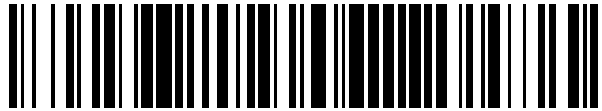


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 857**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A23L 29/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2014 PCT/ES2014/070579**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2014 E 14755102 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2017 EP 3048165**

54 Título: **Nueva cepa de bifidobacterium animalis subsp. lactis cect 8145 y su uso para el tratamiento y/o prevención de sobrepeso y obesidad y enfermedades asociadas**

30 Prioridad:

18.07.2013 ES 201331088

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

21.02.2018

73 Titular/es:

BIOPOLIS, S.L. (100.0%)

Parc Científic Universitat de Valencia

Catedráticos Agustín Escardino Benlloch, nº 9,

Edf. 2

46980 Paterna, Valencia, ES

72 Inventor/es:

MARTORELL GUEROLA, PATRICIA;

CHENOLL CUADROS, M^a EMPAR;

RAMÓN VIDAL, DANIEL;

ORTIZ SERRANO, PEPA;

LLOPIS PLA, SILVIA;

GONZALEZ MARTÍNEZ, NÚRIA;

GENOVÉS MARTÍNEZ, SALVADOR;

CASINOS RAMO, BEATRIZ;

SILVA ANGULO, ÁNGELA y

ALEIXANDRE, AMAYA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 655 857 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

Nueva cepa de *bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* cect 8145 y su uso para el tratamiento y/o prevención de sobrepeso y obesidad y enfermedades asociadas

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se enmarca dentro de la industria alimentaria y farmacéutica. Se refiere en concreto a una nueva cepa de la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145, sobrenadantes y/o cultivo, así como extractos y/o compuestos bioactivos que comprenden la cepa, que, incorporados a formulaciones alimentarias y/o farmacéuticas, inducen saciedad, reducen el apetito, la grasa corporal y el riesgo cardiovascular, provocan pérdida de peso, tienen actividad antioxidante y anti-inflamatoria y, en consecuencia, tienen aplicación en el tratamiento y/o
- 10 prevención de sobrepeso y/o obesidad y/o sus enfermedades asociadas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 La obesidad y el sobrepeso son un trastorno metabólico y nutricional de serias consecuencias para la salud, siendo el sobrepeso un grado de obesidad. A pesar de existir un mejor conocimiento clínico y epidemiológico del problema, la prevalencia de la obesidad y el sobrepeso ha aumentado significativamente en países industrializados y en desarrollo. Se reconoce el alto riesgo que representa la obesidad en la incidencia de varias enfermedades crónicas: hipertensión arterial, enfermedad isquémica coronaria, accidentes cerebro-vasculares, diabetes tipo 2 y ciertas formas de cáncer, que son causa importante de morbilidad y mortalidad en los países del hemisferio occidental.

- 20 En la lucha contra el sobrepeso y la obesidad, la industria alimentaria ha incorporado nuevos ingredientes con el objetivo de ayudar a los consumidores a obtener un peso adecuado. En el ámbito del desarrollo e investigación de nuevos productos, una opción es que ciertos ingredientes puedan añadirse para que actúen inhibiendo la acumulación de energía en forma de grasa, bien disminuyendo la absorción o formación de grasa, bien estimulando la movilización de la grasa con una lipólisis aumentada o bien mejorando sus tasas de oxidación lipídica.

- 25 Otro de los aspectos que inciden de forma positiva en la prevención o tratamiento del sobrepeso y la obesidad es controlar y/o reducir el apetito a través de la inducción de un efecto saciante en el individuo activando la regulación metabólica del apetito.

- 30 Igualmente, algunos estudios sugieren que la obesidad se acompaña de un estado de estrés oxidante crónico, el cual se ha propuesto como el nexo de unión entre la obesidad y algunas comorbilidades asociadas tales como la resistencia insulínica y las patologías cardiovasculares. (Molnar D, Decsi T, Koletzko B. "Reduced antioxidant status in obese children with multimetabolic syndrome". *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28:1197-202). Por ello, en los últimos años también se están llevando a cabo diferentes investigaciones sobre el posible papel de la suplementación con diferentes antioxidantes dietéticos en la mejoría y prevención del sobrepeso y la obesidad.

- 35 Por otra parte, la microbiota intestinal y los probióticos producen un efecto positivo para la salud regulando las funciones inmunológicas del individuo y protegiéndolo de infecciones y procesos de inflamación crónica. Hay estudios que señalan a la microbiota intestinal como un nuevo factor que podría estar implicado en la regulación del peso corporal y las enfermedades asociadas a la obesidad. Por ello, la manipulación intencionada de la microbiota intestinal a través de la dieta se propone como una posible nueva herramienta para prevenir o modificar el riesgo de obesidad y, en particular, las enfermedades metabólicas asociadas a ésta.

- 40 En este sentido, se han atribuido numerosos efectos beneficiosos a cepas de la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* en relación con el tratamiento o prevención de sobrepeso y obesidad así como con sus enfermedades asociadas. El documento de patente estadounidense US2011027348 describe el microorganismo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (no especifica una cepa en concreto), con actividad frente a inflamación, síndrome metabólico, obesidad e hipertensión.

Además, otros ejemplos concretos en este mismo ámbito de aplicación son las cepas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B420 y Bb12.

- 45 Así, el artículo con título "*Study of Danisco probiotics shows positive impact on metabolic syndrome (MetS)*", Food Engineering & Ingredients, 2010, Vol. 35, Issue 2, p.9, DuPont, describe la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B420 y su actividad frente a síndrome metabólico, inflamación, endotoxemia metabólica, etc.

Igualmente, el documento de patente estadounidense US20120107291 describe la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* B420 con actividad frente a diabetes, síndrome metabólico, obesidad, inflamación de tejidos, etc.

5 De acuerdo con la información contenida en dicha solicitud de patente, la cepa B420 actúa influenciando de forma positiva el sistema inmune a través del tejido linfoide asociado al intestino y muestra capacidad para inducir una mejora en la tolerancia a la glucosa, la reducción del tejido adiposo mesentérico, la reducción en los índices de inflamación, etc. No obstante, en la información disponible respecto a esta cepa no se contiene mención alguna respecto a una posible capacidad para inducir reducción de apetito o aumento de efecto saciante así como capacidad antioxidante de la cepa.

10 La referencia no patente con título "*Bifidobacterium lactis* Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial", Holscher et al., describe la cepa *Bifidobacterium lactis* Bb12 y su actividad frente a la pérdida de función inmune.

15 El documento de patente estadounidense US2008267933 describe la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 con actividad frente al control de peso y obesidad a través de la inducción de efecto saciante, la mejora del metabolismo energético, la mejora de la sensibilidad a la insulina, el síndrome metabólico, etc. Los efectos producidos por esta cepa pueden ser el resultado de la sobreexpresión de ciertos genes relacionados con el metabolismo energético -grasa, azúcar e insulina además de la saciedad-, tales como Scd1, Acrp30, Adn, Thrsp, Car3 y ApoA-4. No obstante, en la información disponible respecto a esta cepa no se contiene mención alguna respecto a una posible capacidad antioxidante de la cepa.

20 En relación a la capacidad antioxidante de las bacterias, la solicitud de patente WO2011083353 describe un método que emplea *Caenorhabditis elegans* para el cribado y selección de bacterias que tienen efecto protector frente al estrés oxidativo. Sin embargo, en este documento las cepas de *Bifidobacterium* ensayadas no confirieron resistencia al estrés oxidativo. Únicamente unas pocas cepas de *Streptococcus* y *Lactobacillus* fueron capaces de conferir resistencia al estrés oxidativo.

25 Por tanto, el problema técnico de la presente invención se refiere a la provisión de nuevos microorganismos con capacidad para ser utilizados como ingredientes en formulaciones farmacéuticas y alimentarias con mejor actividad terapéutica y/o preventiva frente al sobrepeso y la obesidad así como a sus enfermedades asociadas.

30 Dicho problema técnico se ha resuelto con la provisión de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* depositada el 14/05/12 con número de acceso: CECT8145 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Parc Científic Universitat de Valencia, c/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna – Valencia, España, según las disposiciones del Tratado de Budapest, así como composiciones alimenticias y farmacéuticas que la contengan.

35 A diferencia de las cepas de la misma especie conocidas del estado de la técnica, la cepa de la presente invención, así como las composiciones alimenticias y farmacéuticas que las contengan, además de reducir la grasa corporal, presentan capacidad para inducir saciedad y reducir el apetito y aumentar la capacidad de resistencia al estrés oxidativo en mamíferos tras su ingesta. Adicionalmente, la cepa de la presente invención, así como las composiciones alimenticias y farmacéuticas que las contengan reducen la concentración de colesterol total y triglicéridos en sangre, además de reducir la concentración de glucosa y algunos marcadores de inflamación. Todo ello lleva a concluir que los efectos de la cepa de la presente invención, así como las composiciones alimenticias y farmacéuticas que las contengan, en el control del sobrepeso, esto es, en el tratamiento y/o prevención de la obesidad y las enfermedades asociadas es efectiva y superior a otras cepas de la misma especie conocidas del estado de la técnica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

45 La presente invención se refiere a una nueva cepa de la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, depositada el 14/05/12 con número de acceso: CECT8145 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Parc Científic Universitat de Valencia, c/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna – Valencia, España, según las disposiciones del Tratado de Budapest, los compuestos bioactivos, los sobrenadantes y los cultivos comprendiendo la cepa, los extractos que contengan los compuestos bioactivos, los sobrenadantes y/o los cultivos, y la cepa y la formulación de cualquiera de ellos en composiciones alimenticias y farmacéuticas.

50 La cepa de la invención, así como los productos comprendiendo la misma objeto de la presente invención, actúan modulando la expresión diferenciada de ciertos genes que inciden de forma positiva en la reducción de grasa corporal, lo cual hace especialmente efectiva a la cepa de la presente invención en el tratamiento y/o prevención del

sobrepeso y/o la obesidad así como las enfermedades asociadas, tales como: síndrome metabólico, hipertensión, glucemia, inflamación, diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, hipercolesterolemia, alteraciones hormonales, infertilidad, etc.

5 Tras su ingesta en mamíferos, la cepa de la presente invención actúa reduciendo la grasa corporal, el peso, el nivel de triglicéridos totales, el colesterol total, la glucosa, el factor TNF α e incrementando la adiponectina. Adicionalmente, produce un aumento de la saciedad, tal y como se desprende de la reducción en los niveles de grelina, y aumenta la resistencia al estrés oxidativo, tal y como se demuestra a través de una reducción en la concentración de malondialdehído en mamíferos tratados con la cepa de la presente invención.

10 El estudio transcriptómico de la cepa de la presente invención muestra que la ingesta de la cepa induce un incremento en rutas y procesos metabólicos relacionados con el metabolismo de carbohidratos (entre otros, fosforilación oxidativa y síntesis de ATP), el metabolismo del glutatión (reducción de los niveles de estrés oxidativo), la biosíntesis de cofactores y vitaminas, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de nucleótidos, la glicosilación y el metabolismo de membrana.

15 Además, tal y como se confirma a partir del estudio metabólico realizado con la cepa de la presente invención y detallado en la parte de experimental de la memoria de patente, la ingesta de esta cepa induce una serie de cambios metabólicos relacionados con el metabolismo antioxidante y con el metabolismo de carbohidratos y nucleótidos. Se identifica el metabolismo del glutatión como una diana de la presente cepa para reducir los niveles de estrés oxidativo y se destaca también un incremento en la actividad de la ruta de las pentosas fosfato y en la glicosilación, siendo también aparentes diversas alteraciones en el metabolismo del glucógeno, de los nucleótidos, de los lípidos y
20 de los cofactores.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es un microorganismo así como las composiciones alimenticias y farmacéuticas que lo contengan, con utilidad en el tratamiento y prevención en mamíferos del sobrepeso y la obesidad así como sus enfermedades relacionadas.

