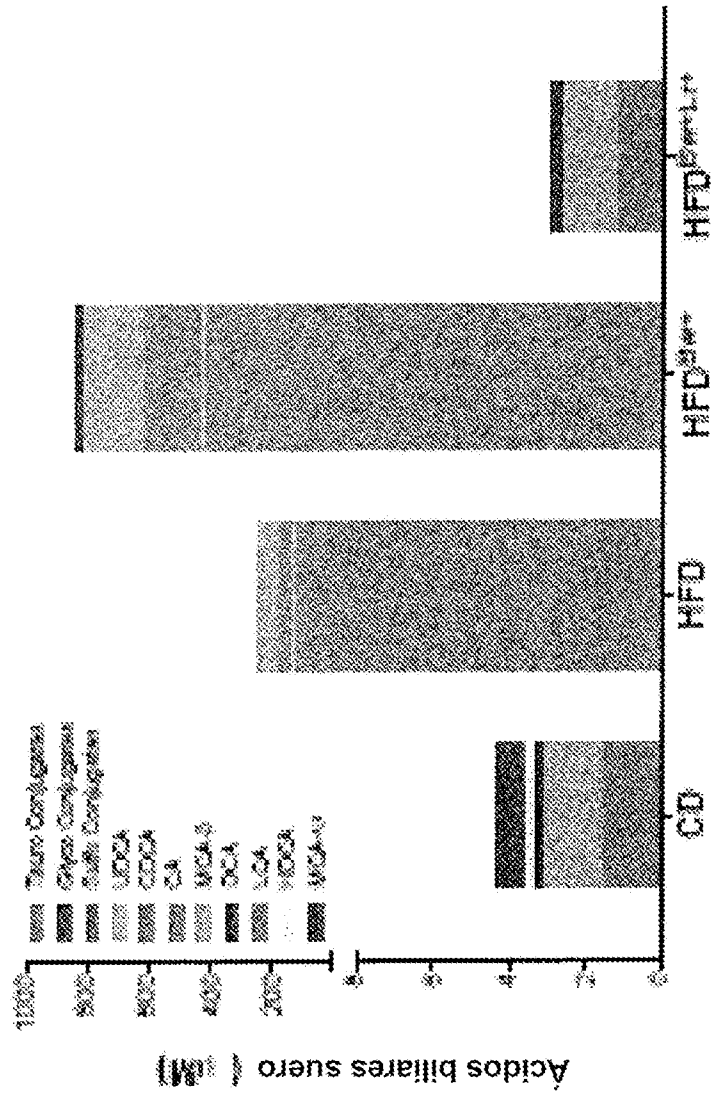


FIGURA 16

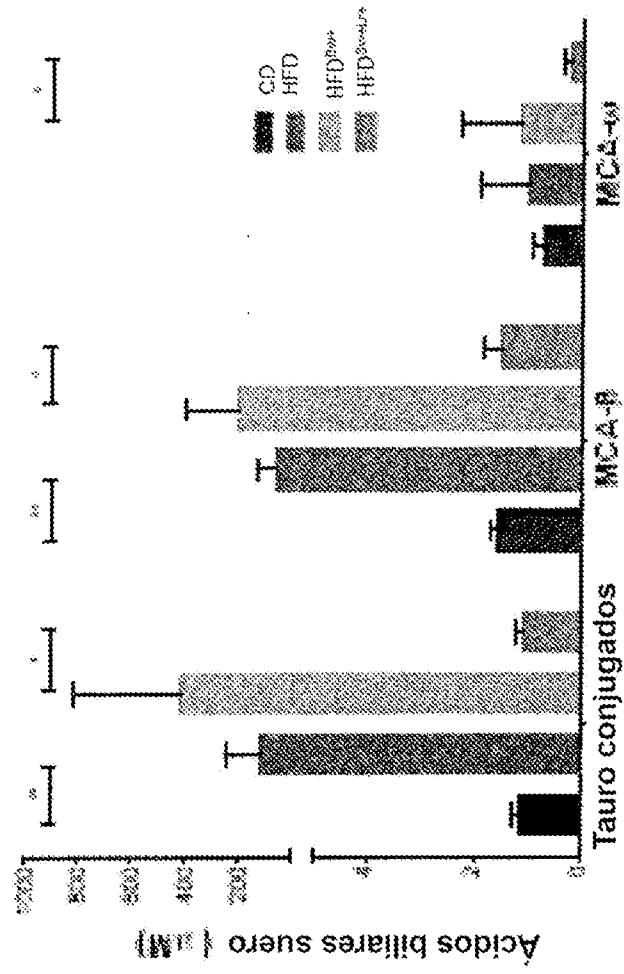


FIGURA 17

