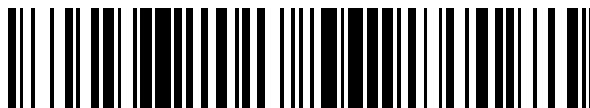


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 828**

21 Número de solicitud: 201431977

51 Int. Cl.:

A61K 35/745 (2015.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 15/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

31.12.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.07.2016

Fecha de concesión:

30.06.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

07.07.2017

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE LEÓN (50.0%)

Avda. de la Facultad, 25

24071 León (León) ES y

BIOPOLIS, S.L. (50.0%)

72 Inventor/es:

ROBLES RODRÍGUEZ, Vanesa ;

GARCÍA VALCARCE, David;

RAMÓN VIDAL, Daniel;

GENOVÉS MARTÍNEZ, Salvador;

MARTORELL GUEROLA, Patricia y

CHENOLL CUADROS, M^a Empar

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Empleo de probióticos en el incremento de la fertilidad masculina**

57 Resumen:

Empleo de probióticos en el incremento de la fertilidad masculina.

La presente invención se refiere al uso de *Lactobacillus rhamnosus* en combinación con *Bifidobacterium longum* en la elaboración de una composición para incrementar la fertilidad masculina en un sujeto. En particular, dichas cepas son las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347. Asimismo, también se describe la composición que comprende dichas cepas *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347.

ES 2 575 828 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

Empleo de probióticos en el incremento de la fertilidad masculina**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende dos cepas de las especies microbianas *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* con capacidad probiótica para incrementar la fertilidad masculina. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la reproducción humana y animal, con aplicaciones tanto en el sector farmacéutico como agroalimentario.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se ingieren en una dosis adecuada confieren un beneficio a la salud del consumidor. Básicamente se han
 15 usado como ingredientes en alimentos funcionales o en suplementos nutricionales, por ello han sido y son de gran interés para las industrias agroalimentaria y farmacéutica, respectivamente. La inmensa mayoría de los probióticos utilizados hasta la fecha suelen ser efectivos a nivel del tracto digestivo e influyen positivamente sobre patologías digestivas como la colitis, el estreñimiento o la inflamación intestinal, entre
 20 otras. Ahora bien, existen casos aislados en la literatura científica que hacen referencia al empleo de probióticos en infecciones vaginales, en problemas de piel o incluso en obesidad o en autismo.

El empleo de probióticos en el campo de la reproducción humana es limitado y se
 25 centra principalmente en el factor femenino y en los casos anteriormente descritos de infecciones vaginales. En este sentido, existen estudios en los que se han utilizado probióticos como terapia en vaginosis bacterianas, proporcionando resultados positivos en algunos estudios clínicos (Mastromarino *et al.*, 2013. New Microbiol. 36(3): 229-38; Borges *et al.*, 2014. Arch Gynecol Obstet., 289(3): 479-89). Por el
 30 contrario, no se ha descrito el efecto de los probióticos sobre la fertilidad masculina en humanos. En el modelo animal del pez cebra se ha constatado que la ingesta de probióticos incrementa de forma significativa marcadores moleculares asociados a calidad reproductora (Riesco *et al.*, 2013. *Evaluation of a probiotic diet on zebrafish sperm quality markers. 4th International workchop on the biology of Fish Gametes* (Albufeira, Portugal)), pero hasta la fecha no existe ninguna publicación científica que
 35 evalúe el efecto de la ingesta de probióticos sobre parámetros de calidad espermática

en humanos, ni que correlacione la ingesta de dichos suplementos con mejoras en movilidad espermática.

Por otro lado, el efecto antioxidante de las bacterias lácticas y de las bifidobacterias ha sido estudiado pero nunca en relación con la calidad espermática en humanos aunque sí en animales (Riesco *et al.*, 2013 citado *ad supra*). Durante las últimas décadas, se han desarrollado estudios clínicos para establecer los efectos beneficiosos de los tratamientos con antioxidantes en la mejora de los parámetros espermáticos en hombres, así como en los índices de fertilización o embarazo en sus parejas. Los antioxidantes más comúnmente estudiados han sido la vitamina C, la vitamina E, el selenio, el glutatión, el zinc, la N-acetil-cisteína y la L-carnitina (Gharagozloo *et al.*, 2011. Hum Reprod. 26(7): 1628-40; Ko y Sabanegh, 2012. J Androl 33(3): 292-308; Showell *et al.*, 2013. Cochrane Database Syst Rev, 5; 8:CD007807). Algunos de estos estudios evalúan el efecto de estos antioxidantes en ensayos *in vitro* (añadidos como suplementos en la solución de crioprotectores) y concluyen que existe un efecto beneficioso de estos aditivos en la protección del espermatozoide frente a las moléculas oxidativas generadas durante los protocolos de congelación-descongelación (Walczak-Jedrzejowska *et al.*, 2013. Cent European J Urol. 66(1): 60-7). Otros estudios evalúan el efecto de la administración de antioxidantes orales en los parámetros espermáticos. Por ejemplo, en 2010, Ross y colaboradores (Ross *et al.*, 2010, Reprod Biomed Online, 20(6): 711-23) revisaron los efectos beneficiosos de la ingesta de antioxidantes orales en parámetros espermáticos. La patente española ES2225625 describe una composición para mejorar la calidad del esperma humano que comprende, al menos, una fuente de zinc y, opcionalmente, vitamina B12, magnesio, betaína, colina, SAM, vitamina B2 y vitamina B6. De forma similar, la patente española ES2397657 describe una preparación de combinación para mejorar la calidad del esperma de un individuo, que comprende, como sustancias activas, la L-carnitina, la coenzima Q, la vitamina E, una fuente de zinc, la vitamina B, una fuente de selenio, el glutatión, la L-arginina o las sales o derivados de ellos. Sin embargo, los efectos de estos tratamientos no siempre perduran en el tiempo y no se sabe si disminuyen la fragmentación del ADN espermático; uno de los parámetros más relevantes en la calidad del esperma.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica una necesidad de proporcionar métodos alternativos para incrementar la fertilidad masculina, mejorando la calidad del esperma, que no presenten los inconvenientes antes citados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto que la administración combinada de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y una cepa de *Bifidobacterium longum* proporciona un incremento de la fertilidad masculina. En una realización particular, las cepas son *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347. Tal como se muestra en el Ejemplo 1, la ingesta por parte de los sujetos de estudio de una composición que comprendía la combinación de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y una cepa de *Bifidobacterium longum* produjo un incremento en la motilidad espermática y una reducción de la fragmentación del ADN espermático; dos parámetros clave en la evaluación de la calidad del semen. Así, la ingesta de estas cepas en una combinación probiótica mejora la calidad seminal y, por lo tanto, incrementa la fertilidad masculina. Además, este incremento en la fertilidad se mantiene incluso seis semanas después de haber finalizado la última ingesta, consiguiendo con ello un efecto a largo plazo. Una posible explicación a estos resultados sería que la combinación de la capacidad antioxidante de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 con la capacidad antiinflamatoria de la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 sea la responsable de dicho incremento en la motilidad espermática y de la reducción de la fragmentación del ADN espermático. Por todo ello, la invención aquí descrita permite utilizar cepas bacterianas con propiedades probióticas para abordar terapias a fin de incrementar la fertilidad masculina antes de realizar una técnica de reproducción asistida o de reproducción natural o incluso antes de realizar donaciones espermáticas para futuras inseminaciones.

En base a este descubrimiento, se ha desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán descritos en detalle a continuación.

Uso de la administración combinada de las cepas de las especies *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* para incrementar la fertilidad masculina de un sujeto.