25 Dicho microorganismo se refiere, en concreto, a una nueva cepa de la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, depositada el 14/05/12 con número de acceso: CECT8145 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Parc Científic Universitat de Valencia, c/ Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna – Valencia, España, según las disposiciones del Tratado de Budapest.

30 En la presente memoria de solicitud de patente, la cepa de la invención *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT8145 aparecerá también referida con la denominación BIF-1.

A los efectos de la presente invención, los términos “enfermedades relacionadas o asociadas” y “enfermedades causadas por el sobrepeso y/o la obesidad” comprenden: síndrome metabólico, hipertensión, glucemia, inflamación, diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, hipercolesterolemia, alteraciones hormonales, infertilidad, etc.

35 A los efectos de la presente invención, se entiende por productos bioactivos que comprenden la cepa de la presente invención, tanto componentes celulares, compuestos y moléculas que formen parte de la cepa, como los metabolitos y las moléculas secretadas por la misma, tales como: componentes intracelulares (por ej., ADN, péptidos, ácidos grasos, etc.) como componentes de la pared celular (proteínas, péptidos, ácidos grasos, etc.) que confieran la actividad preventiva o terapéutica deseada y que además comprendan la cepa de la invención.

40 Se entiende por composición alimenticia, los alimentos funcionales, probióticos, sinbióticos, suplementos dietéticos y/o nutracéuticos que incorporan la cepa de la presente invención, los productos bioactivos, el sobrenadante y/o el extracto y/o el cultivo comprendiendo la misma.

45 En el contexto de la presente invención, se entiende por composiciones farmacéuticas aquellas que incorporan la cepa de la presente invención, los productos bioactivos, el sobrenadante y/o el extracto y/o el cultivo que comprenden la misma junto con, al menos, un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables a utilizar en la presente invención son conocidos en el estado de la técnica para un experto en la materia.

Los inventores de la presente invención han conseguido identificar una nueva cepa CECT8145 de la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* que posee actividades biológicas novedosas frente a otras cepas de la misma especie pertenecientes al estado de la técnica, que la hacen especialmente efectiva en el tratamiento y/o prevención

del sobrepeso y/o la obesidad así como de enfermedades causadas por y/o relacionadas con el sobrepeso y/o la obesidad.

5 Estudios genómicos comparativos entre la cepa de la presente invención y otras cepas pertenecientes a la misma especie del estado de la técnica, en concreto, las cepas B420 y Bb12, demuestran que la cepa de la presente invención presenta regiones y genes que son únicos en ella y no tienen homólogos correspondientes en las otras dos cepas. En concreto, y a partir de los estudios genómicos realizados, se ha podido determinar que la cepa de la presente invención, a diferencia de las cepas B420 y Bb12, no tiene genes con función molecular de unión a lípidos ("lipid-binding").

10 Una de las actividades biológicas novedosas en la cepa de la presente invención es su actividad antioxidante y, en definitiva, la capacidad de aumentar la resistencia al estrés oxidativo.

15 El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes del organismo responsable de la detoxificación de dichos radicales. En pacientes obesos, el estrés oxidativo no se genera por un único mecanismo, sino por la confluencia de varios factores que, en definitiva, se pueden resumir como una disminución de agentes antioxidantes de forma paralela a un aumento de elementos pro-oxidantes. Diversos estudios avalan la existencia de una relación directa entre la obesidad y una reducción de la actividad de las principales enzimas antioxidantes.

La actividad biológica de resistencia al estrés oxidativo inducida por la cepa de la presente invención se demuestra a través de una reducción en la concentración de malondialdehído en mamíferos tratados con la cepa de la presente invención (figura 16).

20 El malondialdehído es un marcador indicativo del grado de oxidación a nivel corporal; a mayor grado de oxidación, se incrementa el nivel de este marcador y se produce una menor protección frente a estrés oxidativo; y viceversa.

En la figura 5 se demuestra, mediante la supervivencia en *Caenorhabditis elegans*, un incremento de protección frente a estrés oxidativo.

25 Otra de las actividades biológicas novedosas de la cepa de la presente invención es la capacidad para inducir un aumento de saciedad tras su ingesta, disminuyendo los niveles de grelina (figura 17).

30 Actualmente, la grelina es la única hormona circulante con potencial para aumentar o estimular el apetito y, en consecuencia, actúa como reguladora del hambre y del peso corporal. Es un neuropéptido gastrointestinal (ligando endógeno del receptor del secretagogo de la GH) aislado recientemente de la mucosa oxíntica producida principalmente en el estómago. Su concentración sanguínea depende de la dieta, la hiperglucemia y la adiposidad y la leptina. Se secreta 1-2 horas antes de la comida y su concentración disminuye drásticamente después de comer. Actúa en hipotálamo lateral y, teóricamente, inhibe la secreción de citoquinas proinflamatorias y antagoniza a la leptina. La grelina, fisiológicamente, aumenta la secreción ácida gástrica y tiene otras funciones hormonales y cardiovasculares.

35 La cepa de la presente invención es capaz de disminuir los niveles de grelina, induciendo un incremento de saciedad.

Adicionalmente, la cepa de la presente invención actúa reduciendo el nivel de triglicéridos totales, colesterol, glucosa, factor TNF α , e incrementando los niveles de adiponectina (figuras 12, 9, 13, 14 y 15, respectivamente).

40 De forma ventajosa, se ha podido constatar que los niveles de reducción de grasa corporal alcanzados por la cepa de la presente invención son sorprendentemente superiores a los niveles alcanzados a través de otras cepas del género *Bifidobacterium* y, en especial, con respecto a la cepa comercial perteneciente a la misma especie denominada *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (figura 2).

45 Los resultados ilustrados en el ejemplo 1 de la presente memoria confirman que la ingesta de la cepa de la presente invención provoca en el nematodo *Caenorhabditis elegans* una reducción de grasa corporal en, al menos, un 40% respecto a condiciones de alimentación estándar. Comparativamente a la reducción de grasa corporal producida por otras cepas de la misma especie conocidas del estado de la técnica y, en concreto, de la cepa Bb12, la cepa de la presente invención es capaz de producir un efecto reductor de grasa corporal superior al 28,5% respecto a esta cepa Bb12; lo cual demuestra una mayor efectividad de la cepa BIF-1 de la presente invención frente a cepas de su misma especie.

Del mismo modo, cuando la cepa de la presente invención es incorporada a un producto alimenticio, como por ejemplo, yogur, soja fermentada o zumo, su efecto sobre la reducción de grasa corporal es superior al 11%, en comparación al efecto producido por un alimento convencional, ya sea yogur, soja fermentada o zumo. (figuras 20, 21 y 22).

- 5 Según se detalla en la parte experimental aportada a modo de ejemplo, el estudio transcriptómico muestra que la ingesta de la cepa de la presente invención induce un incremento en rutas y procesos metabólicos relacionados con el metabolismo de carbohidratos (entre otros, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP), el metabolismo del glutatión (reducción de los niveles de estrés oxidativo), la biosíntesis de cofactores y vitaminas, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de nucleótidos, la glicosilación y el metabolismo de membrana.
- 10 Además, tal y como se confirma a partir del estudio metabolómico realizado y detallado en la parte experimental de la memoria de patente, la ingesta de esta cepa induce una serie de cambios metabólicos relacionados con el metabolismo antioxidante y con el metabolismo de carbohidratos y de nucleótidos. Se identifica el metabolismo del glutatión como una diana de la presente cepa para reducir los niveles de estrés oxidativo y se destaca también un incremento en la actividad de la ruta de las pentosas fosfato y en la glicosilación, siendo también aparentes diversas alteraciones en el metabolismo del glucógeno, de los nucleótidos, de los lípidos y de los cofactores. Dichos cambios metabolómicos confirman las actividades biológicas de reducción de grasa corporal y protección frente a estrés oxidativo inducidas por la cepa de la presente invención.
- 15

Estos resultados se han podido confirmar a través de un ensayo realizado con mutantes del nematodo *C. elegans* según se detalla en el ejemplo 8, que ha permitido identificar diversos genes que se hallan diferencialmente expresados tras la ingesta de la cepa BIF-1 de la presente invención y que explicarían las actividades biológicas proporcionadas por la cepa, así como su superior efectividad frente al sobrepeso y la obesidad.

20

En concreto, se han identificado los genes diferencialmente expresados como los siguientes: Acox-1, Acs-5, Daf-22, Fat-7, Daf-16, Sod-4, Trxr-2, Asg-2 y Tph-1.

25 Los genes Acox-1, Acs-5 y Daf-22 codifican para enzimas de la beta oxidación de ácidos grasos en peroxisoma; los genes Fat-7 y Daf-16 codifican para enzimas que actúan en el proceso de desaturación de los ácidos grasos; los genes Sod-4, Trxr-2 y Asg-2 codifican para enzimas involucradas en mantener el balance celular redox y eliminar especies reactivas del oxígeno; el gen Asg-2, por sí solo, codifica para una enzima involucrada en procesos de fosforilación oxidativa; y el gen Tph-1 codifica para una enzima implicada en el metabolismo del triptófano y, por tanto, en la síntesis de serotonina.

30 La cepa de la presente invención y los productos bioactivos comprendiendo la misma, así como los sobrenadantes, los cultivos y/o los extractos comprendiendo la cepa, pueden formularse e incorporarse, de forma individual o en combinación con otros microorganismos y/o ingredientes funcionales, a composiciones alimenticias así como a composiciones farmacéuticas, para ser utilizados de acuerdo con la presente invención.

35 Cuando la cepa de la presente invención se incorpora en combinación con otros microorganismos, éstos pertenecen preferiblemente a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y/o *Kluyveromyces*, como por ejemplo: *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. paraplantarum*, *L. reuteri*, *St. thermophilus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *K. lactis*, y *K. marxianus*.

40 La presente invención también se refiere a una composición que incorpora los compuestos bioactivos comprendiendo la cepa de la presente invención, los sobrenadantes y/o los cultivos que comprenden la cepa, así como los extractos comprendiendo la cepa de la invención.

45 Las composiciones de la presente invención, que incorporan la cepa de la presente invención y/o los productos bioactivos y/o los sobrenadantes y/o los cultivos y/o los extractos comprendiendo la cepa, pueden ser composiciones alimenticias o farmacéuticas.

Dichas composiciones alimenticias o farmacéuticas puede presentarse en forma líquida o sólida, incluyendo pero no limitándose a, cápsulas y/o comprimidos.

50 Las composiciones alimenticias y/o farmacéuticas de la presente invención incorporan la cepa de la presente invención en una cantidad de entre 10^5 ufc y 10^{12} ufc por gramo o mililitro de la composición y, preferiblemente, entre 10^7 y 10^{11} ufc/g o ufc/ml.

