

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 821 386**

51 Int. Cl.:

A61K 36/064 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/08 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2014 PCT/EP2014/074109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2015 WO15067788**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2014 E 14808522 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3065749**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende *Saccharomyces boulardii* para la reducción de la masa adiposa**

30 Prioridad:

08.11.2013 EP 13306537

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2021

73 Titular/es:

**BIOCODEX (100.0%)
7, avenue Gallieni
94250 Gentilly, FR**

72 Inventor/es:

**CANI, PATRICE D.;
EVERARD, AMANDINE;
GEURTS, LUCIE;
FARGIER, EMILIE;
VERLEYE, MARC y
LE GUERN, MARIE-EMMANUELLE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 821 386 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

Composición farmacéutica que comprende *Saccharomyces boulardii* para la reducción de la masa adiposa

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica útil para reducir la masa adiposa, principalmente en individuos que presentan un exceso de masa adiposa.

Antecedentes de la técnica

El exceso de masa adiposa aumenta constantemente en la población general. Así, la proporción de personas con sobrepeso u obesas, definidas respectivamente por un índice de masa corporal (IMC) superior a 25 kg/m² y a 30 kg/m² aumentó en Francia del 36,7% al 41,6% entre 1997 y 2003. Además, la prevalencia de la obesidad fue allí del 14,5% en 2009. Además, el exceso de masa adiposa es un factor de riesgo para numerosos trastornos patológicos, incluidos principalmente los accidentes cardiovasculares, lo que hace aún más urgente su tratamiento terapéutico.

Si los ejes principales de la lucha contra esta epidemia siguen siendo la mejora de la alimentación y el aumento del esfuerzo físico de los individuos que presentan un exceso de masa adiposa, también se exploran otros procedimientos, principalmente quirúrgicos y medicinales.

Los procedimientos medicinales actuales se refieren principalmente a reducir los aportes energéticos, por ejemplo, limitando la absorción intestinal de lípidos (orlistat) o disminuyendo el apetito, ya sea favoreciendo la sensación de saciedad (sibutramina) o disminuyendo el placer asociado a la ingesta de alimentos (rimonabant).

Sin embargo, la eficacia limitada de estos métodos o sus efectos secundarios - así se ha descrito que el rimonabant podía provocar trastornos depresivos graves - condujo principalmente a la retirada del mercado de sibutramina y rimonabant, dejando opciones terapéuticas muy limitadas y haciendo necesarias la exploración de otras vías.

Saccharomyces boulardii (Ultra-Levure®) es una cepa particular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este probiótico está indicado principalmente como complemento de la rehidratación para el tratamiento de diarreas. Su utilidad se ha establecido principalmente en niños (Villarruel *et al.* (2007) *Acta Paediatr* **96**:538-541; Szajewska *et al.* (2007) *Aliment Pharmacol Ther* **25**:257-264) y para las diarreas asociadas a la toma de antibióticos (Surawicz *et al.* (1989) *Gastroenterology* **96**:981-988; Kotowska *et al.* (2005) *Aliment Pharmacol Ther* **21**:583-590) o a las infecciones por *Clostridium difficile* (Surawicz *et al.* (2000) *Clin Infect Dis* **31**:1012-1017). Además, se ha demostrado que *Saccharomyces boulardii* permitía prevenir o tratar la pérdida de peso en individuos que padecían enfermedades inflamatorias crónicas del intestino y que este efecto es diferente de sus efectos antidiarreicos (EP 1693064 B1).

Sumario de la invención

La presente invención surge de la evidencia inesperada de que la administración de *Saccharomyces boulardii* a ratones obesos permitía disminuir la masa adiposa de estos ratones.

Por tanto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como sustancia activa, células de levadura *Saccharomyces boulardii*, para su utilización en la reducción de la masa adiposa en un individuo obeso.

La presente invención se refiere igualmente a células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su utilización en la reducción de la masa adiposa en un individuo obeso.

La presente invención se refiere igualmente a la utilización no terapéutica de células de levadura *Saccharomyces boulardii* para reducir la masa adiposa de un sujeto que no presenta exceso de masa adiposa o para reducir la masa corporal de un sujeto que no presenta sobrepeso ni obesidad.

En un modo de realización particular de la composición farmacéutica definida anteriormente, de las células de levadura para su utilización definida anteriormente y de la utilización definida anteriormente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* no se asocian ni combinan con superóxido-dismutasa (SOD) ni/o con un probiótico, en particular del género *Lactobacillus* y más particularmente de la especie *Lactobacillus rhamnosus*. Además, en un modo de realización particular de la composición farmacéutica definida anteriormente, de las células de levadura para su utilización definida anteriormente y de la utilización definida anteriormente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* no están enriquecidas en selenio.

Descripción detallada de la invención

Individuo/Sujeto

El individuo o sujeto según la invención es un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano, en particular un hombre, una mujer o un niño.