Los inventores de la presente invención han descubierto que la administración combinada de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y una cepa de *Bifidobacterium longum* proporciona un incremento de la fertilidad masculina. No obstante, debido a la extraordinaria capacidad antioxidante de *Lactobacillus rhamnosus*, en particular, *L.*

rhamnosus CECT 8361, en comparación con otras especies de *Lactobacillus*, no puede descartarse la posibilidad del uso de *Lactobacillus rhamnosus* de forma individual en la elaboración de una composición farmacéutica para incrementar la fertilidad masculina. Los autores de la presente invención piensan que la capacidad antioxidante de *Lactobacillus rhamnosus*, en particular de la cepa *L. rhamnosus* CECT 8361, protege a los espermatozoides de las especies reactivas de oxígeno que pueden alterar las membranas de los espermatozoides, la integridad del ADN y la motilidad espermática. Por lo tanto, los inventores piensan que la capacidad antioxidante de la cepa incrementa la calidad seminal; en particular, incrementa la motilidad espermática y disminuye la fragmentación del ADN espermático, lo que, en última instancia, incrementa la fertilidad masculina. Por otro lado, debido a la capacidad antiinflamatoria de *Bifidobacterium longum*, en particular, la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347, en la presente invención también se contempla la posibilidad de emplear *Bifidobacterium longum*, en particular *Bifidobacterium longum* CECT 7347, de forma individual para incrementar la fertilidad masculina. Los autores de la presente invención piensan que la capacidad de *Bifidobacterium longum* CECT 7347 de reducir los niveles del factor inflamatorio TNF- α e incrementar la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 protege a los espermatozoides del estrés oxidativo. Por lo tanto, composiciones que comprenden, al menos, *L. rhamnosus* CECT 8361 o *Bifidobacterium longum* CECT 7347 y su uso en el incremento de la fertilidad masculina de un sujeto también son contempladas en la presente invención.

En un aspecto, la invención se relaciona con el uso de *Lactobacillus rhamnosus* en combinación con *Bifidobacterium longum* en la elaboración de una composición (de aquí en adelante, "composición de la invención") para incrementar la fertilidad masculina en un sujeto.

Lactobacillus rhamnosus es una bacteria usada habitualmente como probiótico, que se encuentra mayoritariamente en el yogur y otros productos lácteos. La clasificación científica de *Lactobacillus rhamnosus* es: Reino: *Bacteria*, División: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Lactobacillales*, Familia: *Lactobacillaceae*, Género: *Lactobacillus*, Especie: *Lactobacillus rhamnosus*. Por otro lado, *Bifidobacterium longum* es una bacteria Gram negativa, catalasa-negativa, con forma redondeada, que se encuentra en el tracto gastrointestinal donde produce ácido láctico. La clasificación científica de *Bifidobacterium longum* es: Reino: *Bacteria*, División: *Firmicutes*, Clase:

Actinobacteria, Orden: *Bifidobacteriales*, Familia: *Bifidobacteriaceae*, Género: *Bifidobacterium*, Especie: *Bifidobacterium longum*.

En la presente invención se entiende por “incrementar la fertilidad masculina” en un sujeto mejorar la calidad del semen de dicho sujeto, lo que conlleva incrementar las probabilidades de fecundar a una hembra y obtener descendencia. Como entiende el experto en la materia, en el contexto de la presente invención, la calidad del semen de un sujeto es mejorada con respecto a la calidad del semen de dicho sujeto antes de haber ingerido las cepas de la invención. La calidad seminal de un sujeto puede medirse por multitud de parámetros tales como, pero sin limitarse a, la motilidad espermática, la viabilidad del espermatozoide, su morfología, la composición de la membrana del espermatozoide, la concentración de espermatozoides, el volumen del eyaculado y la integridad del ADN de los espermatozoides. Hay varios métodos descritos en el estado de la técnica para medir todos estos parámetros y su empleo es práctica de rutina para el experto en la materia. Algunas evalúan la integridad del ADN espermático: el ensayo TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling), el ensayo del análisis de la estructura cromatínica del espermatozoide (SCSA), el ensayo cometa, y el *test* de dispersión de la cromatina espermática (SCD). Otros ensayos identifican defectos en el empaquetamiento de la cromatina espermática: tinción con azul de toluidina, con naranja acridina y cromomicina A. Además, existen diversos marcadores moleculares tales como distintos tipos de ARN (ARNm, microARNs, etc.) que pueden asociarse a una mayor calidad seminal a pesar de no ser realizados de forma rutinaria en clínica.

Por lo tanto, en una realización particular, el incremento de la fertilidad masculina comprende el incremento de la motilidad espermática, de la viabilidad del espermatozoide, de la composición de la membrana del espermatozoide, de la concentración de espermatozoides morfológicamente normales y/o del número total de espermatozoides en el eyaculado, y/o comprende la disminución de la fragmentación del ADN de los espermatozoides y la mejora de la integridad de la cromatina espermática.

Una disminución en la fragmentación del ADN de los espermatozoides evita pérdidas de motilidad, fertilidad y disminuye la probabilidad de alteraciones durante el desarrollo embrionario temprano y en la progenie.

En la presente invención se entiende que la integridad de la cromatina espermática está mejorada cuando el ADN espermático está organizado de forma compacta y estable, consiguiendo un empaquetado del material genético que asegura que el ADN sea entregado en una forma física y química tal, que es capaz de descondensarse en el momento apropiado del proceso de la fertilización y transmitir el ADN sin defectos.

En la presente invención el término “sujeto” es equivalente al término “individuo”; por lo que ambos términos pueden emplearse indistintamente en la presente invención. Se entiende por “sujeto”, además de cualquier individuo, cualquier animal macho perteneciente a cualquier especie que produzca gametos para reproducirse. Ejemplos de sujetos incluyen, sin limitar a, animales de interés comercial tales como peces (truchas, sardinas, carpas, salmones, etc.), aves (gallinas, avestruces, pollos, ocas, perdices, etc.), conejos, liebres, animales domésticos (perros, gatos, etc.), ganado ovino, ganado caprino (cabras, etc.), ganado porcino (jabalíes, cerdos, etc.), ganado equino (caballos, ponis, etc.), ganado vacuno o bovino (toros, bueyes, etc.); animales de interés cinegético, tales como ciervos, venados, renos, etc.; animales de interés ecológico, es decir, animales que están en peligro de extinción o cuyas poblaciones en la naturaleza son escasas como, por ejemplo, tigres blancos, rinocerontes, osos pandas, pumas, lince, etc.; y los seres humanos. No obstante, en una realización particular, el sujeto es un pez o un mamífero, preferiblemente, un mamífero seleccionado del grupo que consiste en un ser humano, un cerdo, un caballo, un conejo, un buey y un toro.

El uso descrito en la presente invención puede aplicarse a cualquier sujeto macho para incrementar su fertilidad, independientemente de que la fertilidad esté disminuida (subfétil) o no (fétil). En los sujetos machos fétiles, el incremento de la fertilidad puede ser interesante para incrementar la capacidad de reproducción. Por otro lado, el incremento de la fertilidad también puede ser interesante por representar, en general, una ventaja para las parejas humanas que deseen tener mayores posibilidades de embarazo. En individuos machos subfétil se puede usar la composición de la invención para tratar dicha subfertilidad, es decir, para mejorar las posibilidades de conseguir con éxito una fecundación.

En otra aplicación ventajosa, la composición de la invención se puede administrar a un individuo macho de una especie de mamíferos y, en particular, a un hombre, sin saber *a priori* si dicho individuo macho es fértil o subfétil. A modo enunciativo, en esta

aplicación se puede administrar la composición de la invención al individuo macho de una pareja cuando la fecundación tarda en realizarse, por ejemplo, para evitar tener que realizar pruebas y/o antes de realizar cualquier prueba. Esto es importante ya que la prueba del esperma es cara y molesta para el individuo en cuestión, porque la especificidad y la sensibilidad de los sistemas de prueba varían y porque puede haber fluctuaciones en la cantidad y/o en la calidad del esperma.