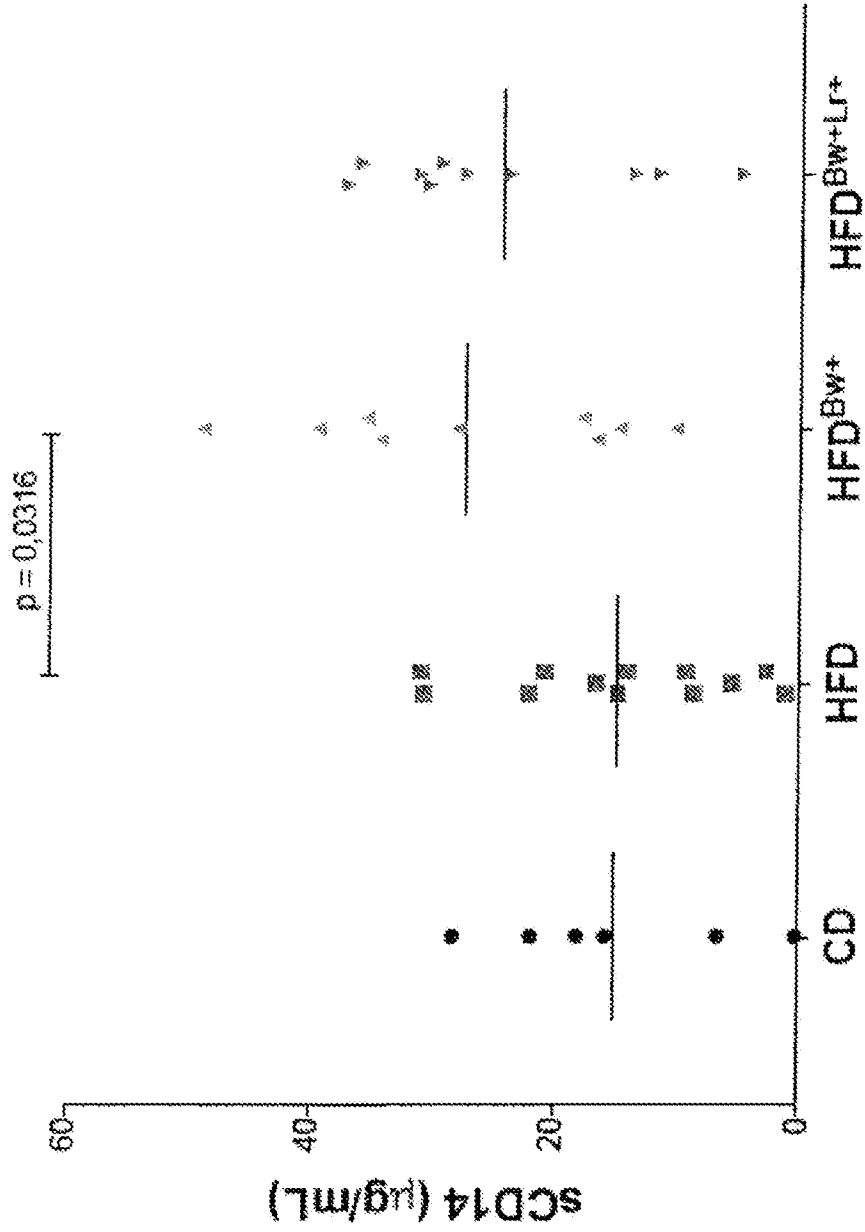


FIGURA 18

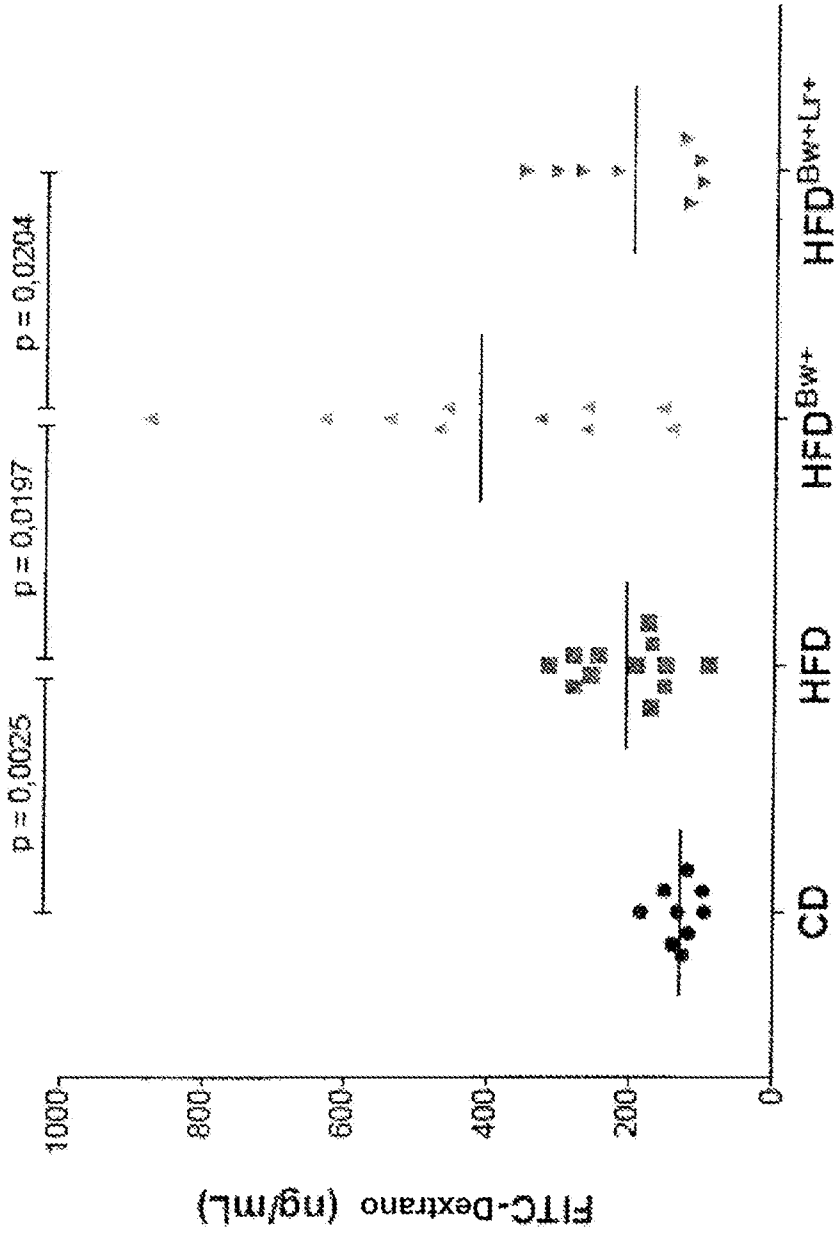


FIGURA 19

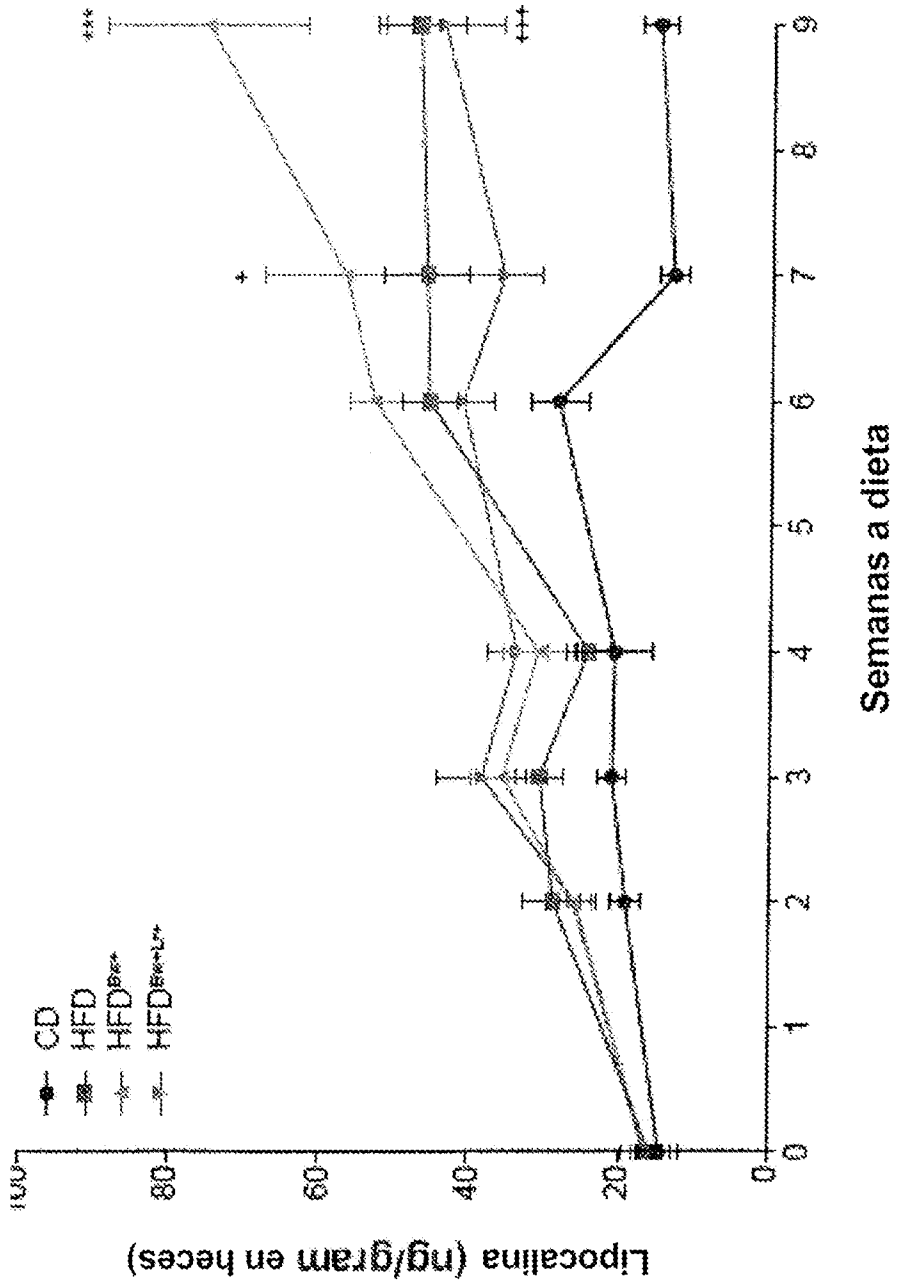