Como se entiende en la presente memoria, la masa adiposa o masa grasa o incluso masa grasienta representa la masa de la totalidad de los tejidos adiposos blancos del organismo del individuo o del sujeto. La masa corporal del individuo o del sujeto según la invención se puede determinar utilizando una báscula.

Además, se prefiere que el individuo presente un exceso de masa adiposa, principalmente con relación a su estatura. Este exceso de masa adiposa se caracteriza con relación al valor normal y puede ser evaluado por numerosos métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, principalmente por resonancia magnética nuclear (RMN), calculando el índice de masa corporal (IMC) del individuo (peso corporal expresado en kg con relación al cuadrado de la altura expresada en metros) o incluso midiendo el perímetro abdominal del individuo.

Por tanto, se prefiere en particular que el individuo según la invención tenga sobrepeso o sea obeso. Según una definición habitual, un individuo humano se considera con sobrepeso si su IMC es superior o igual a 25 kg/m² e inferior a 30 kg/m² y se dirá que el individuo es obeso si su IMC es superior o igual a 30 kg/m². El individuo según la invención puede presentar principalmente una obesidad grave, caracterizada en particular en el ser humano por un IMC superior o igual a 35 kg/m².

Más generalmente, se prefiere que el individuo según la invención sea un ser humano y presente un IMC superior o igual a 25 kg/m², 26 kg/m², 27 kg/m², 28 kg/m², 29 kg/m², 30 kg/m², 31 kg/m², 32 kg/m², 33 kg/m², 34 kg/m², 35 kg/m² o 40 kg/m².

Además, el individuo según la invención puede presentar igualmente una obesidad abdominal, que corresponde en particular a un exceso de tejido adiposo visceral. Según una definición habitual, un individuo humano masculino presenta una obesidad abdominal si el perímetro abdominal es superior o igual a 94 cm, en particular superior a 102 cm y un individuo humano femenino presenta una obesidad abdominal si el perímetro abdominal es superior o igual a 80 cm, en particular superior a 88 cm. La medida del perímetro abdominal es bien conocida por los expertos en la técnica: por tanto, se mide preferiblemente en un individuo de pie y con una expiración suave alrededor del abdomen a media distancia entre la última costilla flotante y la parte superior de la cresta ilíaca.

Principalmente se prefiere que el individuo según la invención sea un hombre y presente un perímetro abdominal superior o igual a 90 cm, 91 cm, 92 cm, 93 cm, 94 cm, 95 cm, 96 cm, 97 cm, 98 cm, 99 cm, 100 cm, 101 cm o 102 cm. También se prefiere que el individuo según la invención sea una mujer y presente un perímetro abdominal superior o igual a 75 cm, 76 cm, 77 cm, 78 cm, 79 cm, 80 cm, 81 cm, 82 cm, 83 cm, 84 cm, 85 cm, 86 cm, 87 cm u 88 cm.

Se prefiere igualmente que cuando el individuo según la invención presente un exceso de masa adiposa, que puede manifestarse por un sobrepeso o una obesidad, principalmente abdominal, este exceso de masa adiposa sea establecido, es decir que esté presente al inicio del tratamiento con las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención.

Se prefiere además que el individuo según la invención padezca una diabetes tipo 2 y/o un síndrome metabólico.

Se prefiere también que el individuo según la invención presente además una esteatosis hepática que las células de levadura *Saccharomyces boulardii* permiten tratar. Asimismo, se prefiere que el individuo según la invención presente además una inflamación hepática y/o sistémica que las células de levadura *Saccharomyces boulardii* permiten tratar.

Adicionalmente, se prefiere que la administración según la invención de células de levadura *Saccharomyces boulardii* al individuo según la invención no modifique significativamente la cantidad total de bacterias presentes en el intestino del individuo. Esta cantidad se puede evaluar principalmente cuantificando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de heces del individuo.

Además, se prefiere, según la invención, que las células de *Saccharomyces boulardii* permitan reducir o disminuir la masa corporal del individuo según la invención, principalmente cuando el individuo según la invención tiene sobrepeso o es obeso.

Utilización no terapéutica

En el marco de la utilización no terapéutica de células de levadura *Saccharomyces boulardii* para reducir la masa adiposa de un sujeto según la invención, este no presenta exceso de masa adiposa, es decir que el sujeto no presenta patologías asociadas a un exceso de masa adiposa o no se considera que tenga riesgo de desarrollar tales patologías. Asimismo, en el marco de la utilización no terapéutica de células de levadura *Saccharomyces boulardii* para reducir la masa corporal de un sujeto según la invención, este no presenta sobrepeso ni obesidad, es decir que el sujeto no presenta patologías asociadas a un sobrepeso o una obesidad o no se considera que tenga riesgo de desarrollar tales patologías. Así, la reducción de la masa adiposa o masa corporal del sujeto no está asociada a una mejora de su estado de salud y no tiene ninguna virtud profiláctica. La utilización no terapéutica según la invención es entonces comparable a una utilización cosmética. Preferiblemente, el sujeto que no presenta exceso de masa adiposa según la invención o que no presenta sobrepeso ni obesidad según la invención presenta por tanto un IMC

inferior a 25 kg/m² y/o un perímetro abdominal inferior a 90 o 94 cm si se trata de un hombre e inferior a 80 cm si se trata de una mujer.