También se pueden utilizar la composición de la invención en individuos machos de parejas que tienen la intención de tener un hijo, es decir para aumentar las posibilidades de fecundación y/o para contrarrestar cualquier problema de fertilidad masculina, de nuevo sin necesidad de realizar pruebas previas.

También se puede usar la composición de la invención para prevenir o contrarrestar a largo plazo los efectos de la fluctuación de la cantidad y la calidad del esperma con respecto a la reproducción.

Por otro lado, también se puede utilizar la composición de manera profiláctica para impedir una disminución de la calidad del esperma en individuos de riesgo o individuos que padecen disfunciones del tracto urogenital, y/u otras disfunciones que pueden tener efectos sobre la calidad del esperma (por ejemplo, en individuos machos que están (o deben ser) sometidos a un tratamiento farmacológico) y durante un tratamiento farmacológico o una radioterapia. Además, las composiciones y/o preparaciones de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, para mejorar la calidad del esperma que puede verse afectada por factores como la malnutrición, factores ambientales, y/o la exposición a sustancias nocivas.

La proporción de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con respecto a la cepa de *Bifidobacterium longum* puede variar en un amplio intervalo. El ratio *Lactobacillus rhamnosus*:*Bifidobacterium longum* en la composición de la invención incluye, sin limitarse a, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10 y 95:05. No obstante, en una realización particular, el ratio *Lactobacillus rhamnosus*:*Bifidobacterium longum* es, aproximadamente, 50:50.

Como entiende el experto en la materia, la composición de la invención puede ir formulada para su administración farmacéutica, es decir, formando parte de otros

5 productos farmacológicos consumidos o ingeridos por el sujeto, o para su administración alimentaria, es decir, formando parte de los alimentos que son consumidos en la dieta por un sujeto. Por lo tanto, en una realización particular, la composición es una composición farmacéutica o una composición nutricional funcional.

10 La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formada, al menos, por las cepas de la invención en cualquier concentración, que, adicionalmente, puede comprender uno o más componentes o compuestos que posean alguna actividad biológica, farmacológica y/o veterinaria; en particular, compuestos que cuando son administrados oralmente a un sujeto puedan ejercer dicha actividad biológica. Estos compuestos adicionales pueden ser uno o más compuestos que se sabe *per se* que presentan, al ser administrados (por vía oral) a un sujeto o individuo macho de una especie, en particular, de una especie de mamíferos, una influencia
15 beneficiosa sobre la fertilidad y/o sobre la calidad del esperma de un individuo macho; y/o pueden ser uno o más componentes que, tras su administración a un sujeto, pueden ulteriormente aumentar, reforzar y/o impulsar la actividad de las cepas de la invención. Como entiende el experto en la materia, los compuestos adicionales deben ser compatibles con las cepas de la invención. Así, en el contexto de la presente
20 invención, dentro del término "composición farmacéutica" también se engloban las composiciones veterinarias.

25 El o los compuestos adicionales pueden ser uno o varios compuestos que garanticen la espermatogénesis o cualquier parte y/o proceso de la espermatogénesis. Algunos ejemplos no limitativos de estos compuestos incluyen, sin limitarse a:

- Magnesio, es decir, en forma de una fuente de magnesio biodisponible como una sal de magnesio biodisponible (por ejemplo, citrato de magnesio);
- Una o mas vitaminas y, en particular, la vitamina B12 y/o la vitamina B2;
- Una fuente apropiada de grupos metilo, como la metionina, la betaína y/o la colina; esta última, por ejemplo, en forma de fosfatidilcolina; o una fuente
30 adecuada de la misma, como la lecitina;
- Un agente de metilación apropiado como la S-adenosil metionina (SAM);
- Una fuente de glucosa;
- o cualquier combinación adecuada de los mismos.

35

Estos componentes adicionales pueden ser también uno o varios compuestos que mejoran los niveles de glutatión (reducido) de los espermatozoides. Un ejemplo no limitativo de este tipo de compuestos es la vitamina B6, que puede estar presente o ser administrada en forma de una piridoxina (estable) o de un derivado de la misma, como el piridoxal o la piridoxamina. La mejoría del estado de glutatión de los espermatozoides es importante con el fin de mejorar la calidad del esperma, incluyendo, aunque no sólo, el aumento de la vida media del espermatozoide, la movilidad del mismo y/o la capacidad para fertilizar un óvulo. Otros componentes adecuados para su uso en composiciones y preparaciones de la invención pueden comprender una fuente apropiada de cobre y, en particular, iones de Cu^{2+} , como el sulfato de cobre (II), el carbonato de cobre (II) o el citrato de cobre (II).

Ejemplos de otros compuestos que ayudan a incrementar la fertilidad masculina, incluyen, sin limitarse a, el ácido fólico, el zinc, la glutatión, la arginina y el ácido alfa-lipoico.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "excipiente" hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición, es decir, de las cepas de la invención, o estabiliza dichos componentes y/o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que la hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los componentes unidos (por ejemplo, almidones, azúcares o celulosas), de endulzar, de aportar un colorante, de proteger el principio activo (por ejemplo, para aislarlo del aire y/o la humedad), la de rellenar una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación, de desintegrar para facilitar la disolución de los componentes, etc., sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo. Por tanto, el término "excipiente" se define como aquella materia que, incluida en las formas galénicas, se añade a los principios activos o a sus asociaciones para posibilitar su preparación y estabilidad, modificar sus propiedades organolépticas o determinar las propiedades físico-químicas de la composición farmacéutica y su biodisponibilidad. El excipiente "farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad de los compuestos de la composición farmacéutica, es decir, que sea compatible con las cepas de la invención.

La "forma galénica" o "forma farmacéutica" es la disposición a la que se adaptan los principios activos y excipientes para constituir una composición o un fármaco. Se define por la combinación de la forma en la que la composición farmacéutica es presentada por el fabricante y la forma en la que es administrada.

5

El "vehículo" o "portador" es, preferiblemente, una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración y/o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el fármaco para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que, aun sin diluir dichos componentes, es capaz de permitir una mejor dosificación y administración y/o dar consistencia y forma al fármaco. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

10

15

Además, el excipiente y el vehículo deben ser farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados para que no cause daño al sujeto a los que se administra.

20

En cada caso la forma de presentación de la composición farmacéutica se adaptará al tipo de administración utilizada. Por ello, la composición se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas o líquidas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, soluciones, supositorios, geles o microesferas. En una realización particular, la composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración oral.

25

30

La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que consiste en, pero sin limitarse a, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco y liofilizado.

35

Adicionalmente a lo descrito en párrafos anteriores, en la presente invención también se contempla la posibilidad de que la composición de la invención se pueda

administrar a un sujeto de forma conjunta con otros compuestos, aunque éstos no formen parte de la composición de la invención. Ejemplos de dichos compuestos han sido mencionados en párrafos anteriores.

- 5 Así, la administración al sujeto de dichos compuestos puede realizarse de forma simultánea o de forma secuencial a la composición de la invención.

En el caso de que la composición de la invención esté formulada como una composición nutricional funcional, dicha composición nutricional puede ser un alimento
10 o ir incorporada en un alimento o producto alimenticio destinado tanto a la alimentación humana como a la alimentación animal. Así, en una realización particular, la composición nutricional funcional es seleccionada de entre un alimento (que puede ser un alimento para fines nutricionales específicos o un alimento medicinal o un alimento funcional) o un suplemento nutricional.