5 Cuando las composiciones alimentarias y/o farmacéuticas de la presente invención incorporan los compuestos bioactivos comprendiendo la cepa de la presente invención, tales como sobrenadantes, extractos, péptidos, etc., estos se incorporan a la composición en una proporción de entre 0,01 – 99% en peso sobre el total de la composición y, preferiblemente, en una proporción de entre 0,01 – 40%. De forma preferente, las composiciones alimenticias que incorporan la cepa de la presente invención, así como los compuestos bioactivos, los sobrenadantes, los extractos de cultivo y/o el cultivo comprendiendo la cepa, pueden seleccionarse del grupo que comprende: zumos de frutas o vegetales, helados, formulaciones infantiles, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, cereales, productos de repostería, productos en base a leche y/o cereales, complementos nutricionales, bebidas refrescantes y/o suplementos dietéticos, etc.

10 Los productos alimenticios lácteos a los cuales hace referencia la presente invención, tales como leche fermentada, quesos frescos o yogures o sus equivalentes, secados o liofilizados, representan de forma preferente sistemas de suministro adecuados que incorporan la cepa de la presente invención y/o los compuestos bioactivos y/o los sobrenadantes y/o los extractos y/o el cultivo comprendiendo la cepa.

15 La cepa de la presente invención y/o los compuestos bioactivos y/o los sobrenadantes y/o los extractos y/o el cultivo comprendiendo la cepa pueden, en su caso, ser envasados en cápsulas de celulosa o gelatina, capsulas de gel o comprimidos, entre otros, con fines alimentarios y farmacéuticos.

La cepa de la invención, así como las composiciones que la contengan, están especialmente destinadas para ser utilizadas en mamíferos, esto es, animales y humanos, para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad y las enfermedades relacionadas.

20 Son por tanto objetos de la presente invención la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT8145, composiciones alimenticias y farmacéuticas que la comprendan, en forma activa e inactiva, y opcionalmente en combinación con otros microorganismos. La presente descripción también se refiere a un método para el tratamiento y/o prevención en mamíferos del sobrepeso y/o la obesidad así como enfermedades asociadas, tales como: síndrome metabólico, hipertensión, glucemia, inflamación, diabetes tipo II, enfermedades cardiovasculares, hipercolesterolemia, alteraciones hormonales e infertilidad, caracterizado por comprender la administración de una cantidad eficaz de la cepa de la invención *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT8145 así como de las composiciones alimenticias y farmacéuticas que la contengan de acuerdo con la presente invención

30 En el contexto de la presente descripción es también un objeto de la descripción un método para la reducción de peso, colesterol total, triglicéridos y glucosa en sangre, niveles de factor TNF α , malondialdehído y grelina, así como incremento de adiponectina en mamíferos, caracterizado por comprender la administración de una cantidad eficaz de la cepa de la invención *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT8145, así como de las composiciones alimenticias y farmacéuticas que la contengan de acuerdo con la presente invención.

En este sentido, es importante destacar que la presente invención contempla la utilización de la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145, tanto en su forma de célula viable como no viable (figura 4).

35 Las células no viables de la invención, inactivadas por distintos procedimientos (congelación, calor, radiación, etc.), pueden utilizarse según la presente invención y forman parte de la presente invención, ya que los efectos deseados son ejercidos, al menos, en parte, por componentes estructurales (como ADN, componentes de la pared celular, etc.). Esto hace posible que la cepa de la presente invención mantenga parte de las propiedades frente a síndrome metabólico y enfermedades relacionadas sin que mantenga necesariamente la viabilidad. Así, tal y como se muestra en el ejemplo 4, un cultivo inactivado de la cepa de la presente invención reduce la grasa corporal en el modelo animal *C. elegans*; lo cual podría inducir a pensar que el efecto funcional no se debe solamente al metabolismo de la cepa, sino a la presencia de ciertos compuestos en la pared celular.

Se aportan a continuación las siguientes figuras y ejemplos al objeto de ilustrar la presente invención. En ningún caso se pretende que sean limitativos de la presente invención.

45 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Escrutinio de 23 cepas del género *Lactobacillus* sobre la reducción de grasa corporal en *C. elegans*.

Figura 2: Escrutinio de 15 cepas del género *Bifidobacterium* sobre la reducción de grasa corporal en *C. elegans*.

Figura 3: Cuantificación de triglicéridos en *C. elegans* N2 alimentado con la cepa CECT8145 (BIF-1) o sometidos a dieta estándar (medio NG).

- Figura 4: Efecto sobre la reducción de grasa en *C. elegans* de un cultivo de la cepa CECT8145 (BIF-1) inactivado a 70°C “overnight”.
- Figura 5: Actividad antioxidante de la cepa CECT8145 (BIF-1) estimada tras aplicar un estrés oxidativo con agua oxigenada a *C. elegans* (N2).
- 5 Figura 6: Reducción de grasa corporal respecto a *C. elegans* (N2; cepa salvaje) y mutantes.
- Figura 7: Determinación de peso corporal en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día (■) de la cepa CECT8145 (BIF-1) durante las 17 semanas del ensayo. Se incluye un grupo control de ratas Zucker obesas (●) y el grupo de ratas Zucker delgadas (○).
- 10 Figura 8: Ingesta sólida observada en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día (■) de la cepa CECT8145 (BIF-1). Se incluye un grupo control de ratas Zucker obesas (●) y el grupo de ratas Zucker delgadas (○).
- Figura 9: Colesterol total determinado en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- 15 Figura 10: Colesterol HDL determinado en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- Figura 11: Ratio Colesterol total/Colesterol HDL (Índice de Riesgo Cardiovascular) determinado en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- 20 Figura 12: Concentración de triglicéridos determinado en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- Figura 13: Concentración de glucosa determinada en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- 25 Figura 14: Niveles de TNF α (marcador de inflamación) determinados en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- Figura 15: Niveles de adiponectina determinados en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- 30 Figura 16: Concentración de malondialdehído (marcador de oxidación) determinado en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- Figura 17: Niveles de grelina (marcador de apetito) determinados en ratas Zucker obesas tratadas con 10^{10} UFC/día de la cepa CECT8145 (BIF-1) (barra gris), respecto a ratas Zucker control (barra negra). Se incluye el control de ratas Zucker delgadas (barra blanca).
- 35 Figura 18: Resistencia de la cepa BIF-1 a pHs ácidos.
- Figura 19: Resistencia de la cepa BIF-1 a sales biliares.
- 40 Figura 20: El yogur fermentado con la cepa BIF-1 produce mayor reducción de grasa corporal en *C. elegans* (11,4%) que el yogur convencional comercial.
- Figura 21: Efecto reductor de grasa en *C. elegans* de leche de soja fermentada con la cepa BIF-1.
- Figura 22: Efecto reductor de grasa en *C. elegans* de zumo con la cepa BIF-1 viva e inactiva.

EJEMPLO 1

Escrutinio de bacterias sobre la reducción de grasa corporal en *Caenorhabditis elegans*.

5 Se realizó un escrutinio de 23 cepas del género *Lactobacillus* y 15 cepas del género *Bifidobacterium* para analizar su efecto sobre la reducción de grasa corporal en el nematodo *Caenorhabditis elegans* tras su ingesta. Se incluyeron dos cepas comerciales en el estudio, LGG (*Lactobacillus rhamnosus*) y Bb12 (*B. animalis* subsp. *lactis*).

10 *Caenorhabditis elegans* acumula grasa en forma de gotas que pueden ser visualizadas mediante tinción con Rojo Nilo (fluorescente). La fluorescencia emitida por dicho colorante se puede cuantificar por fluorimetría. Por tanto, la evaluación del efecto de los distintos microorganismos sobre la acumulación de grasa corporal en el nematodo, se ha llevado a cabo analizando la reducción de fluorescencia en gusanos alimentados con los distintos microorganismos con respecto a gusanos alimentados en condiciones control (medio NG + *Escherichia coli*).

Los ensayos han consistido en alimentar a *C. elegans* con los distintos microorganismos desde la fase huevo a la fase de adulto joven (3 días). La alimentación estándar del nematodo ha sido el medio NG, que contenía un césped de la bacteria *Escherichia coli*.

15 La tinción de las gotas de grasa se ha realizado mediante adición directa del colorante Rojo Nilo a las placas de medio NG. Los nematodos se incubaron a 20°C en las distintas condiciones durante la duración del ensayo, y tras el periodo de ingesta, se tomaron muestras de cada condición y se cuantificó la fluorescencia emitida en cada caso. Se ha tomado la condición de alimentación control (medio NG + *Escherichia coli*) como referencia para cuantificar la fluorescencia en el resto de condiciones.

20 La Figura 1 muestra los resultados obtenidos con las cepas de *Lactobacillus* en la reducción de grasa corporal de *C. elegans* (expresados como porcentaje de reducción de fluorescencia cuantificada en gusanos teñidos con el colorante Rojo Nilo). El mayor porcentaje de reducción de grasa lo proporcionó la cepa LAC-1 (32,4% respecto a condiciones de alimentación estándar).

25 La Figura 2 muestra el escrutinio de cepas del género *Bifidobacterium*. La cepa más efectiva en la reducción de grasa corporal fue BIF-1 (40,5% respecto a condiciones de alimentación estándar)

En base a los resultados obtenidos con las 38 cepas analizadas, se seleccionó la cepa *Bifidobacterium* BIF-1 como la más efectiva frente a reducción de grasa, por lo que se procedió a una mayor caracterización funcional y tecnológica de la misma.

30 **EJEMPLO 2**

Identificación taxonómica y secuenciación genómica

2.1. Identificación

35 La identificación inequívoca de la cepa BIF-1 se realizó a nivel de género y especie mediante secuenciación del ADN ribosómico (ADNr) 16S. La secuencia obtenida permitió su identificación mediante la comparación de la secuencia de la cepa BIF-1 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>), obteniéndose la mayor homología (99%) con las secuencias públicas pertenecientes a la especie *B. animalis* subsp. *lactis*.

2.2. Secuenciación del genoma

40 Con el objetivo de caracterizar a nivel genómico tanto la seguridad como la funcionalidad de la cepa BIF-1, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo de la cepa BIF-1 mediante pirosecuenciación en la plataforma 454 Life Science-Roche. Tras la secuenciación, se obtuvieron un total de 434581 secuencias crudas. El ensamblaje *de novo* posterior permitió organizar las secuencias en 5 scaffolds, siendo el de mayor tamaño de 1.923.368 nucleótidos. El tamaño del genoma de la cepa BIF-1 se ha estimado en 2,1 Mb. No se ha detectado la presencia de genes que codifiquen para factores de virulencia, ni genes de resistencia a antibióticos localizados en zonas con riesgo de
45 transferencia horizontal.

EJEMPLO 3

Cuantificación de la reducción de triglicéridos en *C. elegans* tratado con BIF-1

Se analizó el efecto de la ingesta de la cepa BIF-1 sobre la reducción de triglicéridos en la cepa salvaje N2 de *C. elegans*.

5 La determinación de triglicéridos se realizó a partir de poblaciones sincronizadas de *C. elegans* en fase adulto joven. Los nematodos de cada condición se lavaron en tampón PBS y se sonicaron para su lisado. Las muestras lisadas se utilizaron para determinar los triglicéridos totales mediante un kit comercial basado en una determinación fluorimétrica. Todas las muestras se normalizaron en cuanto a concentración de proteína.

10 La Figura 3 muestra la cuantificación de triglicéridos en nematodos con alimentación estándar (medio NG) o alimentados con la cepa BIF-1. Se observó una reducción de los triglicéridos totales en nematodos alimentados con la bifidobacteria BIF-1.

EJEMPLO 4

Reducción de grasa corporal en *C. elegans* con cultivo inactivado de BIF-1

15 Se analizó el efecto funcional sobre la reducción de grasa en *C. elegans* tras inactivar a la cepa BIF-1 mediante tratamiento térmico de 70°C durante 18 horas.