Células de levadura

Como se usa en esta memoria, la expresión «células de levadura» incluye células de levadura viables o muertas, enteras o en forma de residuos. Preferiblemente, al menos una parte de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención son viables, principalmente viables y cultivables, y más preferiblemente una mayoría de las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención son viables, principalmente viables y cultivables. Preferiblemente las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención no están en forma hidrolizada. También preferiblemente, la expresión «células de levadura» no se refiere a una composición de paredes celulares de levadura.

La viabilidad de una célula de levadura se puede determinar principalmente por tinción con azul de metileno y observación microscópica. El número de células viables y cultivables, lo que define la vitalidad, se puede estimar determinando el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) incluidas en la muestra.

Como ejemplo, el número de UFC de células de levadura de una muestra líquida que comprende levaduras se puede determinar extendiendo un volumen determinado de la muestra sobre un medio sólido, por ejemplo agar-agar, permitiendo el crecimiento de las levaduras e incubando el medio sólido durante un período, por ejemplo 48 h, y a una temperatura, por ejemplo 30°C, lo que permite el crecimiento de colonias de levadura. El número de colonias con relación al volumen extendido sobre el medio sólido permite determinar el número de UFC incluido en la muestra. Un protocolo detallado para la determinación de las UFC de acuerdo con la invención está descrito principalmente en Toothaker & Elmer (1984) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 26:552-556 en el párrafo «Assay for *S. boulardii*». Además, cuando la muestra de levadura está presente en forma de un sólido, por ejemplo un polvo liofilizado, se prefiere determinar el número de UFC incluido en la muestra después de haber puesto una masa determinada de la muestra en una solución acuosa, principalmente agua destilada o una solución de 0,9% de NaCl a pH 7.

Así, preferiblemente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención son del orden de 10⁸ UFC/g a 10¹² UFC/g, más preferiblemente del orden de 2.10⁹ UFC/g a 2.10¹¹ UFC/g.

Una «levadura» según la invención es un hongo preferiblemente unicelular. Las células de levadura según la invención son de la especie *Saccharomyces boulardii*. *Saccharomyces boulardii* es bien conocida por los expertos en la técnica y está descrita principalmente por Hennequin *et al.* (2001) *J. Clin. Microbiol.* 39:551-559.

En particular preferiblemente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se obtienen a partir de medicamentos de las marcas Ultra-Levure®, Bioflor®, Codex®, Econorm®, Enflor®, Enterol®, Florastor®, Floratil®, Florestor®, Inteflora®, Perenterol®, Perenteryl®, Precosa®, Reflor®, Ultra-Levura®, o a partir de depósitos efectuados en la *American Type Culture Collection* (ATCC, EE. UU.) con la referencia 74012 o en la *Collection Nationale de Culture et de Microorganismes* (CNCM, Francia) con la referencia I-745.

Preferiblemente, también células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención están liofilizadas, tales como las células de levadura *Saccharomyces boulardii* de las marcas Ultra-Levure®, Bioflor®, Codex®, Econorm®, Enflor®, Enterol®, Florastor®, Floratil®, Florestor®, Inteflora®, Perenterol®, Perenteryl®, Precosa®, Reflor® o Ultra-Levura®.

Ventajosamente, la viabilidad y vitalidad de las células de levadura obtenidas a partir de liofilizados son superiores a las que se pueden obtener a partir de otros modos de conservación de las células de levadura.

Como se entiende en la presente memoria, la «liofilización» es un método de conservación en el que las células de levadura se congelan y luego se someten a una sublimación del agua congelada que contienen para dar un liofilizado en forma de un polvo de levadura seco que contenga preferiblemente menos del 2% de agua y más preferiblemente menos del 1% de agua. Preferiblemente, las células de levadura liofilizadas se obtienen a partir de concentrados de células de levadura. Se puede utilizar cualquier tipo de método de liofilización de células de levadura conocido por los expertos en la técnica. Sin embargo, las células de levadura se liofilizan preferiblemente según la invención usando el siguiente método de liofilización:

- cultivar las células de levadura en un medio nutritivo líquido hasta que las células alcancen una fase estacionaria;
- concentrar las células de levadura cultivadas y congelar el concentrado;
- liofilizar el concentrado.

Preferiblemente las células de levadura *Saccharomyces boulardii* se administran por vía oral. Por tanto, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención están preferiblemente en forma de cápsulas de gelatina o de sobres.

También preferiblemente, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* según la invención se administran en una dosis de 2,5.10⁶ a 5.10¹² UFC/kg/día o en una dosis de 0,00125 g/kg/día a 25 g/kg/día.