FIGURA 20

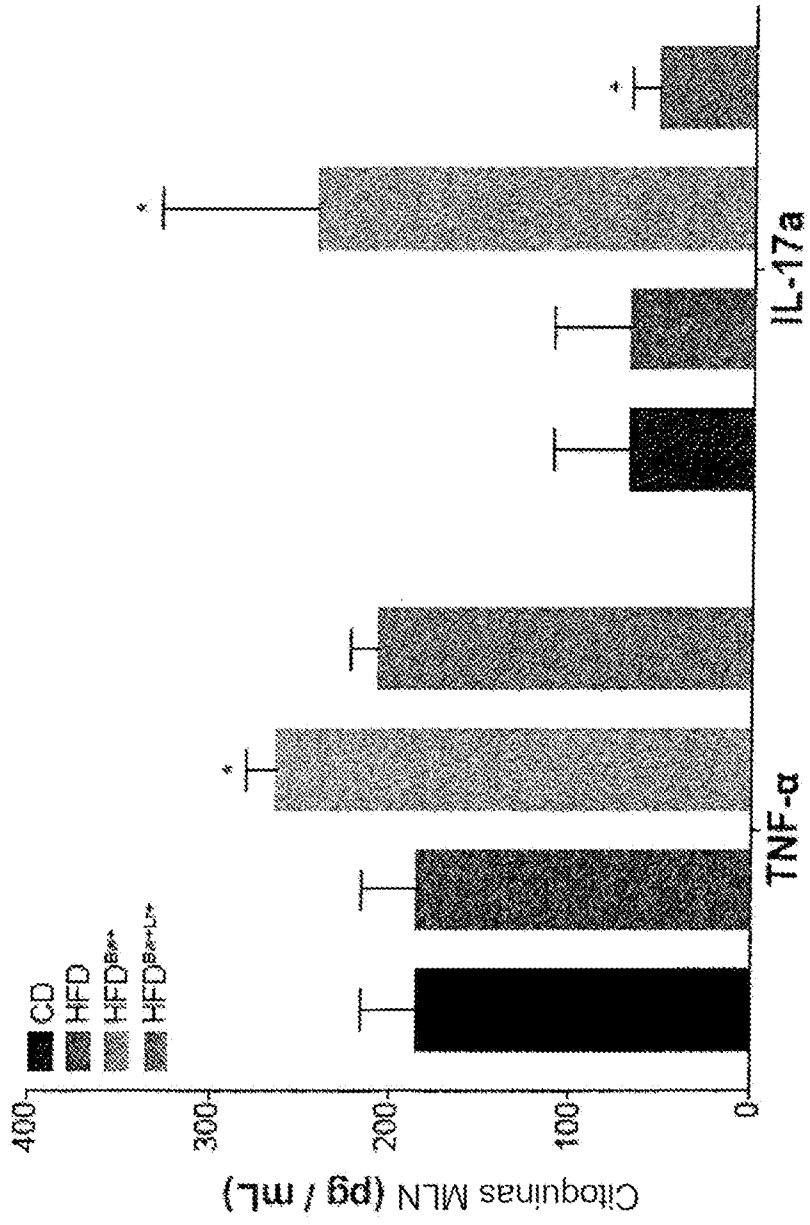


FIGURA 21

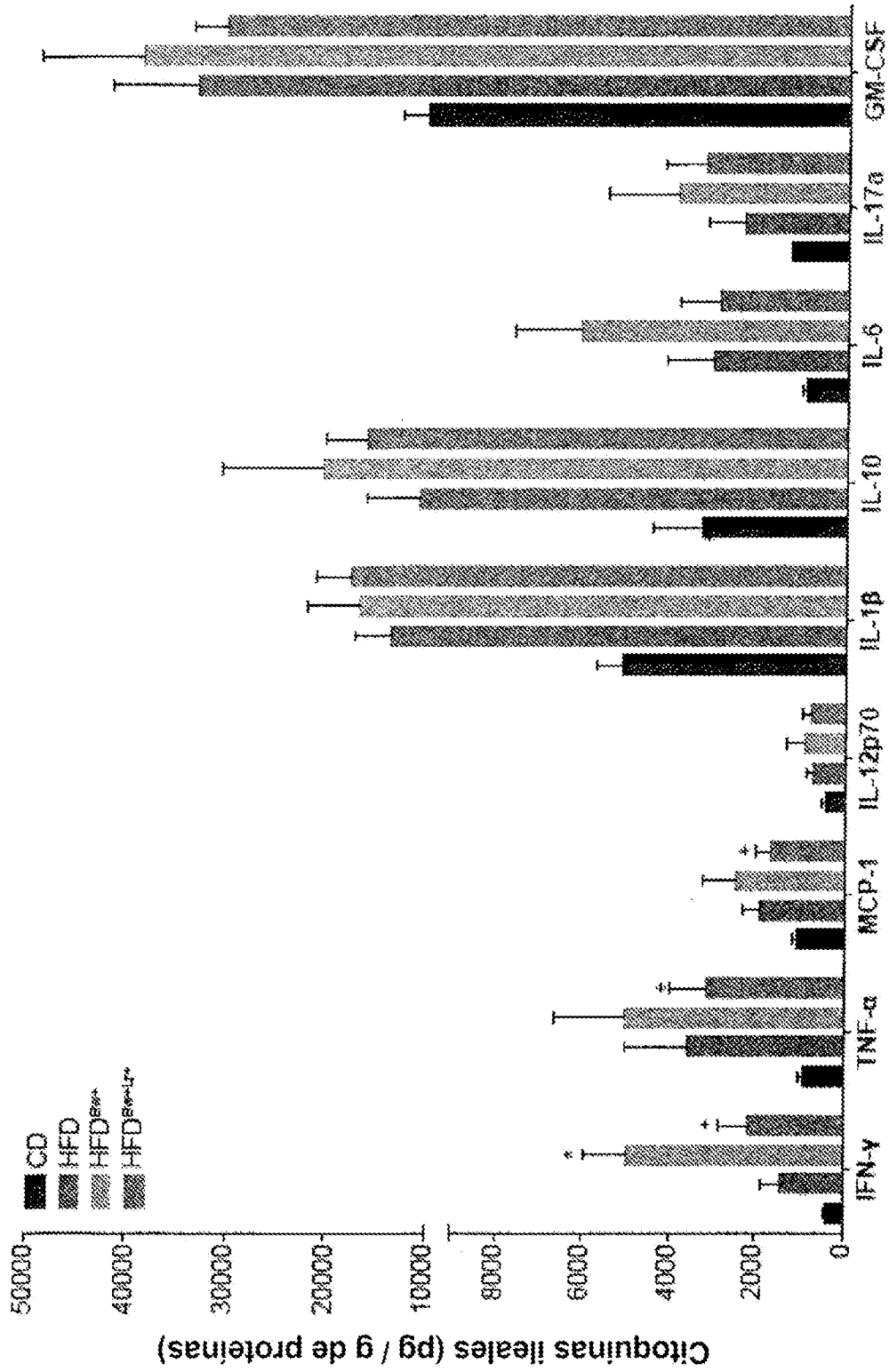