15 El término "composición nutritiva funcional" o "composición nutricional funcional" de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. En la
20 presente invención, dicha composición nutricional funcional está destinada a incrementar la fertilidad masculina.

El término "suplemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético", "suplemento nutricional", "suplemento alimentario" o "suplemento
25 alimenticio", es un componente o componentes destinados a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos incluyen, pero sin limitarse a, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, los aminoácidos y los componentes de los alimentos, como las enzimas y los extractos glandulares. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componentes únicos
30 de una comida o de una dieta alimenticia, sino como complemento de la dieta.

Ejemplos de alimentos que pueden comprender una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* y una cepa de *Bifidobacterium longum*, o la composición que las comprende tal como se ha explicado en párrafos anteriores incluyen, pero sin limitarse a, piensos,
35 productos lácteos, productos vegetales, productos cárnicos, aperitivos, chocolates, bebidas, alimentos infantiles, cereales, fritos, bollería industrial, galletas, etc. Ejemplos

de productos lácteos incluyen, pero sin limitarse a, productos derivados de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitarse a, helado, mantequilla, margarina o suero lácteo). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitarse a, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado o no fermentado, o un aperitivo. La bebida puede ser, pero sin limitarse a, leche no fermentada. No obstante, en una realización particular, el producto alimentario se selecciona del grupo que consiste en un producto lácteo, un producto cárnico, un producto vegetal, un forraje y una bebida.

En otra realización particular, la composición de la invención es administrada a un sujeto a través de la dieta.

Como entiende el experto en la materia, los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* tienen que estar presentes en la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz para que puedan ejercer su efecto de incrementar la fertilidad masculina cuando es administrada a un sujeto. En la presente invención se entiende por “cantidad terapéuticamente eficaz” aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que, cuando se administra a un sujeto, es suficiente para producirle el efecto. Dicho componente de la composición farmacéutica se refiere a las cepas de la invención. La cantidad terapéuticamente efectiva variará en función de, por ejemplo, la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del sujeto, al igual que en función del modo y del tiempo de administración, de la velocidad de excreción o de la combinación de fármacos entre otros. Así, en una realización particular, la concentración total de microorganismos de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* en la composición es de entre 10^6 y 10^{12} ufc, preferiblemente, 10^9 ufc. En otra realización particular, la dosis de administración de microorganismos de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* en la composición es de entre 10^6 y 10^{12} ufc/día, preferiblemente, 10^9 ufc/día, y en otra realización todavía más particular, el régimen de administración es de, al menos, una vez al día, en particular, dos veces al día, y más en particular, tres veces al día, una con cada ingesta de comida (desayuno, almuerzo y cena).

En una realización particular, la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361, o una cepa derivada de la misma, y/o la cepa de *Bifidobacterium longum* es la cepa de *Bifidobacterium longum* CECT 7347, o una

cepa derivada de la misma. Esta realización particular de la invención será descrita en detalle a continuación.

Composición II de la invención

5

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante, “composición II de la invención”, que comprende *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347, o cepas derivadas de las mismas, cuya combinación presenta la capacidad de incrementar la fertilidad masculina.

10

La cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 fue aislada a partir de heces de un niño de menos de tres meses de vida, sano y alimentado con lactancia materna. Esta cepa fue depositada el 27 de mayo de 2013 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia) ESPAÑA). El número de depósito asignado fue CECT 8361 (de aquí en adelante “cepa de la invención CECT 8361” o “*Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361”). La clasificación científica de la cepa de la invención CECT 8361 es: Reino: *Bacteria*, Division: *Firmicutes*, Clase: *Bacilli*, Orden: *Lactobacillales*, Familia: *Lactobacillaceae*, Género: *Lactobacillus*, Especie: *Lactobacillus rhamnosus*. Durante el aislamiento de la cepa de la invención CECT 8361, los inventores observaron que *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 tiene, sorprendentemente, una mayor actividad antioxidante que otros aislados del género *Lactobacillus*, es decir, ofrece una mayor protección frente al estrés oxidativo a las células. Así, en una realización particular, la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 presenta una actividad antioxidante mayor que otras cepas de *Lactobacillus*. Por ello, los inventores piensan que la capacidad antioxidante de la cepa es relevante para explicar el incremento de la calidad del semen, en particular, en el incremento de la motilidad espermática y en la disminución de la fragmentación del ADN espermático; lo que, en última instancia, incrementa la fertilidad masculina.

25

30

La cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 fue aislada a partir de heces de un niño sano de menos de tres meses de edad sometido a lactancia materna y depositada el 20 de diciembre de 2007 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo como Autoridad Internacional de Depósito (con sede en Burjassot, Valencia). El número de depósito asignado fue CECT 7347 (de aquí en adelante “cepa

35

de la invención CECT 7347” o “*Bifidobacterium longum* CECT 7347”). La clasificación científica de la cepa de la invención CECT 7347 es: Reino: *Bacteria*, División: *Firmicutes*, Clase: *Actinobacteria*, Orden: *Bifidobacteriales*, Familia: *Bifidobacteriaceae*, Género: *Bifidobacterium*, Especie: *Bifidobacterium longum*. La
5 cepa de de la invención CECT 7347 presenta actividad antiinflamatoria.

Dentro de la presente invención, también están contemplados aquellos microorganismos o bacterias que derivan de la cepa de la invención CECT 8361 y de la cepa de la invención CECT 7347 y que conservan la capacidad de incrementar la
10 fertilidad masculina debido a que mejoran la calidad del semen y/o disminuyen la fragmentación del ADN espermático y mejoran la integridad de la cromatina. Ejemplos de cepas o microorganismos derivados de las cepas de invención pueden ser mutantes que presentan variaciones en su genoma respecto al genoma de las cepas de la invención pero que no afectan a la capacidad de las cepas de incrementar la
15 fertilidad masculina. Así, cepas mutantes derivadas de las cepas de la invención que conservan la capacidad de incrementar la fertilidad también están contempladas dentro de la presente invención. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a cepas derivadas de la cepa de la invención CECT 8361 y de la cepa de la invención CECT 7347, con capacidad para incrementar la fertilidad masculina cuando
20 se administran de forma combinada a un sujeto.

Las cepas derivadas de la cepa de la invención CECT 8361 y de la cepa de la invención CECT 7347 pueden producirse de forma natural o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica
25 como, por ejemplo, pero sin limitarse a, el crecimiento de la cepa original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación, delección y/o inclusión de genes específicos. Así, dentro de la presente invención también se contemplan organismos genéticamente modificados derivados de las cepas de la invención que conservan su capacidad de incrementar la
30 fertilidad masculina.

Por otro lado, dentro de la presente invención, también se contemplan los componentes celulares, los metabolitos y las moléculas secretadas por la cepa de la invención CECT 8361 y por la cepa de la invención CECT 7347 o por las cepas
35 derivadas de la cepa de la invención CECT 8361 y de la cepa de la invención CECT 7347, así como las composiciones que comprenden dichos componentes y los usos

de los mismos para incrementar la fertilidad masculina. Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como, por ejemplo, pero sin limitarse a, el peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana u otros, como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones (como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas). Los metabolitos incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica, durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos o durante el almacenamiento del producto. Ejemplos de estos metabolitos son, pero sin limitarse a, los ácidos orgánicos e inorgánicos, las proteínas, los péptidos, los aminoácidos, las enzimas, los lípidos, los hidratos de carbono, las lipoproteínas, los glicolípidos, las glicoproteínas, las vitaminas, las sales, los metales o los ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula secretada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, de elaboración de alimentos o fármacos) o el almacenamiento del producto. Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse a, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos.

En la presente invención se entiende que una cepa o la combinación de ellas, tiene/n la capacidad de “incrementar la fertilidad masculina” cuando, tras su ingesta por un sujeto, dicha/s cepa/s es/son capaz/ces de aumentar la calidad del semen de dicho sujeto y, con ello, de incrementar las probabilidades de fecundar a una hembra y obtener descendencia.