Además, la composición farmacéutica tal como se ha definido anteriormente comprende preferiblemente una dosis de 50 mg a 1000 mg, principalmente de 50 mg a 250 mg, de células de levadura *Saccharomyces boulardii*. Además, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su utilización tal como se ha definido anteriormente, o cuando se utilizan de forma no terapéutica como se ha definido anteriormente, se administran preferiblemente en una dosis unitaria de 50 mg a 1000 mg, principalmente de 50 mg a 250 mg.

Como comprenderán los expertos en la técnica, cuando la cantidad de células de levadura que se ha de administrar se expresa en unidades en masa (mg o g), las células de levadura están preferiblemente en forma liofilizada.

Además, las células de levadura *Saccharomyces boulardii* se pueden asociar o combinar con uno o varios vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Descripción de las figuras

Figura 1A, Figura 1B, Figura 1C, Figura 1D y Figura 1E

Las figuras 1A-1E representan respectivamente el peso corporal, la masa grasa total (medida por resonancia magnética nuclear), la masa grasa mesentérica, la masa grasa epididimal y la masa grasa subcutánea expresada en gramos (g) de ratones obesos diabéticos de control (columnas blancas, db-CT) o que han recibido una administración oral de células de levadura *Saccharomyces boulardii* (columnas negras, db-Sb). El símbolo * representa una diferencia significativa ($P < 0,05$) de los ratones tratados con respecto a los ratones de control.

Figura 2

La figura 2 representa el peso del hígado expresado en gramos (g) de ratones obesos diabéticos de control (columnas blancas, db-CT) o que han recibido una administración oral de células de levadura *Saccharomyces boulardii* (columnas negras, db-Sb). El símbolo * representa una diferencia significativa ($P < 0,05$) de los ratones tratados con respecto a los ratones de control.

Figura 3A, Figura 3B, Figura 3C y Figura 3D

Las Figuras 3A-3D representan respectivamente la cantidad de ARNm de CD11c, MCP-1, IL-1 β y F4/80 en el hígado de ratones obesos diabéticos de control (columnas blancas, db-CT) o que han recibido una administración oral de células de levadura *Saccharomyces boulardii* (columnas negras, db-Sb). El símbolo * representa una diferencia significativa ($P < 0,05$) de los ratones tratados con respecto a los ratones de control.

Figura 4

La figura 4 representa la masa lipídica contenida en el hígado (expresada en mg de hígado completo) de ratones obesos diabéticos de control (columnas blancas, db-CT) o que han recibido una administración oral de células de levadura *Saccharomyces boulardii* (columnas negras, db-Sb). El símbolo * representa una diferencia significativa ($P < 0,05$) de los ratones tratados con respecto a los ratones de control.

Figuras 5A, 5B y 5C

Las Figuras 5A-5C representan respectivamente la cantidad plasmática de IL-6, IL-1 β y TNF- α de ratones obesos diabéticos de control (columnas blancas, db-CT) o que han recibido una administración oral de células de levadura *Saccharomyces boulardii* (columnas negras, db-Sb). El símbolo * representa una diferencia significativa ($P < 0,05$) de los ratones tratados con respecto a los ratones de control.

Figura 6

La figura 6 representa la cantidad de ARNm de CD11c en el colon de ratones obesos diabéticos de control (columnas blancas, db-CT) o que han recibido una administración oral de células de levadura *Saccharomyces boulardii* (columnas negras, db-Sb). El símbolo * representa una diferencia significativa ($P < 0,05$) de los ratones tratados con respecto a los ratones de control.

Figuras 7A, 7B, 7C, 7D, 7E y 7F

Las figuras 7A-7F representan respectivamente la cantidad de bacterias totales y de bacterias *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Roseburia* spp, *Lactobacillus* spp. y *Akkermansia muciniphila*, en el ciego de ratones obesos diabéticos de control (columnas blancas, db-CT) o que han recibido una administrados oral de células de levadura *Saccharomyces boulardii* (columnas negras, db-Sb) expresada en log₁₀ de la cantidad de bacterias por gramo de contenido cecal. El símbolo * representa una diferencia significativa ($P < 0,05$) de los ratones tratados con respecto a los ratones de control.

Ejemplo

1. Protocolo experimental

30 ratones genéticamente obesos y diabéticos de tipo 2 db/db (BKS.Cg-Dock7m +/-Lep db/J) (Charles River) de 6 semanas recibieron diariamente, por sonda oral, la levadura *Saccharomyces boulardii* (Ultralevure, Biocodex) (3 g/kg) (db-Sb) o el vehículo (NaCl 0,9%) (db-CT) (n = 15 ratones/grupo).

5 Durante el experimento se evaluaron diferentes parámetros:

a) El peso corporal.

b) El peso de diferentes tejidos y órganos después de la toma de muestras: hígado, colon y diferentes tejidos adiposos (visceral (mesentérico), epididimal y subcutáneo).