FIGURA 22

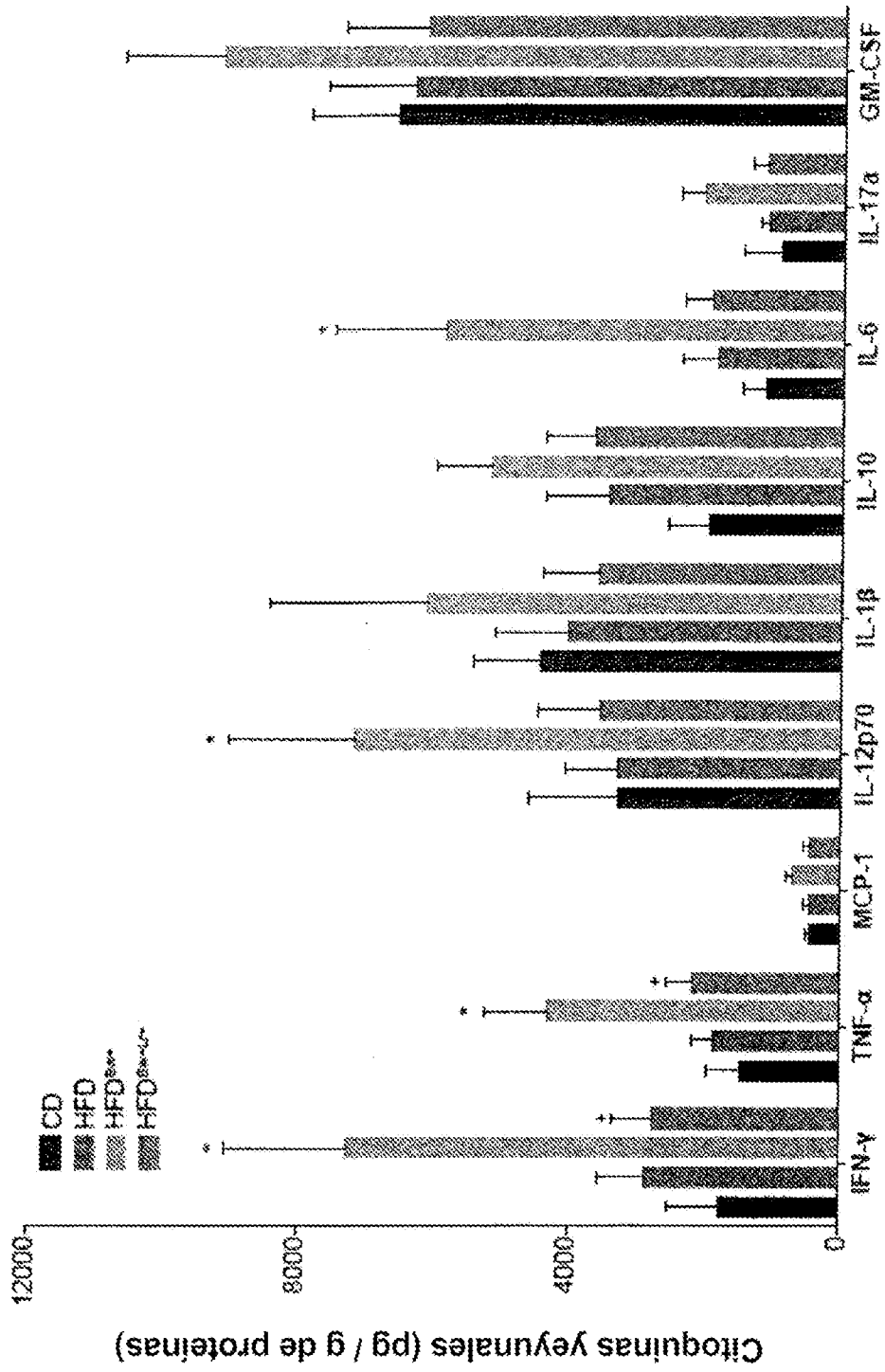


FIGURA 23

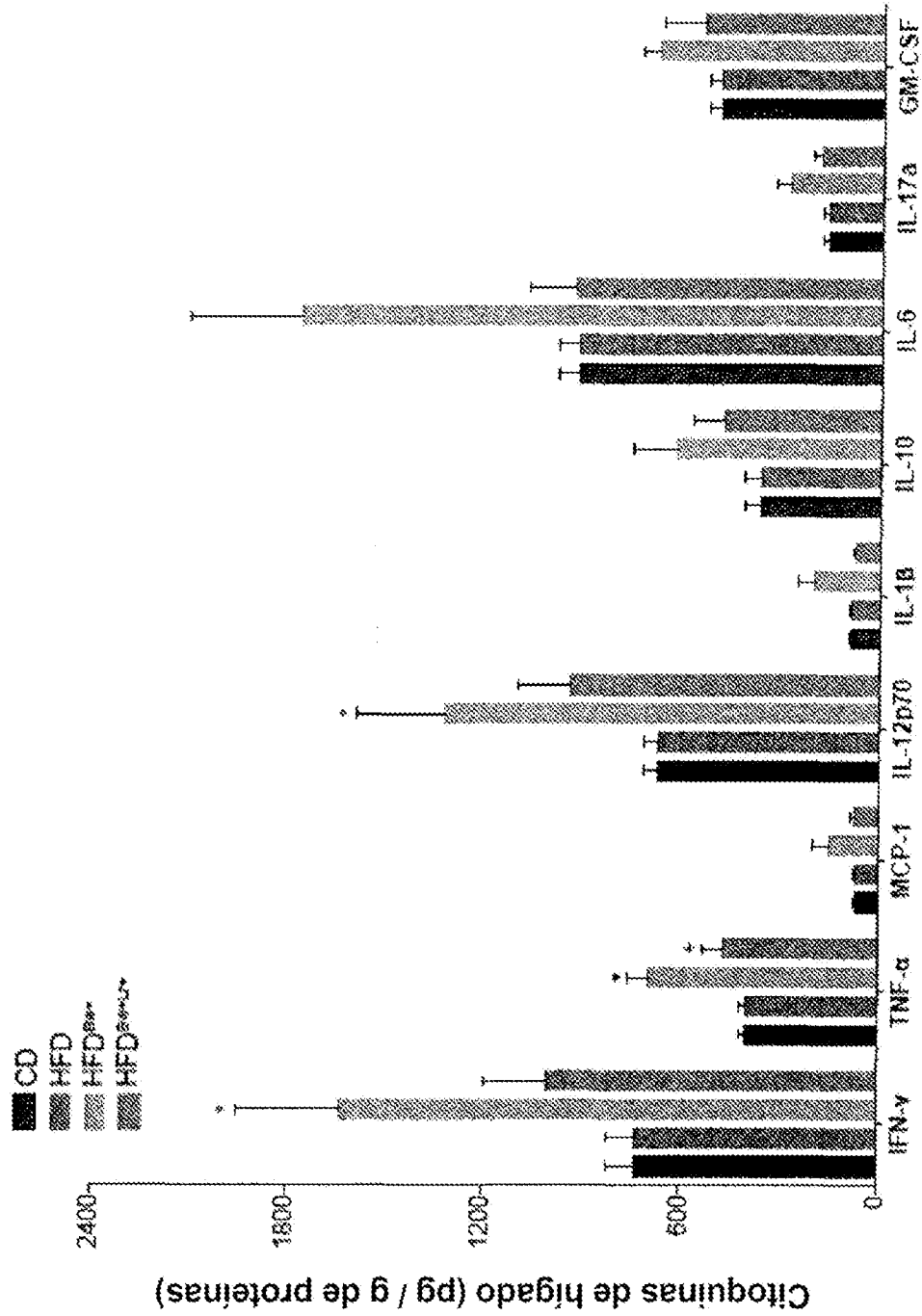


FIGURA 24