La proporción de la cepa de la invención CECT 8361 y de la cepa de la invención CECT 7347 en la composición de la invención puede variar en un amplio intervalo. El ratio *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361:*Bifidobacterium longum* CECT 7347 en la composición de la invención incluye, pero sin limitarse a, 10:90, 15:85, 20:80, 25:75, 30:70, 35:65, 40:60, 45:55, 50:50, 55:45, 60:40, 65:35, 70:30, 75:25, 80:20, 85:15, 90:10 y 95:05. No obstante, en una realización particular el ratio *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361:*Bifidobacterium longum* CECT 7347 es, aproximadamente, 50:50.

Tal como se ha explicado anteriormente para el uso de la composición de la invención para el incremento de la fertilidad masculina, la composición II de la invención puede ir

formulada para su administración farmacéutica o para su administración alimentaria, Por lo tanto, en una realización particular, la composición es una composición farmacéutica o una composición nutricional funcional.

5 La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formado, al menos, por la cepa de la invención CECT 8361 y la cepa de la invención CECT 7347, en cualquier concentración, que, adicionalmente, puede comprender uno o más componentes o compuestos que posean alguna actividad biológica, farmacológica y/o veterinaria; en particular, compuestos que cuando son administrados oralmente a un
10 sujeto puedan ejercer dicha actividad biológica. Estos compuestos adicionales pueden ser uno o más compuestos que se sabe *per se* que presentan, al ser administrados (por vía oral) a un sujeto o individuo macho de una especie -en particular, una especie mamífera-, una influencia beneficiosa sobre la fertilidad y/o sobre la calidad del esperma de un individuo macho y/o pueden ser uno o más componentes que, tras su
15 administración a un sujeto, pueden, ulteriormente, aumentar, reforzar, y/o impulsar la actividad de la cepa de la invención CECT 8361 y la cepa de la invención CECT 7347. Como entiende el experto en la materia, los compuestos adicionales deben ser compatibles con las cepas de la invención. Así, en el contexto de la presente invención, dentro del término “composición farmacéutica” también se engloban las
20 composiciones veterinarias.

El o los compuestos adicionales pueden ser uno o varios compuestos que garanticen la espermatogénesis o cualquier parte y/o proceso de la espermatogénesis. Algunos ejemplos no limitativos de estos compuestos se han descrito para el aspecto inventivo
25 anterior y son aplicables a la composición II de la invención.

En una realización particular, la composición farmacéutica comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los términos “vehículo” y “excipiente” “farmacéuticamente aceptables” han sido definidos previamente en la presente
30 descripción y son aplicables al presente aspecto inventivo.

En cada caso, la forma de presentación de la composición farmacéutica se adaptará al tipo de administración utilizada. La composición farmacéutica se puede formular en formas sólidas, semisólidas o líquidas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos,
35 gránulos, soluciones, geles o microesferas. En una realización particular, la

composición farmacéutica se presenta en una forma adaptada a la administración oral. Ejemplos de administración oral han sido explicados previamente.

5 Adicionalmente, en la presente invención también se contempla la posibilidad de que la composición de la invención se pueda administrar a un sujeto de forma conjunta con otros compuestos. Ejemplos de dichos compuestos también han sido citados previamente. Así, la administración al sujeto de dichos compuestos puede realizarse de forma simultánea o de forma secuencial a la composición de la invención.

10 En el caso de que la composición que comprende la cepa de la invención CECT 8361 y la cepa de la invención CECT 7347 esté formulada como una composición nutricional funcional, dicha composición nutricional puede ser un alimento o ir incorporada en un alimento/producto alimenticio destinado tanto a la alimentación humana como a la alimentación animal. Así, en una realización particular, la
15 composición nutricional funcional es seleccionada entre un alimento (que puede ser un alimento para fines nutricionales específicos o un alimento medicinal) o un suplemento nutricional. Los términos “composición nutricional funcional”, “suplemento” y ejemplos de alimentos que pueden comprender las cepas de la invención o la composición II de la invención, han sido descritos en párrafos anteriores. No obstante,
20 en una realización particular, el producto alimentario se selecciona del grupo que consiste en un producto lácteo, un producto cárnico, un producto vegetal, un forraje y una bebida. En otra realización particular, la composición de la invención es administrada a un sujeto a través de la dieta.

25 Como entiende el experto en la materia, las cepas de la invención tienen que estar presentes en la composición de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz para que puedan ejercer su efecto de incrementar la fertilidad masculina cuando son administradas a un sujeto. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” ha sido descrito previamente, así como las vías, las dosis y los regímenes de administración
30 que pueden emplearse en el contexto de la presente invención. En una realización particular, la concentración total de microorganismos de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347 en la composición de la invención es de entre 10^6 y 10^{12} ufc, preferiblemente, 10^9 ufc.

35 Método para incrementar la fertilidad masculina en un sujeto

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para incrementar la fertilidad masculina, de aquí en adelante "método de la invención", que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum*, en particular, las cepas

5 *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347.

El experto en la materia entenderá que todas las realizaciones particulares descritas anteriormente para el uso de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* son aplicables al método de la invención: formas de administración, formas de

10 presentación, tipos de composición, dosis, sujetos que pueden ser tratados, etc.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

La **Figura 1** es un gráfico de barras que describe la vvariación de espermatozoides móviles (%) a lo largo del diseño experimental: C (control; n=9), T1 (tratamiento 1; n=8), T2 (tratamiento 2; n=7), L1 (lavado 1; n=8), L2 (lavado 2; n=7). Los valores (media $\pm$ error) con asterisco son significativamente diferentes al control tras realizar

25 un análisis estadístico t de Student para muestras relacionadas ($p<0,05$).

La **Figura 2** es un gráfico de barras que describe la variación en el índice de fragmentación del ADN (DFI) espermático (%) a lo largo del diseño experimental: C (control; n=9), T1 (tratamiento 1; n=9), T2 (tratamiento 2; n=7), L1(lavado 1; n=8), L2

30 (lavado 2; n=6). Los valores (media $\pm$ error) con asterisco son significativamente diferentes al control tras realizar un análisis estadístico t de Student para muestras relacionadas ($p<0,05$).

La **Figura 3** es un gráfico de barras que muestra la capacidad antioxidante de

35 *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 en *Caenorhabditis elegans* (en adelante, *C. elegans*). Escrutinio de veintitrés aislados del género *Lactobacillus* de la colección de

5 uno de los dos solicitantes de la presente invención, a saber, Biopolis, S.L., sobre la actividad antioxidante en *C. elegans*. Se representa el porcentaje de supervivencia de *C. elegans* alimentado con cada aislado frente a supervivencia de *C. elegans* en condiciones control (*E. coli* OP50). Los valores positivos indican actividad antioxidante y los valores negativos indican un posible efecto prooxidante.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

10

Ejemplo 1: Mejora de la calidad espermática tras la administración conjunta a un sujeto de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347

15

Para abordar este estudio se seleccionaron las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347. Esta selección se basó en la elevada actividad antioxidante que presenta la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y en la actividad antiinflamatoria descrita previamente para la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347.

20

El formato de administración fue una cápsula que contenía una combinación de ambos microorganismos al cincuenta por ciento (50%). La dosificación fue de una cápsula al día, correspondiente a la administración de 10^9 ufc/día.

25

Bajo la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de León, tras haber firmado el correspondiente consentimiento informado siguiendo la normativa establecida por la declaración de Helsinki y cumpliendo la legislación vigente en el estado español, hombres astenozoospermicos que no se encontraban bajo medicación y con hábitos de alimentación homogéneos participaron en el experimento.