10 Las tomas de muestras de tejidos se efectuaron al final del experimento, luego se dejaron los ratones en ayunas 5 horas antes del sacrificio. Los ratones se anestesiaron primero con isoflurano (Isoba, Schering-Plough Animal Health, Uxbridge, Middlesex, Reino Unido), luego se extrajo sangre de la vena cava y de la vena porta, y finalmente fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extirparon diferentes tejidos y órganos: hígado, colon y diferentes tejidos adiposos (visceral (mesentérico), epididimal y subcutáneo).

c) La masa grasa.

15 La masa grasa se midió al final del experimento por RMN (*time-domain* resonancia magnética nuclear (TD-RMN) (Bruker Minispec mq 7.5 NMR Analyzer, The Bruker Corporation, Billerica, MA, EE. UU.).

d) Se analizaron varios órganos (por qPCR) con el fin de estudiar diferentes marcadores de la inflamación e infiltración de macrófagos (CD11c, IL-1 β , F4/80, MCP-1).

20 Para el colon, el tejido adiposo subcutáneo y el tejido adiposo mesentérico, una parte del tejido u órgano en cuestión se sumergió en una solución de *RNA later* (Applied Biosystems, California, EE. UU.) durante 1 semana a 4°C para preservar la calidad del ARN. Después de este tratamiento, los tejidos y órganos se conservaron a -80°C. El resto de tejidos y órganos se congeló en nitrógeno líquido para ser conservado finalmente en un congelador a -80°C.

25 El ARN de los tejidos se extrajo con ayuda de una solución de tripure (Tripure Isolation Reagent, Roche, Mannheim, Suiza) después de homogeneización usando un *Tissue Lyser* (Qiagen, Hilden, Alemania) a 30 Hz durante 4 minutos. Una centrifugación durante 10 minutos a 4°C y a 12.000 g permitió eliminar los residuos de tejido. La integridad del ARN extraído así como su concentración se midieron en un bioanalizador gracias al kit *RNA 6000 Nano* (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.). La integridad de los ARN extraídos de tejidos y órganos se midió utilizando el RIN (*RNA Integrity Number*). A continuación, se realizó una transcripción inversa a partir de 1 μ g del ARN extraído. (Reverse Transcription System, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE. UU.). Se realizaron PCR

30 cuantitativas utilizando el kit *MESA FAST qPCR SYBR Green* (Eurogentec, Seraing, Bélgica) en microplacas. Las microplacas se analizaron en tiempo real utilizando un aparato qPCR de la marca StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.). A continuación se relacionaron las cantidades de amplicones de diferentes genes marcadores de la inflamación y de la infiltración de macrófagos (CD11c, IL1 β , F4/80, MCP-1) con las cantidades de amplicones de un gen de control que codifica la proteína ribosómica L19 o RPL19.

35 e) El contenido de lípidos totales del hígado.

El contenido de lípidos totales del hígado se cuantificó por gravimetría después de la extracción de los lípidos por el método de Folch (Folch *et al.* (1957) *J. Biol. Chem.* **226**:497) utilizando una solución que contenía cloroformo y metanol en una proporción de 2 por 1 (solución de Folch).

40 f) La microbiota intestinal se analizó por qPCR después de la extracción del ADN (*QIAamp-DNA stool mini-kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) para los siguientes taxones:

a. Bacterias totales.

b. *Bifidobacterium* spp.

c. *Lactobacillus* spp.

d. *Bacteroides/Prevotella* spp.

45 e. *Akkermansia muciniphila*.

f. *Roseburia* spp.

Cada taxón se cuantificó sobre la base de una línea de calibración que contenía una cantidad precisa de ADN y que correspondía a un número de células cultivadas y cuantificadas.

50 g) La medición de la concentración plasmática de las citoquinas IL-1 β , TNF α e IL-6 se realizó utilizando tecnología de Luminex (BioPlex 200, BioRad) con ayuda de un kit sintetizado a demanda por la sociedad Millipore (Milliplex, Millipore, Bélgica).

El análisis estadístico de los datos se realizó con ayuda de una prueba de Student, con un umbral de significancia de $P < 0,05$.

2. Resultados

2.1. Peso corporal, masa grasa medida por RMN y peso de diferentes tejidos adiposos

- 5 El tratamiento con *S. boulardii* disminuye significativamente el peso corporal (Figura 1A), la acumulación de grasa medida por resonancia magnética nuclear (Figura 1B) y los tejidos adiposos blancos (Figuras 1C, 1D, 1E).

2.2. Peso de los órganos extraídos

El tratamiento con *S. boulardii* disminuye significativamente el peso del hígado (-15%) (Figura 2).

2.3. Marcadores de la inflamación del hígado

- 10 El tratamiento con *S. boulardii* disminuye significativamente la infiltración de macrófagos, ilustrada por una disminución en el nivel de expresión de los ARNm de marcadores de infiltración y reclutamiento de los macrófagos CD11c, MCP-1, F4/80 (Figuras 3A, 3B y 3D) y la inflamación hepática, ilustrada por una disminución del nivel de expresión del ARNm de la cadena β de la citoquina inflamatoria IL-1 (Figura 3C).