Los ensayos consistieron en alimentar a *C. elegans* con la cepa BIF-1 activada e inactivada desde la fase huevo a la fase de adulto joven (3 días). La alimentación estándar del nematodo se llevó a cabo en medio NG, que contenía un césped de la bacteria *Escherichia coli*.

20 La tinción de las gotas de grasa se realizó mediante adición directa del colorante Rojo Nilo a las placas de medio NG. Los nematodos se incubaron a 20°C en las distintas condiciones durante la duración del ensayo, y tras el periodo de ingesta, se tomaron muestras de cada condición y se cuantificó la fluorescencia emitida en cada caso. Se tomó la condición de alimentación control (medio NG + *Escherichia coli*) como referencia para cuantificar la fluorescencia en el resto de condiciones.

25 Los resultados (Figura 4) mostraron que la cepa inactivada a 70°C mantenía el efecto reductor de grasa en el nematodo, observándose el mismo porcentaje de fluorescencia que con el cultivo fresco.

EJEMPLO 5

Actividad antioxidante de la cepa BIF-1 en *C. elegans*

Se analizó si la ingesta de la cepa BIF-1 producía en *C. elegans* (N2) una mayor resistencia al estrés oxidativo agudo.

30 Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita por Martorell y colaboradores (2011). Se utilizó la cepa salvaje N2 de *C. elegans*. Los ensayos incluyeron una condición control (medio NG al que se adicionó en césped la cepa de *E. coli* OP50) y la cepa BIF-1. Los ensayos se iniciaron con poblaciones de nematodos sincronizados en edad, que se cultivaron en placas de NG con las distintas condiciones de alimentación. Las placas se incubaron a 20°C durante 7 días. Tras este periodo, se aplicó un estrés oxidativo con H₂O₂ (2 mM), y se determinó la viabilidad de los nematodos tras 5 horas de incubación. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos en supervivencia de nematodos tras aplicar un estrés con agua oxigenada. Los nematodos alimentados durante 7 días con BIF-1 fueron mucho más resistentes al estrés oxidativo, ya que se contabilizó una supervivencia mayor que en la población sometida a alimentación estándar.

EJEMPLO 6

40 Estudio transcriptómico en *C. elegans* con la cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BIF-1

Se estudió el efecto de la ingesta de *B. animalis* subsp. *lactis* BIF-1 sobre el transcriptoma de *C. elegans*. Mediante tecnología de "chips", se estudiaron los cambios en la expresión génica, en rutas metabólicas y en procesos

biológicos de nematodos alimentados con BIF-1 frente a nematodos con alimentación estándar. En el análisis estadístico, el nivel de significancia utilizado fue de $P \leq 0,05$.

6.1. Expresión génica diferencial en nematodos tratados con BIF-1

- 5 Se determinó que los nematodos alimentados con la cepa BIF-1 presentaban un perfil de expresión génica diferente a los nematodos con alimentación control. Así, presentaron 296 genes sobre-expresados y 26 genes reprimidos respecto a los nematodos control (Tabla 1).

Tabla 1. Expresión génica diferencial observada en *C. elegans* alimentado con la cepa BIF-1.

	Nº genes reprimidos	Nº genes sin expresión diferencial	Nº genes sobre-expresados	10
Tratado BIF-1 vs. Control	26	22303	296	

- 15 El escrutinio de los 296 genes que aparecían sobre-expresados en presencia de BIF-1 reveló distintas agrupaciones funcionales. Así, dichos genes están relacionados con proteólisis, reproducción, desarrollo embrionario, metabolismo de carbohidratos, ciclo de muda, morfogénesis corporal, locomoción, procesos de óxido-reducción, metabolismo de proteínas, transporte, metabolismo de glutatión, metabolismo de aminoácidos aromáticos, respuesta a la radiación gamma, metabolismo de ácidos grasos y rutas de señalización de neuropéptidos.
- 20 En cuanto a los 26 genes reprimidos en *C. elegans* tratados con BIF-1, éstos están relacionados mayoritariamente con la regulación positiva del crecimiento.

6.2. Rutas metabólicas

En cuanto a las rutas metabólicas, se determinó que los nematodos alimentados con BIF-1 presentaban 23 rutas metabólicas sobre-expresadas y 20 reprimidas respecto a nematodos con alimentación control (Tabla 2).

- 25 Las Tablas 3 y 4 muestran el listado de las correspondientes rutas metabólicas reguladas al alza o a la baja tras el tratamiento con la bifidobacteria BIF-1.

Tabla 2. Número de rutas metabólicas diferencialmente expresadas en *C. elegans* alimentado con la cepa BIF-1.

	NºRutas metabólicas reprimidas	NºRutas metabólicas afectadas	NºRutas metabólicas no sobre-expresadas	30
Tratado BIF-1 vs. control	20	55	23	

Tabla 3. Lista de rutas metabólicas sobre-expresadas en *C. elegans* tras el tratamiento con BIF-1 respecto a alimentación control. ID: identificación según base de datos KEGG.

ID KEGG	Rutas metabólicas sobre-expresadas en tratados BIF-1 vs. Control
00190	Fosforilación oxidativa
00480	Metabolismo Glutación
00982	Metabolismo fármacos-citocromo P450
00980	Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450
00983	Metabolismo fármacos – otras enzimas
00670	Biosíntesis folato (Metabolismo, cofactores y vitaminas)
04142	Lisosoma
00260	Metabolismo de glicinina, serina y treonina
00330	Metabolismo de arginina y prolina
00860	Metabolismo de porfirina y clorofila
00270	Metabolismo de cisteína y metionina
01040	Biosíntesis de ácidos grasos insaturados
00040	Interconversiones pentosa y glucuronato
04146	Peroxisoma
00590	Metabolismo ácido araquidónico
00053	Metabolismo ascorbato y aldarato
00514	Otros tipos de biosíntesis de O-glicano
00910	Metabolismo de nitrógeno
00250	Metabolismo de alanina, aspartato y glutamato
00380	Metabolismo del triptófano
00620	Metabolismo del piruvato
00650	Metabolismo del butanoato
00410	Metabolismo de beta-alanina

Tabla 4. Lista de rutas metabólicas reprimidas en *C. elegans* tras el tratamiento con BIF-1 respecto a alimentación control. ID: identificación según base de datos KEGG.

ID KGGE	Rutas metabólicas reprimidas en tratados BIF-1 vs. Control
04330	Ruta de señalización Notch
03440	Recombinación homóloga
04340	Ruta de señalización Hedgehog
03410	Reparación DNA dañado (Base excision repair)
04310	Ruta de señalización Wnt
03018	Degradación RNA
04710	Ritmo circadiano
04150	Ruta de señalización mTOR
03430	Reparación DNA dañado (Mismatch repair)
03420	Reparación de nucleótidos por escisión
03050	Proteosoma
03013	Transporte RNA
04350	Ruta de señalización TGF-beta
03015	Rutas de vigilancia de mRNA
03040	Spliceosoma
04120	Proteólisis mediada por ubiquitina
03030	Replicación DNA
04141	Procesado proteínas en retículo endoplasmático
04144	Endocitosis
04914	Maduración de oocitos mediada por progesterona

5 6.3. Procesos biológicos

Se determinó en nematodos alimentados con la cepa BIF-1 un total de 26 procesos biológicos regulados al alza y 76 procesos regulados a la baja respecto a nematodos con alimentación control (Tabla 5).

Tabla 5. Número de procesos biológicos diferencialmente expresados en *C. elegans* alimentado con la cepa BIF-1, frente a nematodos con alimentación control.

	GO Reprimidos	GO Sobreexpresados
Tratados BIF-1 vs. control	76	26

5

Las Tablas 6 y 7 muestran el listado detallado de los procesos sobre-expresados o reprimidos observados en nematodos tratados con BIF-1.

Tabla 6. Lista de los 26 procesos biológicos sobre-expresados en *C. elegans* tratado con BIF-1. GO: Gene Ontology (base de datos).

GO	Nombre
GO:0030259	Glicosilación de lípidos
GO:0006937	Regulación de la contracción del músculo
GO:0042775	Síntesis de ATP mitocondrial acoplado a cadena de transporte de electrones
GO:0009156	Procesos biosintéticos de ribonucleósido monofosfato
GO:0034220	Transporte transmembrana de iones
GO:0009072	Procesos de metabolismo de aminoácidos aromáticos
GO:0030241	Ensamblaje de miosina del músculo esquelético en filamentos gruesos
GO:0009112	Procesos de metabolismo de nucleobases
GO:0015992	Transporte de protones
GO:0006508	Proteolisis
GO:0040018	Regulación positiva del crecimiento de organismo multicelular
GO:0034607	Comportamiento implicado en apareamiento
GO:0007218	Ruta de señalización de neuropéptido
GO:0046942	Transporte de ácido carboxílico

GO:0072529	Procesos catabólicos de compuestos que contienen pirimidina
GO:0042398	Procesos biosintéticos de aminoácidos modificados
GO:0015833	Transporte de péptidos
GO:0006754	Procesos de biosíntesis de ATP
GO:0009063	Procesos catabolismo de aminoácidos celulares
GO:0048521	Regulación negativa del comportamiento
GO:0055074	Homeostasis del ion calcio
GO:0006637	Procesos del metabolismo de acyl-CoA
GO:0042338	Desarrollo de cutícula (ciclo de muda) basado en colágeno y cuticulina.
GO:0006814	Transporte de ion sodio
GO:0036293	Respuesta a niveles reducidos de oxígeno
GO:0009069	Procesos metabólicos de metabolismo de aminoácidos de la familia serina

Tabla 7. Lista de los 76 procesos biológicos regulados a la baja en *C. elegans* tratado con BIF-1. GO: Gene Ontology (base de datos).

GO	Nombre
GO:0016477	Migración celular
GO:0008406	Desarrollo gónadas
GO:0040027	Regulación negativa del desarrollo de la vulva
GO:0042127	Regulación proliferación celular
GO:0040020	Regulación de la meiosis
GO:0006511	Procesos catabólicos de proteínas dependientes de ubiquitina

ES 2 655 857 T3

GO:0045167	Localización asimétrica de proteínas implicada en destino celular
GO:0000070	Segregación de cromátidas hermanas en mitosis
GO:0051729	Ciclo celular germinal
GO:0007052	Organización de mitosis
GO:0007098	Ciclo del centrosoma
GO:0070918	Producción de pequeños RNA implicados en silenciamiento génico
GO:0045144	Segregación de cromátidas hermanas en mitosis
GO:0032465	Regulación de la citocinesis
GO:0000079	Regulación actividad proteína quinasa dependiente de ciclina
GO:0009410	Respuesta a xenobióticos
GO:0030261	Condensación cromosómica
GO:0007606	Percepción sensorial a estímulos químicos
GO:0035046	Migración pronuclear
GO:0090387	Ensamblaje fagolisosoma eliminación células apoptóticas
GO:0045787	Regulación positiva ciclo celular
GO:0006261	Replicación DNA
GO:0006898	Endocitosis mediada por receptores
GO:0001714	Destino celular
GO:0032320	Regulación positiva actividad GTPasa

ES 2 655 857 T3

GO:0000281	Citoquinesis después de mitosis
GO:0090068	Regulación positiva del ciclo celular
GO:0030703	Formación de envoltura del huevo
GO:0018991	Ovoposición
GO:0006997	Organización del núcleo
GO:0000132	Orientación del eje mitótico
GO:0040022	Línea germinal
GO:0006030	Metabolismo de quitina
GO:0032506	Citoquinesis
GO:0032880	Regulación localización proteínas
GO:0040015	Regulación negativa crecimiento organismo multicelular
GO:0045944	Regulación positiva transcripción
GO:0008630	Respuesta al daño a DNA
GO:0000122	Regulación negativa transcripción
GO:0043066	Regulación negativa apoptosis
GO:0010638	Regulación positiva organización orgánulo
GO:0000398	"Eliminación de intrones vía Spliceosoma
GO:0042464	Compensación de dosis por hipoactivación del cromosoma X
GO:0007127	Meiosis
GO:0042693	Destino células del músculo