30

Los voluntarios donaron su muestra de eyaculado siguiendo las indicaciones del manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) tras tres días de abstinencia sexual y utilizando contenedores estériles. Las donaciones fueron recogidas con rapidez tras el muestreo para ser procesadas en el laboratorio a la mayor brevedad posible.

35

Las muestras biológicas solicitadas a los donantes fueron las siguientes: control, C (previo al comienzo de la ingesta de los probióticos); tratamiento 1, T1 (3 semanas de ingesta de probióticos); tratamiento 2, T2, (6 semanas de ingesta de probióticos); lavado 1, L1 (3 semanas después de la finalización de la ingesta de probióticos); y
 5 lavado 2, L2 (6 semanas después de la finalización de la ingesta de probióticos).

La ingesta de los probióticos fue diaria. El formato de administración fue una cápsula al día contenedora de las dos cepas *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347 a una concentración de 10^9 ufc/cápsula.

10 El esperma fue diluido en tampón PBS 1X hasta una concentración final de 10 a 20×10^6 células/mL. Esta dilución fue cargada en una cámara de conteo Makler de $10\text{-}\mu\text{m}$ a 37°C . Se evaluó la motilidad de los espermatozoides, del mismo modo en cada uno de los muestreos, con un sistema computerizado de análisis espermático (CASA) consistente en un microscopio triocular de contraste de fases, utilizando un objetivo
 15 contrastador de fase negativo 10 X, equipado con una placa calefactora a 37°C y una cámara digital Basler A312fc. Las imágenes fueron capturadas y analizadas utilizando un analizador computerizado de motilidad con ajustes específicos para los espermatozoides humanos. El sistema proporcionó a nivel global los siguientes tres parámetros: (1) porcentaje de espermatozoides móviles, (2) porcentaje de
 20 espermatozoides progresivos y (3) porcentaje de espermatozoides estáticos.

Se realizó la técnica SCSA ("Sperm Chromatin Structure Assay") (Evenson) para evaluar la fragmentación del ADN. Se realizó una tinción metacromática con naranja de acridina (AO) con una alícuota de la muestra. Esta molécula emite fluorescencia en la banda roja cuando se combina con ADN desnaturalizado y en la banda verde
 25 cuando se combina con una doble hélice de ADN en buen estado. Los eyaculados se diluyeron con tampón TNE (NaCl 0,15 M, M Tris-HCl 0,01, EDTA 1 mM; pH 7,4) a una concentración celular final de aproximadamente $1\text{-}2 \times 10^6$ células/mL. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Posteriormente, las muestras se descongelaron en un baño a 37°C y se mezclaron
 30 con $200\text{ }\mu\text{l}$ de una solución de detergente ácido (HCl 0,08 N, NaCl 0,15 M, 0,15 Triton X 100; pH 1,4). Después de 30 segundos de exposición al ácido detergente, se realizó la tinción con naranja de acridina mediante la adición de 1,2 mL de la solución de tinción que contenía 6 g de AO por mL de tampón (0,037 M de ácido cítrico, 0,126 M Na_2HPO_4 , 0,0011 M EDTA (di-sódico), NaCl 0,15 M, pH 6.0). Exactamente 3 minutos
 35 después de la tinción, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo equipado con óptica estándar y un láser de argón sintonizado a $488\text{ }\mu\text{m}$. El flujo celular se

mantuvo alrededor de 200 células/s y se contaron 5000 eventos para cada muestra. Los datos correspondientes al rojo (fotodetector FL3; filtro de paso 670 de largo) y la fluorescencia verde (FL1 fotodetector; filtro de paso de banda 530/30) de partículas adquiridas fueron registrados y analizados con el software libre Weasel 3.1. Se analizó el principal parámetro, el índice de fragmentación del ADN (DFI), que se corresponde a una relación entre la fluorescencia roja y la fluorescencia total (rojo y verde).

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS versión 20. Los datos se presentan como media $\pm$ SE en todos los casos. Los valores medios de cada variable se compararon mediante un test t de Student para muestras relacionadas ($p < 0,05$).

El estatus de motilidad de los donantes fue corroborado en el muestreo control donde se certificó que los voluntarios se clasificaban como astenozoospermicos siguiendo los estándares de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). El valor de células motiles registradas en este muestreo fue de $5,56 \pm 2,51$ % (valor medio $\pm$ error). Tras tres semanas de administración de probióticos (T1), el porcentaje de espermatozoides móviles aumentó alrededor de cinco veces comparado con el muestreo anterior, alcanzando un valor de $31,88 \pm 6,01$ % (valor medio $\pm$ error). Este incremento se mantuvo a las seis semanas de ingesta de probióticos (T2), así como en los dos muestreos posteriores realizados a las 3 y 6 semanas tras el fin de la administración de probióticos (L1 y L2). Los datos recogidos fueron respectivamente: $28,14 \pm 8,79$; $33,25 \pm 6,38$ y $39,57 \pm 8,52$ % (valor medio $\pm$ error) (Fig. 1). Después de realizar el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas entre el control y los demás muestreos (t de Student para muestras relacionadas, $p < 0,05$). Ver Figura 1.

La Figura 2 muestra los valores medios porcentuales obtenidos en cada punto clave a lo largo del diseño experimental para el índice de fragmentación del ADN. En el muestreo control (C) se encontró el DFI (índice de fragmentación del ADN espermático) mayor: $25,74 \pm 0,59$ %. Tras las seis semanas de la administración de probióticos se redujo el porcentaje de ADN dañado hasta $21,11 \pm 1,00$ y $21,58 \pm 0,94$ % (T1 y T2 respectivamente). Esta tendencia se mantuvo en el primer lavado (L1) cuya media fue $21,64 \pm$ DFI $1,73$ %. Seis semanas después de la finalización de la exposición a las cepas, la mejora registrada vista durante los muestreos anteriores comenzó a cambiar en el lavado 2 (L2) donde se registró un DFI mayor en comparación con T1, T2 y L1 con un índice de fragmentación de $23,09 \pm 1,28$ %,

cambiando por lo tanto la tendencia. Se encontraron diferencias significativas (t de Student para muestras relacionadas, $p < 0,05$) con el muestreo control en T1, T2 y L1.

Los resultados demuestran el papel estimulador sobre la motilidad espermática de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347 cuando son ingeridas como composición nutricional funcional. También se ha confirmado una reducción significativa de la fragmentación del ADN espermático tras el tratamiento.

10 **Ejemplo 2. Actividad antioxidante de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361**

Se realizó un escrutinio de 23 aislados del género *Lactobacillus* pertenecientes a la colección de uno de los dos solicitantes de la presente invención, a saber, Biopolis, S.L., en base a su actividad antioxidante en *C. elegans*. Las cepas incluidas en el estudio se aislaron a partir de heces de niños con lactancia materna exclusiva de menos de 3 meses de edad.

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos con la cepa de *Lactobacillus* del estudio. Los datos representan el porcentaje de incremento de supervivencia del modelo animal *C. elegans* alimentado con cada cepa bacteriana respecto a *C. elegans* cultivado en condiciones estándar (cepa *Escherichia coli* OP50). Como se puede observar, el aislado 1, identificado como *Lactobacillus rhamnosus*, fue el que proporcionó mayor supervivencia a *C. elegans*, tras aplicar un estrés oxidativo con agua oxigenada (un incremento de la supervivencia del 27% respecto a condiciones control).

La identificación inequívoca del aislado 1 se llevó a cabo mediante la secuenciación del ADN ribosómico (ADNr) 16S y posterior comparación de la secuencia obtenida con el total de secuencias del gen depositadas en las bases de datos públicas utilizando la herramienta en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). La cepa de la presente invención CECT 8361 se identificó como *Lactobacillus rhamnosus* obteniéndose la mayor homología (100%) con las secuencias públicas pertenecientes a esta especie. La cepa se depositó en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) como CECT 8361.