2.4. Contenido lipídico del hígado

- 15 El tratamiento con *S. boulardii* disminuye un 30% el contenido de lípidos totales del hígado (Figura 4).

2.5. Citoquinas circulantes

- Se midieron diferentes citoquinas plasmáticas en el plasma de la vena cava utilizando tecnología de Luminex. El tratamiento con *S. boulardii* indujo una modificación significativa de los parámetros inmunitarios circulantes. En efecto, los niveles plasmáticos de la interleuquina inflamatoria IL-6 disminuyeron significativamente, además, tendieron a disminuir otras dos citoquinas consideradas «proinflamatorias» (IL-1 β y TNF α).
- 20

2.6. Colon

El tratamiento disminuye significativamente la infiltración de macrófagos en el colon (Figura 6).

2.7. Análisis de la microbiota intestinal

- 25 Se realizó una cuantificación por qPCR de las bacterias totales (Figura 7A) y de los diferentes géneros bacterianos que se sabe que tienen un impacto potencial sobre el metabolismo glucídico, lipídico y la función de barrera del intestino, a saber: *Bifidobacterium* spp. (Figura 7B), *Bacteroides* spp. (Figura 7C), *Roseburia* spp. (Figura 7D), *Lactobacillus* spp. (Figura 7E) y *Akkermansia muciniphila* (Figura 7F).

- La administración de *S. boulardii* no modifica significativamente la cantidad total de bacterias en el intestino. De hecho, no existe una modificación significativa de las bacterias de los diferentes taxones investigados a excepción de *Roseburia* spp. (Figura 7D).
- 30

Esto sugiere que *S. boulardii* ejercería un impacto directo sobre el metabolismo del hospedante y potencialmente no requeriría la intervención de otras bacterias.

Conclusión general

- 35 Los ratones obesos y diabéticos tratados con *S. boulardii* presentan una disminución significativa de la masa grasa (disminuida en aproximadamente 10%). Esta disminución de la masa grasa contribuye a la bajada del peso corporal (~5%). Además, la administración de *S. boulardii* no provoca modificación significativa de la composición de la microbiota intestinal (número total de bacterias en el intestino). Además, la administración de *S. boulardii* se asocia a una disminución significativa del peso del hígado, probablemente explicada por la disminución muy marcada del contenido de lípidos en este órgano (disminución de la esteatosis hepática del 30%). Curiosamente, el conjunto de estos efectos está asociado a una disminución de los marcadores inflamatorios (CD11C, MCP-1, IL-1 β) en el tejido hepático. Esta disminución de la inflamación hepática está asociada igualmente a una disminución de diferentes parámetros inflamatorios sistémicos.
- 40

En conclusión, la administración de *S. boulardii* disminuye significativamente la masa grasa y la esteatosis hepática en ratones obesos y diabéticos de tipo 2 (db/db), así como la inflamación hepática y sistémica.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende, como sustancia activa, células de levadura *Saccharomyces boulardii*, para su utilización para reducir la masa adiposa en un individuo, en el que el individuo es obeso.
- 5 2. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 1, en la que el individuo presenta una obesidad abdominal.
3. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 1 o 2, en la que el individuo padece una diabetes tipo 2.
4. Composición farmacéutica para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el individuo padece un síndrome metabólico.
- 10 5. Composición farmacéutica para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 4, para tratar además una esteatosis hepática del individuo.
6. Composición farmacéutica para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 5, para reducir además una inflamación hepática y/o sistémica del individuo.
- 15 7. Composición farmacéutica para su utilización según una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que las células de levadura están liofilizadas.
8. Células de levadura *Saccharomyces boulardii* para su utilización para reducir la masa adiposa en un individuo, en donde el individuo es tal como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 4.
9. Células de levadura para su utilización según la reivindicación 8, para tratar además una esteatosis hepática del individuo y/o para reducir además una inflamación hepática y/o sistémica del individuo.
- 20 10. Utilización no terapéutica de células de levadura *Saccharomyces boulardii* para reducir la masa adiposa de un sujeto que no presenta exceso de masa adiposa.