ES 2 655 857 T3

GO:0032012	Regulación proteina ARF señal de trasducción
GO:0006310	Recombinación DNA
GO:0038032	Ruta de señalización de receptor acoplado a proteína G
GO:0016331	Morfogénesis de epitelio embrionario
GO:0007219	Ruta de señalización Notch
GO:0008356	División celular asimétrica
GO:0042026	Replegamiento de proteínas
GO:0007040	Organización de lisosoma
GO:0045595	Regulación de la diferenciación celular
GO:0032446	Modificación de proteínas por conjugación de proteínas pequeñas
GO:0034968	Metilación de histonas
GO:0008595	Especificación del eje anterior/posterior en embrión
GO:0001703	Gastrulación con formación de boca
GO:0042176	Regulación de catabolismo de proteínas
GO:0006606	Importe proteínas al núcleo
GO:0031114	Regulación de la depolimerización de microtúbulos
GO:0007411	Orientación axón
GO:0006200	Catabolismo de ATP
GO:0016055	Ruta de señalización del receptor Wnt
GO:0000212	Organización del eje mitótico

GO:0006911	Fagocitosis
GO:0046777	Autofosforilación de proteínas
GO:0035194	Silenciamiento génico post-transcripcional mediante RNA
GO:0032269	Regulación negativa del metabolismo de proteínas celulares
GO:0006289	Reparación por escisión de nucleótidos
GO:0006661	Biosíntesis de fosfatidil inositol
GO:0048557	Morfogénesis tracto digestivo embrionario
GO:0051295	Establecimiento de localización del eje meiótico
GO:0006906	Fusión de vesículas
GO:0030071	Regulación de la transición metafase/anafase mitótica
GO:0051053	Regulación negativa del metabolismo de DNA

5 En resumen, los resultados del estudio transcriptómico muestran que nematodos sometidos a dieta con la cepa BIF-1 presentan un incremento en rutas y procesos metabólicos relacionados con el metabolismo de carbohidratos (fosforilación oxidativa, síntesis ATP, etc.), metabolismo del glutatión (reducción de los niveles de estrés oxidativo), biosíntesis de cofactores y vitaminas, metabolismo de lípidos, metabolismo de nucleótidos, glicosilación y metabolismo de membrana.

EJEMPLO 7

10 Estudio metabólico en *C. elegans* con la cepa BIF-1

Se analizó el cambio en el perfil metabólico de *C. elegans* tras la ingesta de la cepa BIF-1 comparado con el perfil de nematodos con alimentación control (medio NG + *E. coli* OP50).

15 Los ensayos consistieron en alimentar a *C. elegans* con la cepa BIF-1 desde la fase huevo a la fase de adulto joven (3 días). La alimentación estándar del nematodo fue medio NG, que contenía un césped de la bacteria *Escherichia coli*.

Los nematodos obtenidos a este tiempo, fueron sometidos a un análisis metabólico mediante la aplicación de distintas técnicas analíticas, LC-MS/MS (+ESI) (-ESI) y GC-MS, y un posterior tratamiento bioinformático.

Los resultados mostraron cambios estadísticamente significativos, que se detallan a continuación:

- 5 - **Metabolismo del glutatión (GSH) y estrés oxidativo:** En el estudio, los niveles de γ -glutamileucina y γ -glutamilmetionina fueron mayores en nematodos alimentados con BIF-1 comparado con el grupo de alimentación control, lo que sería consistente con un posible incremento de la actividad γ -glutamyltransferasa (GGT), y por tanto, reciclaje de glutatión (GSH) en respuesta a BIF-1. Además, el oftalmolato, un metabolito que se utiliza para la síntesis de GSH, mostró un descenso significativo en el grupo alimentado con BIF-1, lo que es consistente con el descenso de biosíntesis de GSH. Esto se debe probablemente a una menor demanda de glutatión producida por un menor nivel de estrés oxidativo. Esto se refuerza con el hecho de observar menores niveles de GSSG (GSH oxidado) y cisteína-glutation disulfido, biomarcadores de estrés oxidativo, en el grupo alimentado con la cepa BIF-1.
- 10 - **Metabolismo de carbohidratos:** Muchos metabolitos que participan en el metabolismo de carbohidratos mostraron cambios en el grupo alimentado con BIF-1. Los niveles de maltotetraosa y maltopentosa mostraron altos niveles, mientras que la trealosa 6-fosfato y la glucosa mostraron menores niveles en el grupo alimentado con la cepa BIF-1 respecto a condiciones control. Otras rutas afectadas fueron el metabolismo del glucógeno y la ruta de las pentosas fosfato. Así, el 6-fosfogluconato, mostró un incremento significativo en el grupo BIF-1. Este hecho junto con los altos niveles de ribosa y bajos niveles de ribulosa-5 fosfato, serían consistentes con un posible incremento de la actividad de la ruta de las pentosas fosfato en presencia de BIF-1.
- 15 - **Metabolismo de nucleótidos:** Una de las consecuencias de los cambios observados en la actividad de la ruta de las pentosas fosfato es la alteración del metabolismo de nucleótidos. Los nematodos alimentados con BIF-1 mostraron mayores niveles de N-carbamoilaspartato y orotato, dos intermediarios de la síntesis de pirimidinas. También se observaron cambios similares en el metabolismo de las purinas. Así, la alantoína (producto de degradación de purinas) presentó niveles inferiores en nematodos tratados con BIF-1. Además, se determinaron niveles mayores de nucleósidos de purina (adenosina y guanosina), bases (adenina e hipoxantina) y nucleótidos [adenosina 5'-monophosphate (AMP) y guanosina 5'-monofosfate (GMP)] en el grupo tratado con BIF-1. Estos resultados junto con el incremento en precursores de aminoácidos (glutamato y glutamina) observado, y el posible incremento en la actividad de la ruta de pentosas fosfato, darían soporte a la idea de un incremento en la biosíntesis de purinas acompañadas con una disminución de la degradación de las mismas.
- 20 - **Metabolismo de membrana y colesterol:** Se observó en nematodos sometidos a alimentación con BIF-1 un incremento de colina y acetilcolina, que participan no sólo en procesos de glicosilación, sino también en el metabolismo de membrana. Además, el 7-dihidrocolesterol, un intermediario en la biosíntesis de colesterol, se encontró en niveles mayores en nematodos alimentados con BIF-1, lo que es consistente con el efecto de este probiótico sobre la modulación de la biosíntesis del colesterol. Cambios en el contenido de colesterol en la membrana podrían afectar al ambiente de los receptores, los canales de iones u otras proteínas de membrana, y por tanto alterar su función. Además, el metabolismo del colesterol afecta a procesos relacionados con lípidos y hormonas.
- 25 - **Observaciones adicionales:** BIF-1 produce en *C. elegans* un incremento de los niveles de fosfopanteteina, 3'-defosfocoenzima A y coenzima A (CoA). Además, también produce un aumento de flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenina dinucleótido (FAD), consistente con la regulación al alza de la biosíntesis de FAD. El CoA y FAD participan en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos.
- 30
- 35
- 40

45 En resumen, la alimentación con la cepa BIF-1 produce un serie de cambios metabólicos en *C. elegans* relacionados con el metabolismo antioxidante, metabolismo de carbohidratos y nucleótidos. El metabolismo del glutatión parece ser una diana del probiótico para reducir los niveles de estrés oxidativo. Además, la dieta con BIF-1 produce un incremento en la actividad de la ruta de las pentosas fosfato y en la glicosilación. Se observaron adicionalmente alteraciones en el metabolismo del glucógeno, nucleótidos, lípidos y cofactores.

Estos resultados concuerdan con los observados en el estudio transcriptómico (ejemplo 6).

EJEMPLO 8

Identificación de genes diferencialmente expresados

50 Con el objeto de explicar el mecanismo de acción a partir de los resultados de transcriptómica descrito en el ejemplo 6, se abordó un ensayo de reducción de grasa corporal en *C. elegans* alimentado con la cepa BIF-1. En este ensayo se utilizó tanto la cepa salvaje de *C. elegans* N2, como distintos mutantes en aquellos genes que se consideraron clave en el estudio transcriptómico. Un gen es clave en el mecanismo de acción de un determinado ingrediente,

cuando el efecto funcional observado en la cepa salvaje N2 de *C. elegans*, desaparece total o parcialmente. Los resultados que se indican en la tabla 8 abajo y Figura 6 permiten identificar algunos de los genes mutados diana en *C. elegans* y que se hallan diferencialmente expresados tras la ingesta de la cepa BIF-1 en *C. elegans* (estudio transcriptómico). Estos resultados permiten explicar las actividades biológicas asociadas a la ingesta de la cepa de la presente invención.

5

Tabla 8: Lista de genes mutados diana en *C. elegans*

ENSAYOS BIF 1 (<i>B. animalis</i> subsp <i>lactis</i> CECT 8145)		
Procesos biológicos	<i>C. elegans</i> (entre paréntesis: nombre del gen mutado)	OBESIDAD % reducción respecto a su control
	N2 Cepa salvaje	29.21
B-oxidación ac.grasos en peroxisoma	VC1785(Acox-1)	-15.36
	RB2015(Acs-5)	12.59
	RB859(Daf-22)	19.03
Desaturación ac.grasos	BX153(Fat-7)	0.56
	GR1307(Daf-16)	-2.63
Mecanismos homeostais REDOX	VC175(Sod-4)	3.63
	RB1764(Trxr-2)	-3.3
Fosforilación oxidativa	RB2434(Asg-2)	5.39
Metabolismo del triptofano	GR1321(Tph-1)	18,19

La Figura 6 ilustra de forma cuantitativa la proporción de reducción de grasa corporal en función de la expresión diferencial de los genes relacionados en la tabla 8.

10 **EJEMPLO 9**

Estudio pre-clínico en modelo murino

Se abordó un estudio en modelo de rata Zucker obesa, en el que se suministraron tres dosis distintas del probiótico BIF-1 (10^8 , 10^9 y 10^{10} UFC/día). El estudio incluyó como control dos grupos de ratas Zucker delgadas. La duración del ensayo fue de 12 semanas, determinándose el peso corporal, y también la ingesta sólida y líquida durante la duración del ensayo. Adicionalmente se realizaron determinaciones bioquímicas al final del ensayo: colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, factor TNF α (marcador inflamación), malondialdehído (marcador de estrés oxidativo), adiponectina y grelina (marcadores de saciedad).

15

Los resultados se muestran en las Figuras 7 a 17.

En resumen, los resultados del estudio pre-clínico en modelo murino mostraron un efecto positivo en la reducción de peso en ratas Zucker obesas alimentadas con el probiótico BIF-1 a la dosis de 10^{10} UFC/día (reducción de ganancia de peso de un 6,42% durante el tratamiento frente al grupo control). Además, los animales sometidos a dicha dieta presentaron una menor ingesta sólida. Por otra parte, la determinación de parámetros bioquímicos mostró una reducción de colesterol total, acompañado con un incremento del colesterol HDL. También se observó una ligera

20

tendencia reductora de triglicéridos y glucosa. Finalmente, el tratamiento con el probiótico BIF-1 dio lugar a una reducción de los niveles de factor TNF α , malondialdehído y grelina, así como un incremento de los niveles de adiponectina.