SEQ ID NO: 1 – Secuencia obtenida de la secuenciación del ADNr 16S de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361.

GTCGAACGAGTTCTNATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTTAATTTTGAACGA
 GTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACA
 5 TTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTG
 AAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGG
 TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAATGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCG
 GCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAG
 10 GCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGT
 TGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAG
 CGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGC
 ATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAG
 15 CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAANGCGGCTGTCTGG
 TCTGTAAGTACGCTGANGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGANNAGATACC
 CTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT
 CAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACNACCGCAAGGN
 TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGNAGCATGTGGTTTA
 20 ATTCGAAGCANCNCGAAGAACCTTACCNGGTCTTGACNTCTTTTGATCA

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* en combinación con una cepa de *Bifidobacterium longum* en la elaboración de una composición para incrementar la fertilidad masculina en un sujeto.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el ratio *Lactobacillus rhamnosus*: *Bifidobacterium longum* es 50:50.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la composición es una composición farmacéutica o una composición nutricional funcional.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que la composición farmacéutica comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. Uso según la reivindicación 3 o 4, en el que la composición farmacéutica está formulada para su administración oral.
6. Uso según la reivindicación 3, en el que la composición nutricional funcional es un alimento o un suplemento nutricional.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el alimento se selecciona del grupo que consiste en un producto lácteo, un producto cárnico, un producto vegetal, un forraje y una bebida.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sujeto es un pez o un mamífero, preferiblemente, un mamífero seleccionado del grupo que consiste en un ser humano, un cerdo, un caballo, un conejo, un buey y un toro.
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la dosis de administración de microorganismos de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium longum* en la composición es de entre 10^6 y 10^{12} ufc/día, preferiblemente, 10^9 ufc/día.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que el régimen de administración de la composición es al menos una vez al día.

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* es la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y/o la cepa de *Bifidobacterium longum* es la cepa de *Bifidobacterium longum* CECT 7347.

5

12. Una composición que comprende las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347 o cepas derivadas de las mismas, cuya combinación presenta la capacidad de incrementar la fertilidad masculina.

10

13. Composición según la reivindicación 12, en la que el ratio *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361: *Bifidobacterium longum* CECT 7347 es 50:50.

14. Composición según la reivindicación 12 o 13, en la que la composición es una composición farmacéutica o una composición nutricional funcional.

15

15. Composición según la reivindicación 14, en la que la composición farmacéutica comprende un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

16. Composición según la reivindicación 14 o 15, en la que la composición farmacéutica está formulada para su administración oral.

20

17. Composición según la reivindicación 14, en la que la composición nutricional funcional es un alimento o un suplemento nutricional.

18. Composición según la reivindicación 17, en la que el alimento se selecciona del grupo que consiste en un producto lácteo, un producto cárnico, un producto vegetal, un forraje y una bebida.

25

19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en la que la concentración total de microorganismos de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8361 y *Bifidobacterium longum* CECT 7347 en la composición es de entre 10^6 y 10^{12} ufc, preferiblemente, 10^9 ufc.