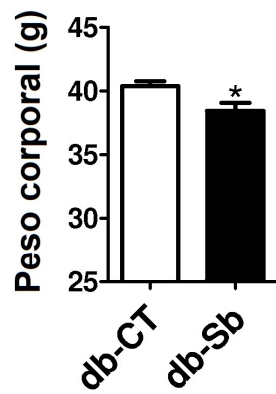


Figura 1A

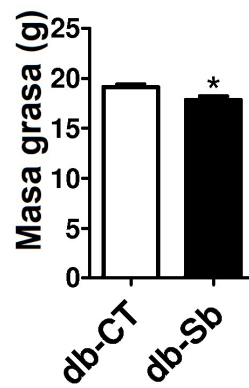


Figura 1B

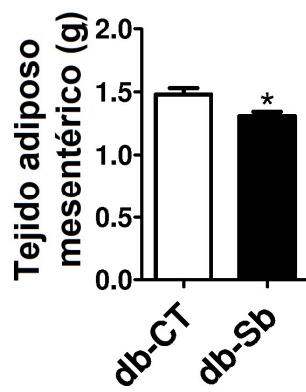


Figura 1C

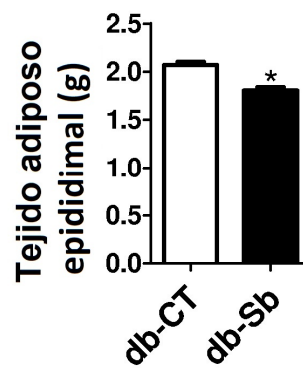


Figura 1D

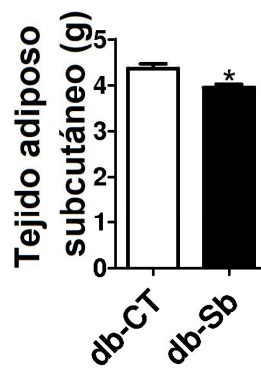


Figura 1E

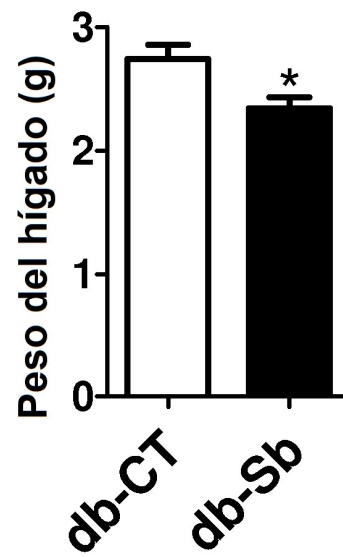


Figura 2

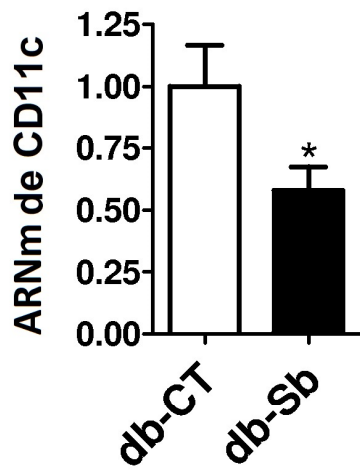


Figura 3A

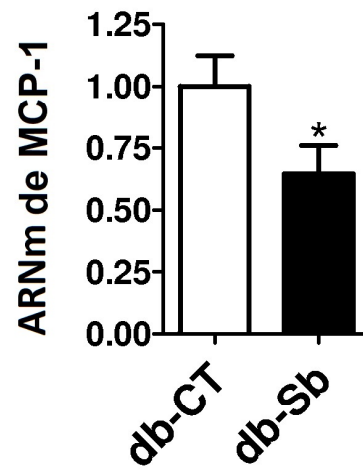


Figura 3B

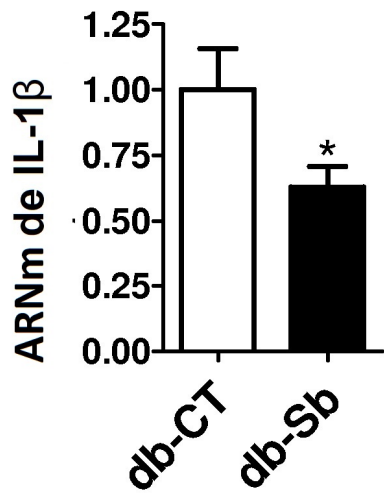


Figura 3C

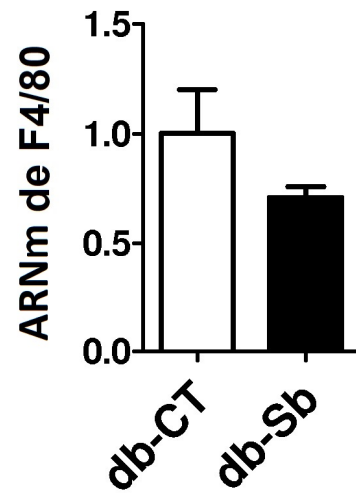


Figura 3d

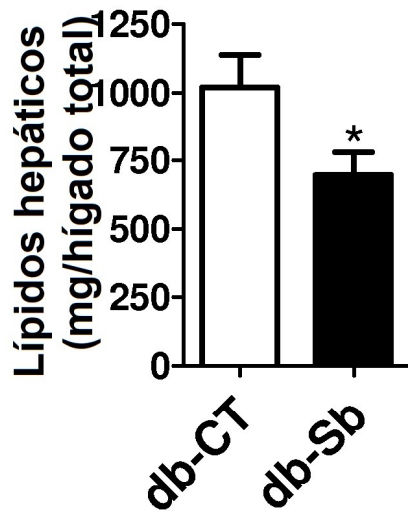