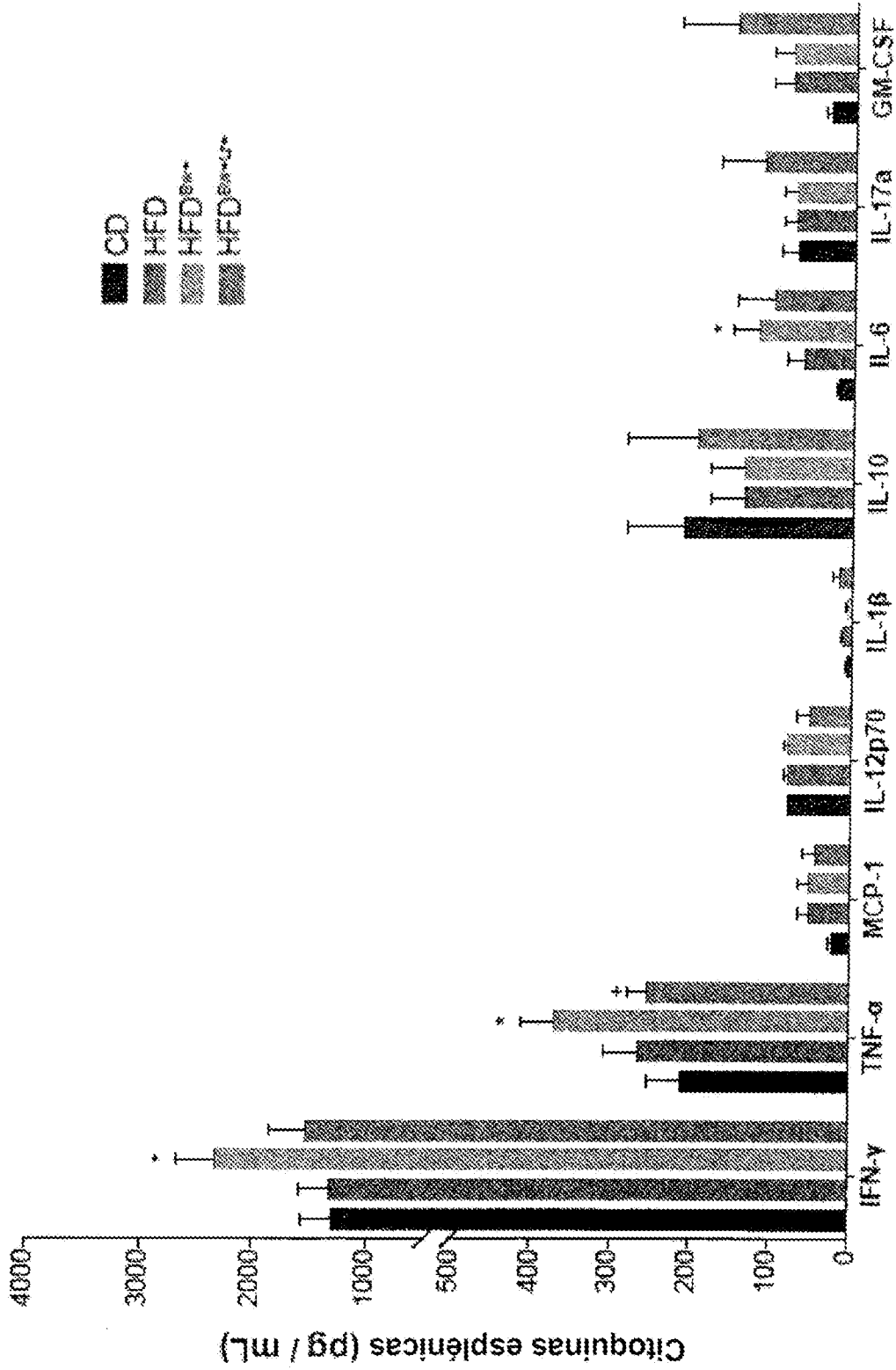


FIGURA 25

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 2010028449 A1
- US 2015297646 A1

Literatura no patente citada en la descripción

- **ODAMAKI et al.** *Beneficial Microbes*, 2016, vol. 7, 473-484
- **CHENG-CHIH et al.** *The Scientific World Journal*, 2014, 1-10
- **NI et al.** *Journal of Applied Microbiology*, 2017, vol. 122 (3), 770-784
- **STACKEBRANDT ; GOEBEL.** *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, vol. 44, 846-849