EJEMPLO 10

5 Estudio de seguridad

El estudio de seguridad de la cepa BIF-1 se realizó siguiendo las directrices marcadas por FAO/OMS (FAO/WHO, 2002). En concreto, se evaluó la producción de metabolitos indeseados: isómeros del ácido láctico (Tabla 9), capacidad de desconjugación de sales biliares (Tabla 10) y aminas biógenas (Tabla 11), y se obtuvo su perfil de resistencia a antibióticos (Tabla 12).

10

Tabla 9. Producción de isómeros de ácido láctico por la cepa BIF-1.

CEPA	Ácido láctico (g/L de sobrenadante)	
	D-Láctico	L-Láctico
BIF-1	0,020 \pm 0,000	2,158 \pm 0,025

Tabla 10. Capacidad de hidrólisis de sales biliares por la cepa BIF-1 (ND: no detectada).

CEPA	Actividad BSH (U.I./mg de proteína en el extracto celular)		Actividad BSH (U.I./ml de sobrenadante)	
	Glicocolato sódico	Tauocolato sódico	Glicocolato sódico	Tauocolato sódico
BIF-1	0,597 \pm 0,028	0,127 \pm 0,004	ND	0,0 \pm 0,0

Tabla 11. Producción de aminas biógenas por la cepa BIF-1 (ND: no detectada).

CEPA	Áminas biógenas (μ g/ml de sobrenadante)			
	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina
BIF-1	ND	ND	ND	0,38 \pm 0,14

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria de distintos antibióticos obtenida para la cepa BIF-1.

Antibiótico	CMI (µg/mL)
Gentamicina	64
Estreptomina	128
Eritromicina	0,5
Vancomicina	1
Ampicilina	2
Tetraciclina	8
Kanamicina	128
Cloranfenicol	4
Clindamicina	0,25

EJEMPLO 11Propiedades probióticas de la cepa BIF-1

Uno de los principales requerimientos de una cepa probiótica es que pueda permanecer viva durante el tránsito gastrointestinal. Por ello, la cepa BIF-1 se sometió a ensayos de resistencia a condiciones digestivas. En este punto, se realizaron dos ensayos, uno de resistencia a pHs bajos, y un ensayo de resistencia a sales biliares. En el primero, la cepa se puso en contacto con solución salina (0,09% NaCl) a pHs decrecientes durante 15 minutos y se evaluó el número de células presentes (Figura 18). En el segundo caso, se puso a la cepa BIF-1 en contacto 15 minutos con solución salina adicionada de sales biliares (Oxgall) en cantidades crecientes (Figura 19). No se observaron grandes diferencias de supervivencia a excepción de la incubación a pH 4 donde se detectó una ligera pérdida de viabilidad.

EJEMPLO 12Obtención de un yogur funcional con la cepa BIF-1 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145)

En un primer paso, se analizó la capacidad fermentativa de BIF-1 sobre la matriz láctea. Para ello, se inoculó un volumen de leche desnatada comercial con distintas dosis de la bacteria (10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/mL), incubando 24 h a 37°C. Los resultados mostraron una fermentación positiva del probiótico al inocular 10^7 ó 10^8 UFC/mL.

Posteriormente, se elaboró un yogur funcional adicionando 10^8 UFC/mL de la bifidobacteria BIF-1 y una mezcla de fermentos de yogur comercial sobre una base de leche desnatada comercial y leche en polvo (0,6%). Se incluyó en el estudio una fermentación control que únicamente contenía los fermentos de yogur comercial (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*). Mediante recuento en placa selectivo para *Bifidobacterium* se comprobó la presencia de la cepa BIF-1 al final de la fermentación.

Finalmente, con el yogur obtenido, se abordó un estudio funcional en el modelo pre-clínico de *C. elegans* para analizar su efecto sobre la reducción de grasa corporal. Los resultados mostraron que el yogur fermentado con la cepa BIF-1 producía una reducción de grasa corporal en *C. elegans* mayor (11,4%) que el yogur convencional comercial (Figura 20).

Además, se determinó el mismo grado de reducción de grasa en *C. elegans* alimentados con leche de soja fermentada con la cepa BIF-1 (Figura 21).

EJEMPLO 13:Obtención de un zumo con la cepa BIF-1 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145).

Se utilizó un zumo de naranja comercial suplementado con distintas dosis (10^6 , 10^7 y 10^8 UFC/mL), de la cepa BIF-1 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CECT 8145) tanto activa como inactiva. La inactivación se realizó mediante

tratamiento del cultivo en autoclave a 121°C, 30 min. Para el análisis funcional, el zumo suplementado con la cepa BIF-1 a una DO: 30, se adicionó sobre la superficie del medio de cultivo de *C. elegans* (medio NGM). Se estudió el efecto sobre la reducción de grasa corporal de *C. elegans* alimentados con zumo que contenía tanto bacterias vivas como inactivadas térmicamente.

- 5 Los resultados (Figura 22) mostraron que el zumo suplementado con 10^7 UFC/mL de la cepa BIF-1 viva producía una reducción de la grasa en el nematodo de un 10,3% respecto a condiciones control (medio NG). Además, el grado de reducción observado en el caso del zumo con 10^7 UFC/mL de la cepa BIF-1 inactivada fue muy similar, determinándose un 7,2% de reducción de grasa respecto al control.

REIVINDICACIONES

1. Cepa de la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, depositada el 14/05/12 con número de acceso: CECT8145 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).
- 5 2. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de células viables.
3. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de células no viables.
- 10 4. Sobrenadante y/o cultivo y/o extracto y/o compuesto bioactivo que comprende la cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Composición que comprende la cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 6. Composición según la reivindicación 5, donde la cepa se halla presente en una cantidad entre 10^5 ufc y 10^{12} ufc por gramo o mililitro de la composición.
7. Composición que comprende el sobrenadante y/o cultivo y/o extracto y/o los compuestos bioactivos según la reivindicación 4.
- 20 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde dicha composición es una composición farmacéutica.
9. Composición de acuerdo con la reivindicación 8, que además comprende al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 10. Composición según las reivindicaciones 5 a 7, donde dicha composición es una composición alimentaria.
11. Composición según la reivindicación 10, donde la composición alimentaria se selecciona del grupo que comprende: zumos de frutas o vegetales, helados, formulaciones infantiles, leche, yogur, queso, leche fermentada, leche en polvo, cereales, productos de repostería, productos en base a leche y/o cereales, complementos nutricionales, bebidas refrescantes y/o suplementos dietéticos.
- 30 12. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 caracterizada por comprender al menos otro microorganismo seleccionado del grupo que comprende los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y/o *Kluyveromyces*, *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. paraplantarum*, *L. reuteri*, *S. thermophilus*, *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. adolescentis*, *B. pseudocatenulatum*, *S. cerevisiae*, *S. boulardii*, *K. lactis*, y *K. marxianus*.
- 35 13. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12 para su uso en el tratamiento y/o prevención del sobrepeso y/o la obesidad y/o sus enfermedades relacionadas.
- 40 14. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde las enfermedades relacionadas se seleccionan del grupo que comprende: síndrome metabólico, hipertensión, glucemia, inflamación, diabetes tipo II, enfermedad cardiovascular, hipercolesterolemia, alteraciones hormonales y/o infertilidad.
- 45