Figura 4

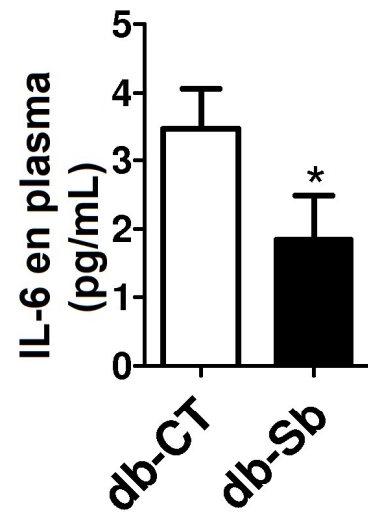


Figura 5A

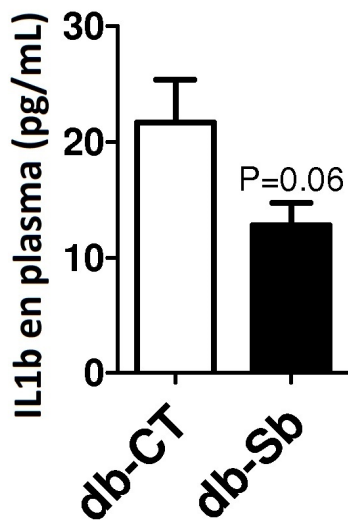


Figura 5B

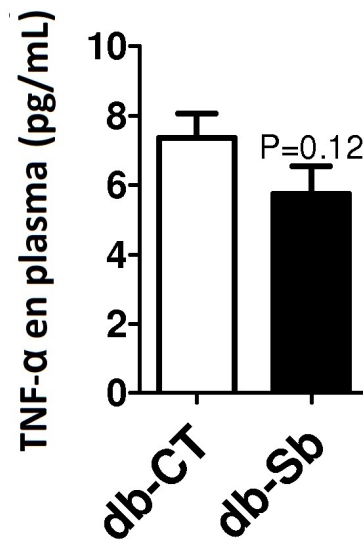


Figura 5C

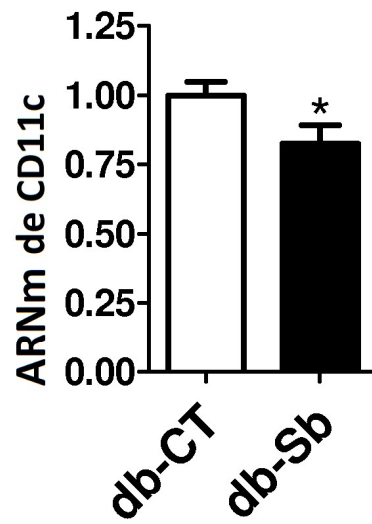


Figura 6

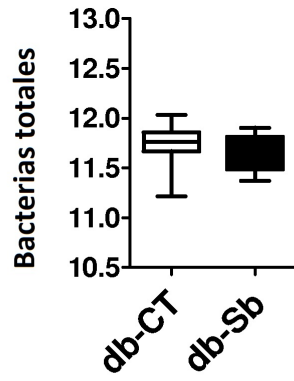


Figura 7A

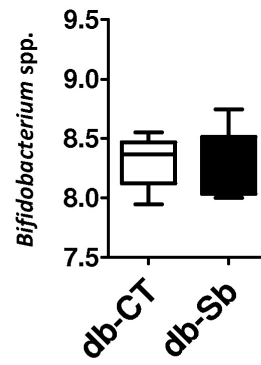


Figura 7B

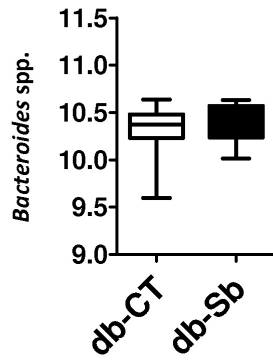


Figura 7C

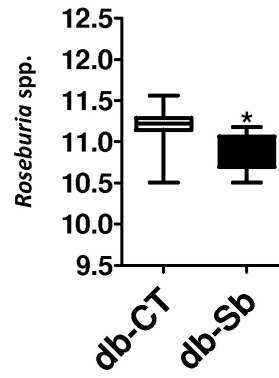


Figura 7D

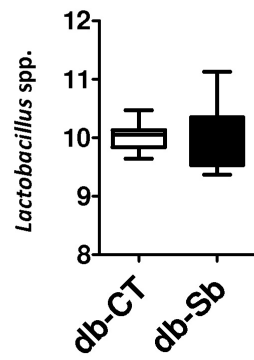


Figura 7E

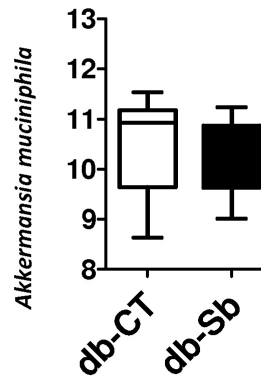


Figura 7F