30

35

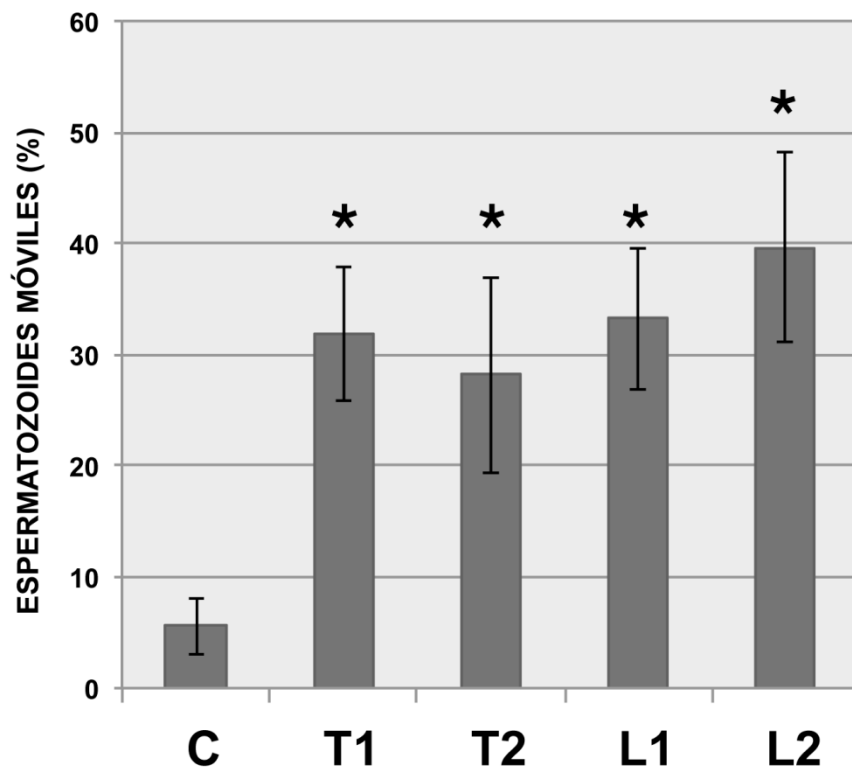


FIG. 1

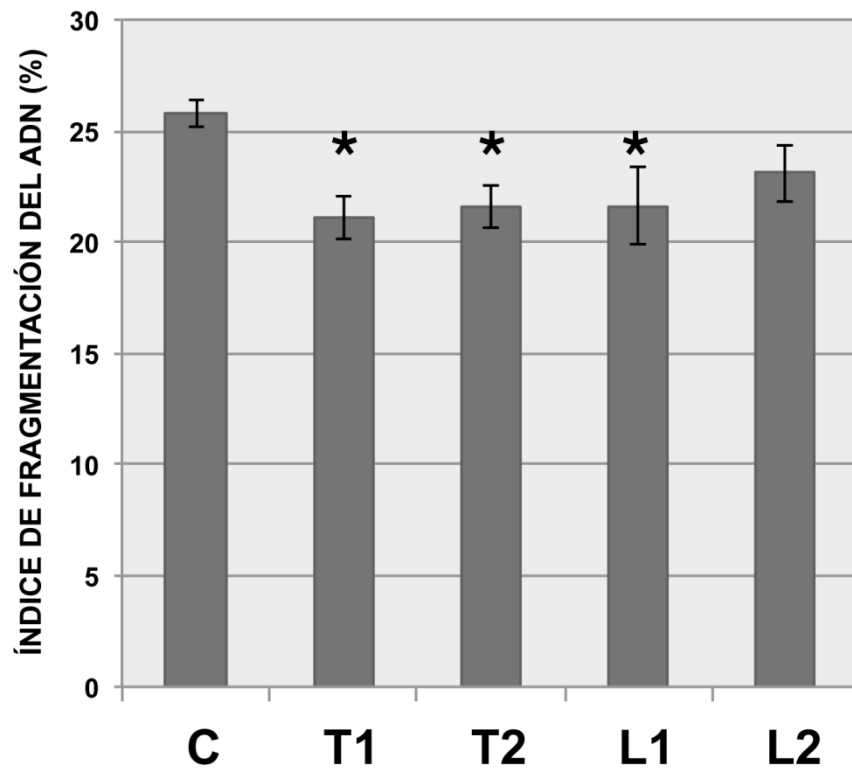


FIG. 2

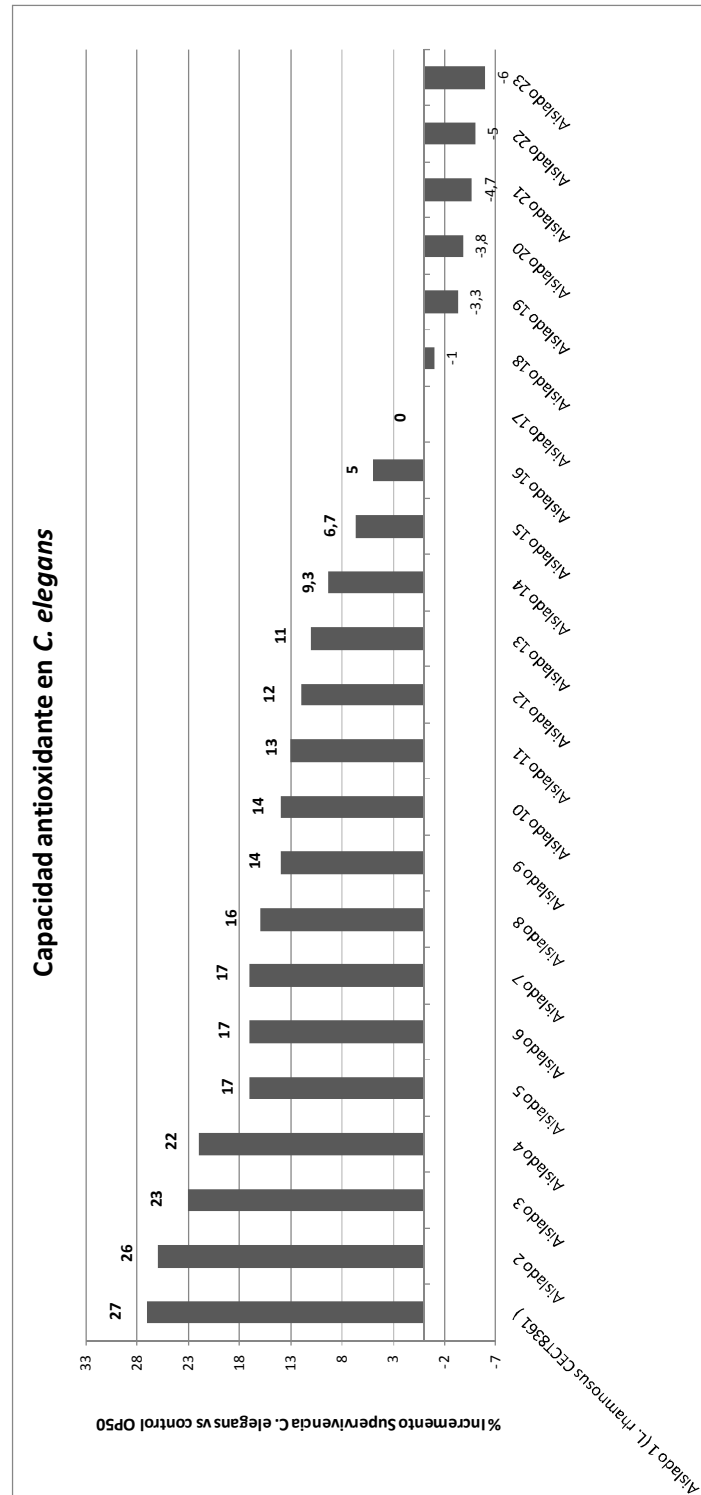


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 201431977
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.12.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WENG SHUN-LONG et al. "Bacterial Communities in Semen from Men of Infertile Couples: Metagenomic Sequencing Reveals Relationships of Seminal Microbiota to Semen Quality." PLoS One OCT 23 2014 (10.2014) VOL: 9 No: 10 Págs: Article No.: e110152 ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0110152; todo el documento.	1-19
A	XIAOLIAN CHEN et al. "Probiotics Attenuate Sperm Damage Induced by Oxidative Stress in Rats." Biomedical Engineering and Biotechnology (iCBEB), 2012 International Conference on, 20120528 IEEE 28.05.2012 VOL: Págs: 446-448 ISBN 978-1-4577-1987-5; ISBN 1-4577-1987-8 Doi: doi:10.1109/iCBEB.2012.314; todo el documento.	1-19
A	CABRITA E. et al. "Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis" AQUACULTURE (09.05.2014) Vol. 432, páginas 389-401; DOI: <"http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034">; todo el documento.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.04.2016

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K35/745 (2015.01)**A61K35/747** (2015.01)**A61P15/08** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.04.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WENG SHUN-LONG et al. "Bacterial Communities in Semen from Men of Infertile Couples: Metagenomic Sequencing Reveals Relationships of Seminal Microbiota to Semen Quality." PLoS One OCT 23 2014 (10.2014) VOL: 9 No: 10 Págs: Article No.: e110152 ISSN 1932-6203(print) ISSN 1932-6203(electronic) Doi: doi:10.1371/journal.pone.0110152; todo el documento.	30.09.2014
D02	XIAOLIAN CHEN et al. "Probiotics Attenuate Sperm Damage Induced by Oxidative Stress in Rats." Biomedical Engineering and Biotechnology (iCBEB), 2012 International Conference on, 20120528 IEEE 28.05.2012 VOL: Págs 446-448 ISBN 978-1-4577-1987-5; ISBN 1-4577-1987-8 Doi: doi:10.1109/iCBEB.2012.314; todo el documento.	28.05.2012
D03	CABRITA E. et al. "Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis" AQUACULTURE (09/05/2014) Vol. 432, páginas 389-401; DOI: <"http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.034">; todo el documento.	09.05.2014

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-19, es el uso de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* en combinación con una cepa de *Bifidobacterium longum* en la elaboración de una composición para incrementar la fertilidad masculina (reiv. 1-11). Es también objeto de la invención una composición que comprende las cepas *Lactobacillus hamnosus* CECT8361 y *Bifidobacterium longum* CECT7347 (reiv. 12-19).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga un estudio en el que se analiza la población bacteriana del semen tanto en individuos fértiles como en individuos no fértiles. En este estudio se indica que la proporción de *Lactobacillus* y *Gardnerella* es significativamente mayor en individuos fértiles, mientras que la proporción de *Prevotella* es significativamente mayor en individuos no fértiles. De acuerdo con los resultados del estudio, se indica que las bacterias Gram positivas como *Lactobacillus*, parecen estar implicadas en la obtención de semen de mejor calidad y en la protección frente a la influencia negativa de bacterias Gram negativas, por lo que suplementos que contengan *Lactobacillus*, ayudarían a mantener un semen de calidad y un incremento de la fertilidad.

El documento D02 divulga el efecto protector de los probióticos (entre los que se encuentran *Lactobacillus* spp) frente al daño oxidativo, mejorando la calidad del esperma. En este documento se indica que una dieta suplementada con probióticos ayuda positivamente a la viabilidad y motilidad del esperma, y a que la fragmentación del ADN del esperma sea menor, mejorando de esta forma la fertilidad del individuo.

El documento D03 divulga el incremento de la fertilidad en peces mediante la adición de probióticos (entre los que se encuentra *Lactobacillus rhamnosus*) a la dieta del individuo. Entre las mejoras indicadas en este documento se citan un volumen mayor de esperma y una mejora en la motilidad de las células (ver apartado 2.1 "*The role of breeders' nutrition, epigenetics and cryopreservation on sperm quality enhancement*").

Aunque en el estado de la técnica ya se conoce el efecto beneficioso de los probióticos en la fertilidad masculina, no se ha encontrado divulgado el uso combinado de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con una cepa de *Bifidobacterium longum* para la elaboración de una composición para incrementar la fertilidad masculina de un individuo, o una composición que contenga la combinación reivindicada.

Por lo tanto, ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-19. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-19. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-19 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).