Figura 1

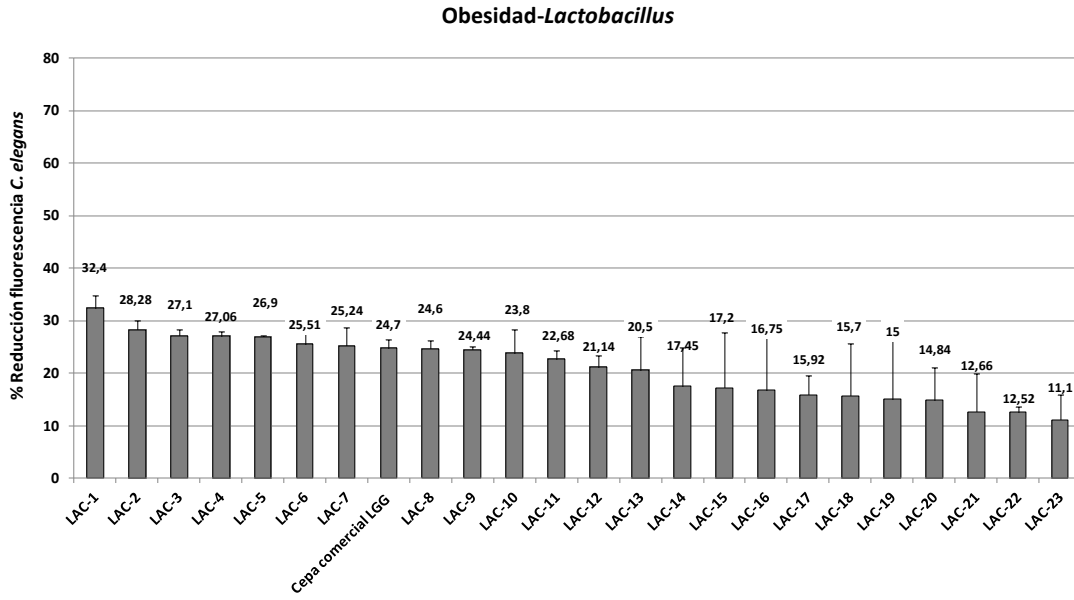


Figura 2

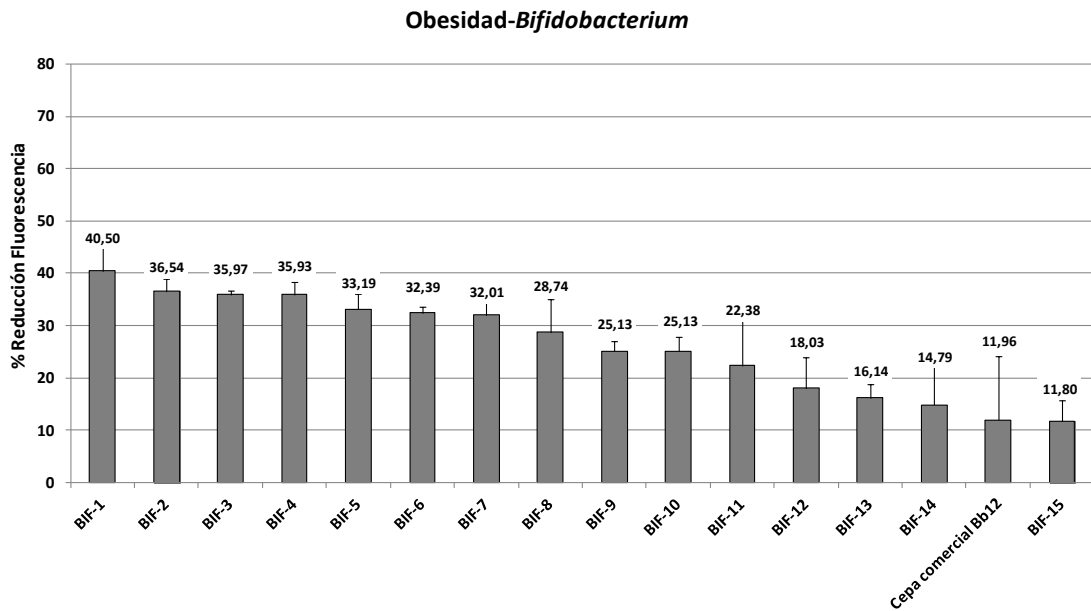


Figura 3

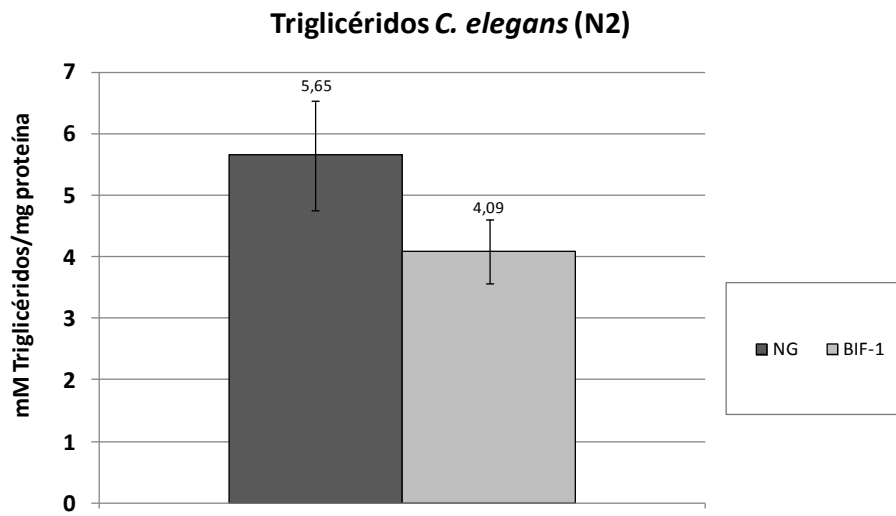


Figura 4

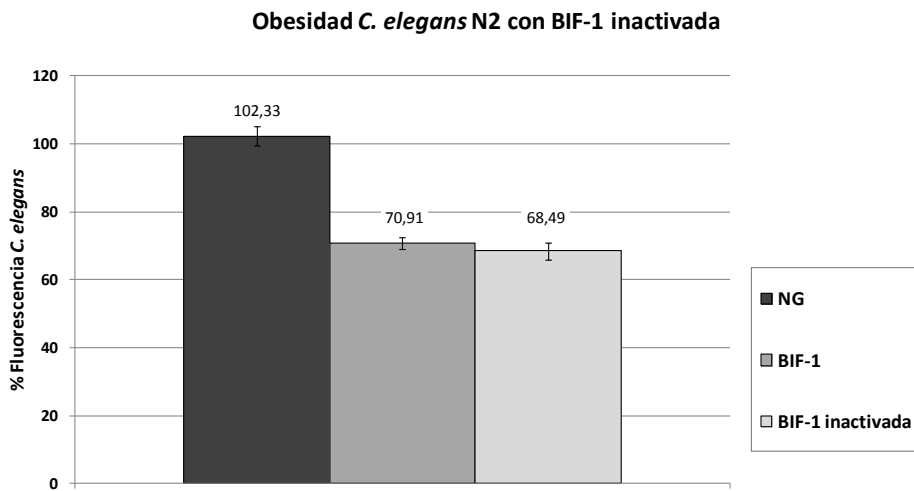


Figura 5

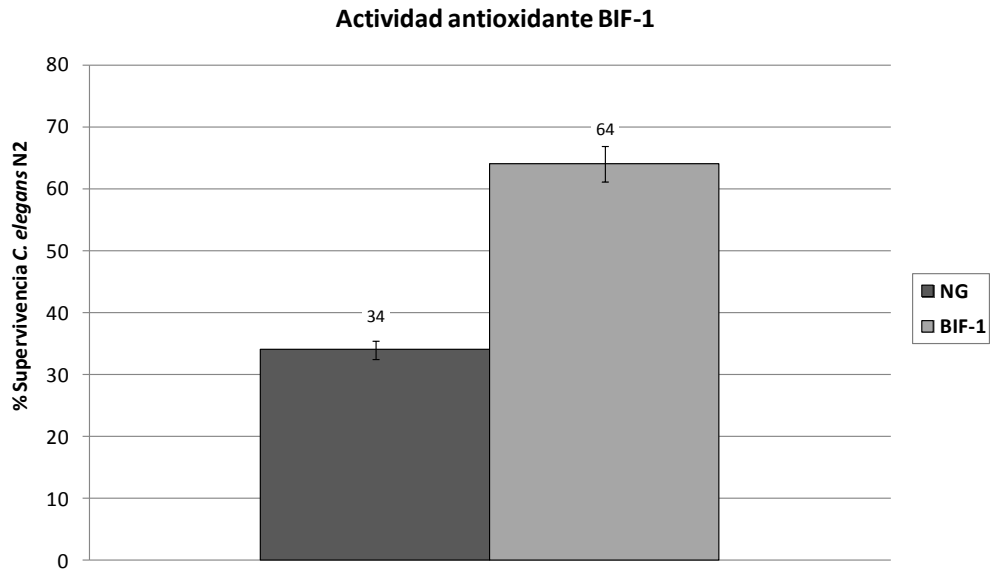


Figura 6

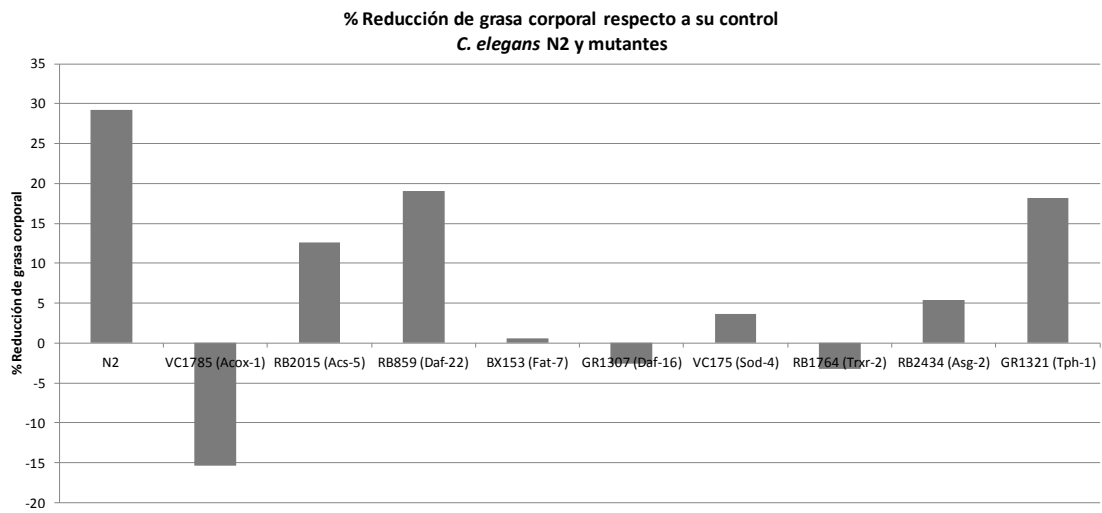


Figura 7

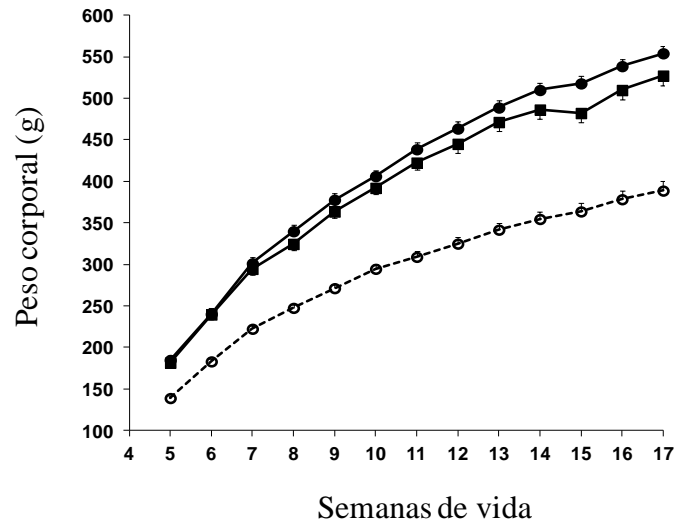


Figura 8

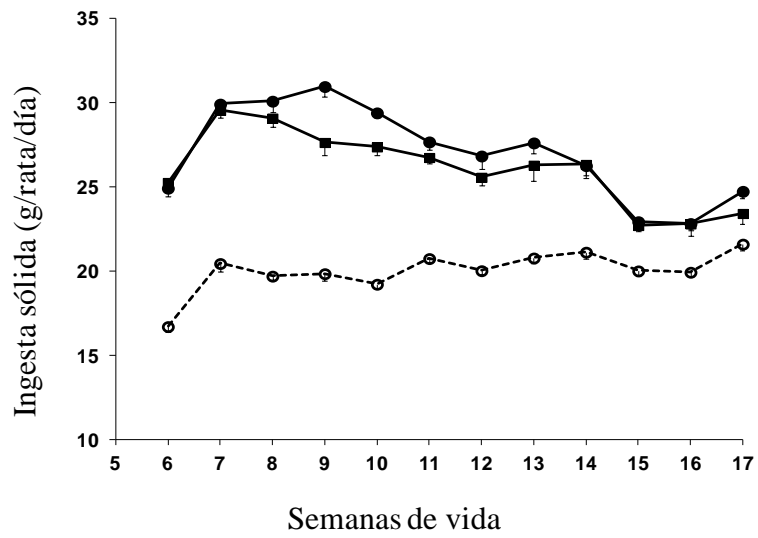


Figura 9

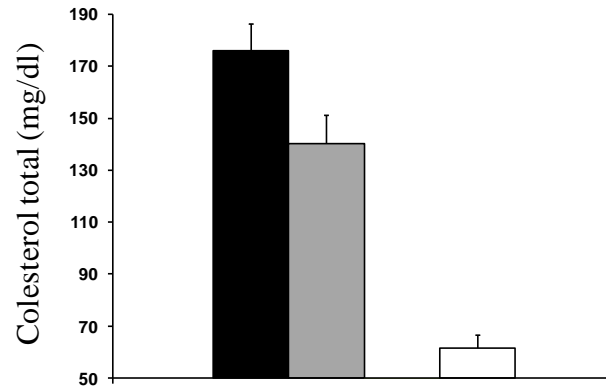


Figura 10

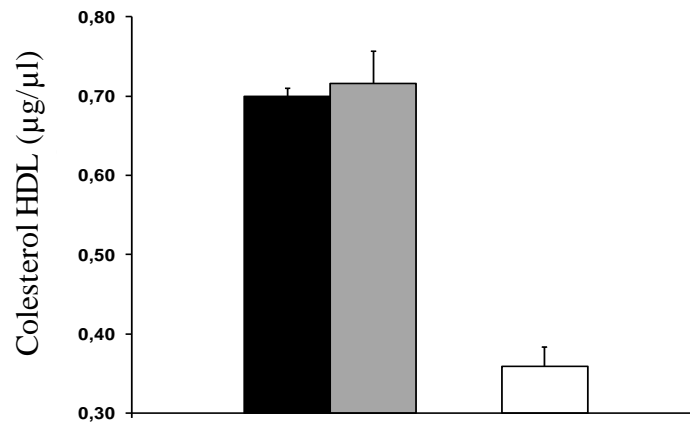


Figura 11

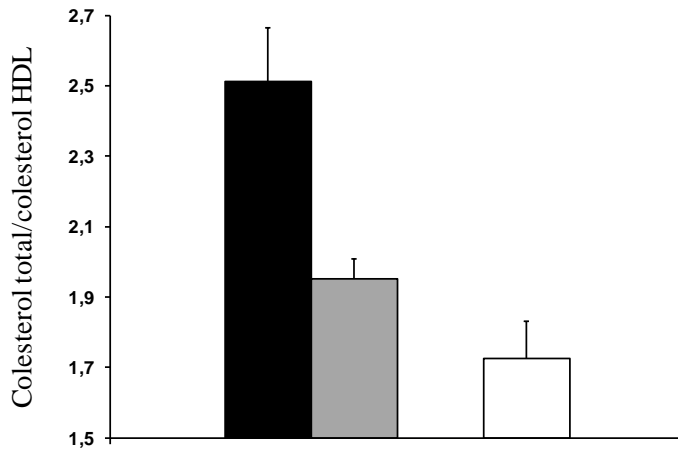


Figura 12

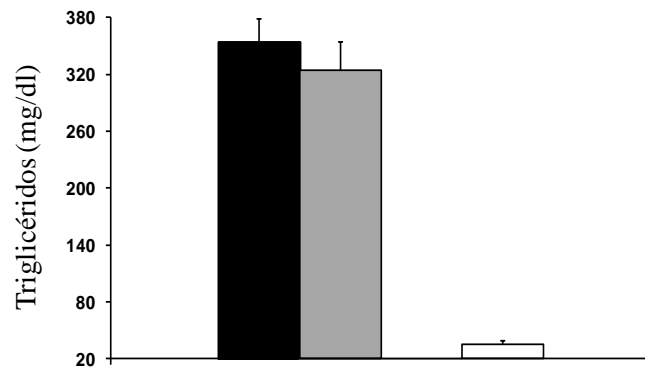


Figura 13

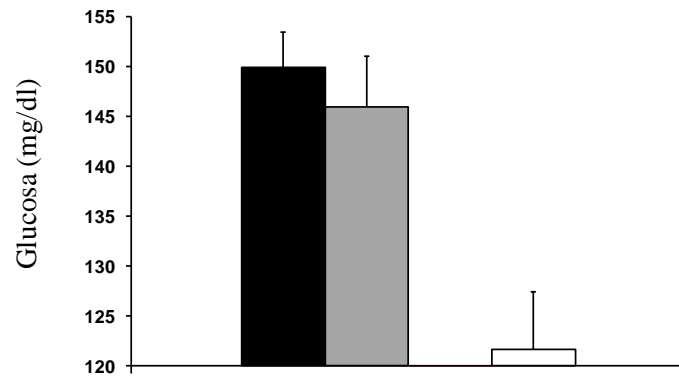


Figura 14

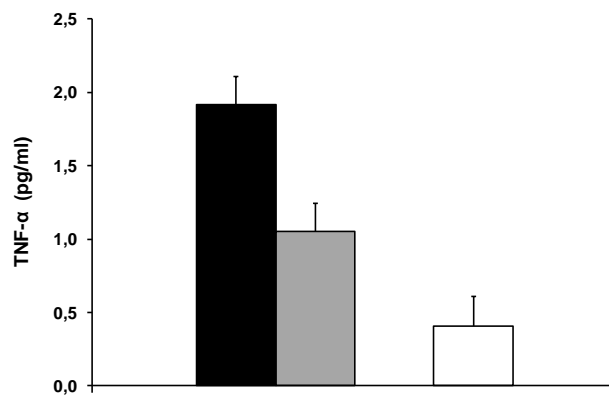


Figura 15

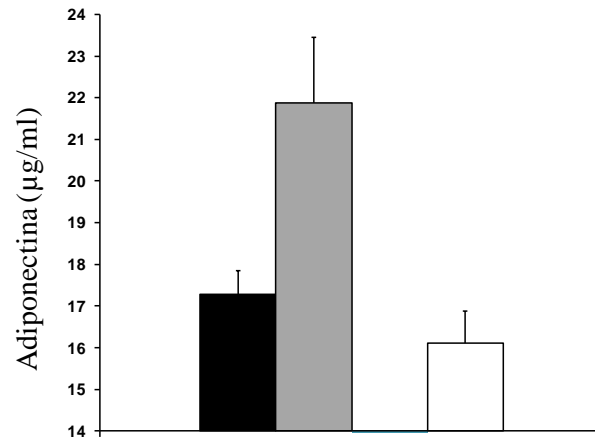


Figura 16

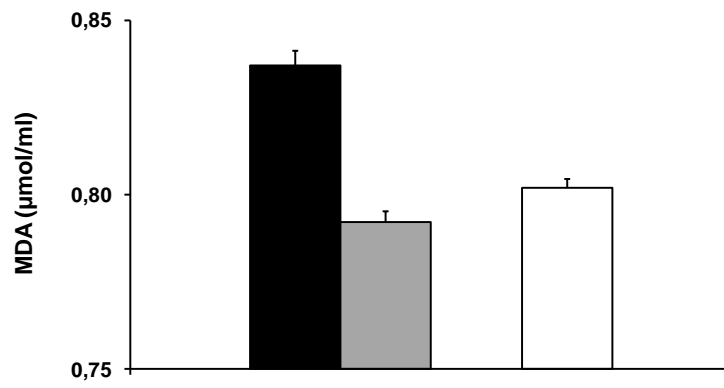


Figura 17

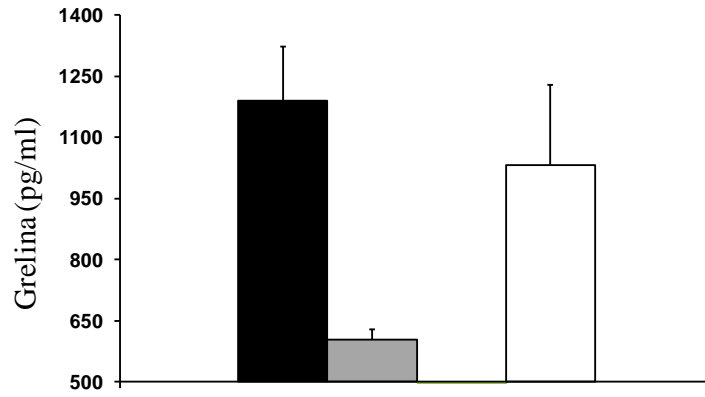


Figura 18

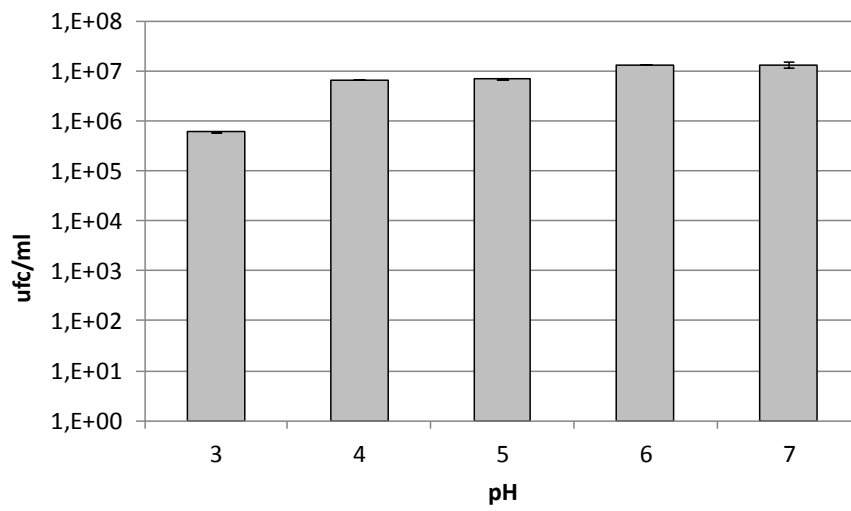


Figura 19

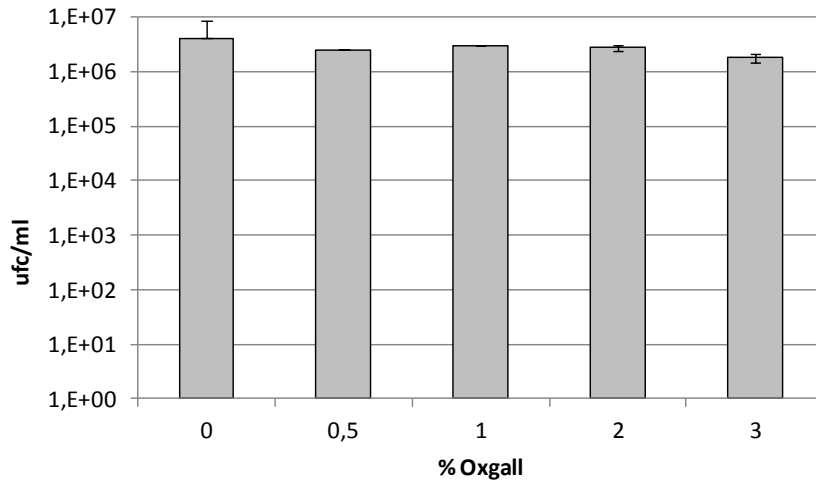


Figura 20

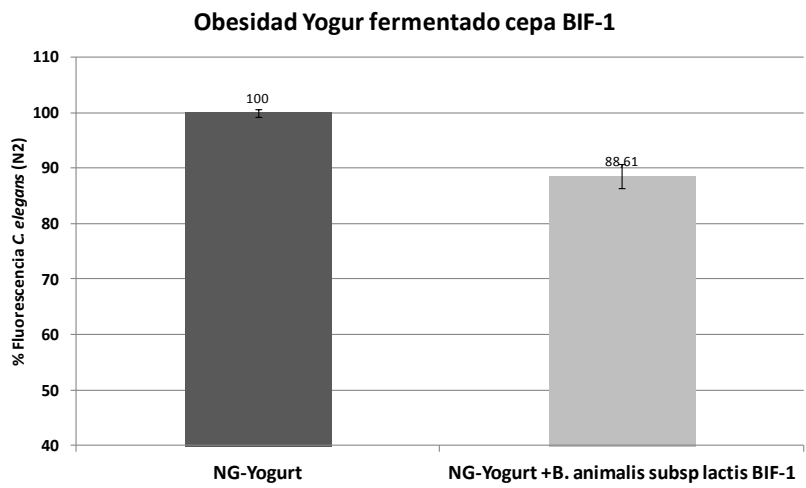


Figura 21

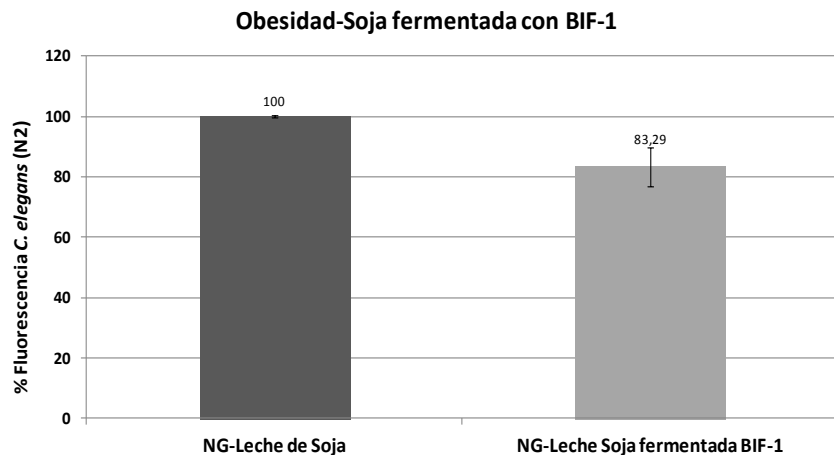


Figura 22

