



No. 16-084061- -00000-0000

Fecha: 2016-04-05 09:17:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 51

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO MÉTODO PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE UNA COMPOSICIÓN QUE
COMPRENDE MICROORGANISMOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE SOFAR S.P.A.DOMICILIO Vía Firenze 40, I - 20060 Trezzano Rosa (Milano)
Italia74. APODERADO JERONIMO CASTILLO BONILLA22. BOGOTA D.C., 2016



No. 16-084061- -00000-0000

Fecha: 2016-04-05 09:17:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCOR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve. 378 FASE NACIONAL I
Act. 411 PRESENTACION Folios: 51

Resivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT		
Solicitud Internacional No.		PCT/ IB2014/064284	Fecha: Septiembre 5, 2014
Publicación Internacional No.		WO 2015/033304 A1	Fecha: Marzo 12, 2015
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
METODO PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE UNA COMPOSICION QUE COMPRENDE MICROORGANISMOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
C12Q 1/10 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01), A23L 1/30 (2006.01), C12R 1/225 (2006.01), A61K 35/74 (2015.01)			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
1. SOFAR S.P.A.		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
DIRECCIÓN Via Firenze 40 CIUDAD I-20060 Trezzano Rosa (Milano) DEPARTAMENTO/ESTADO PAÍS DE RESIDENCIA Italia			
No. TELÉFONO CORREO ELECTRÓNICO NACIONALIDAD O Italia LUGAR DE CONSTITUCIÓN			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD
1	Italia		- Ugnano (bergamo)
2	Italia		- Milan
3	Italia		- Trezzano Rosa (milano)
4	Italia		- Milan
5			
DIRECCIÓN			
Via Mulino Vecchio 146			
Via Federico Engels 1			
Via Giuseppe Rossini 12			
Via Cima Otto e Camillo 23			
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en hoja de información complementaria.			
9	REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
CASTILLO BONILLA		JERONIMO	C.C. 79.462.057 T.P. 104167
DIRECCIÓN Calle 93ª No. 14 – 17 Oficina 311		No. TELÉFONO 236 34 93 / 236 34 09	
CIUDAD Bogotá D.C.		CORREO info@pcastillopineda.com	
PAÍS Colombia		ELECTRÓNICO	
		No. RADICACIÓN DE	
		PROTOCOLO DE	
		PODER GENERAL	

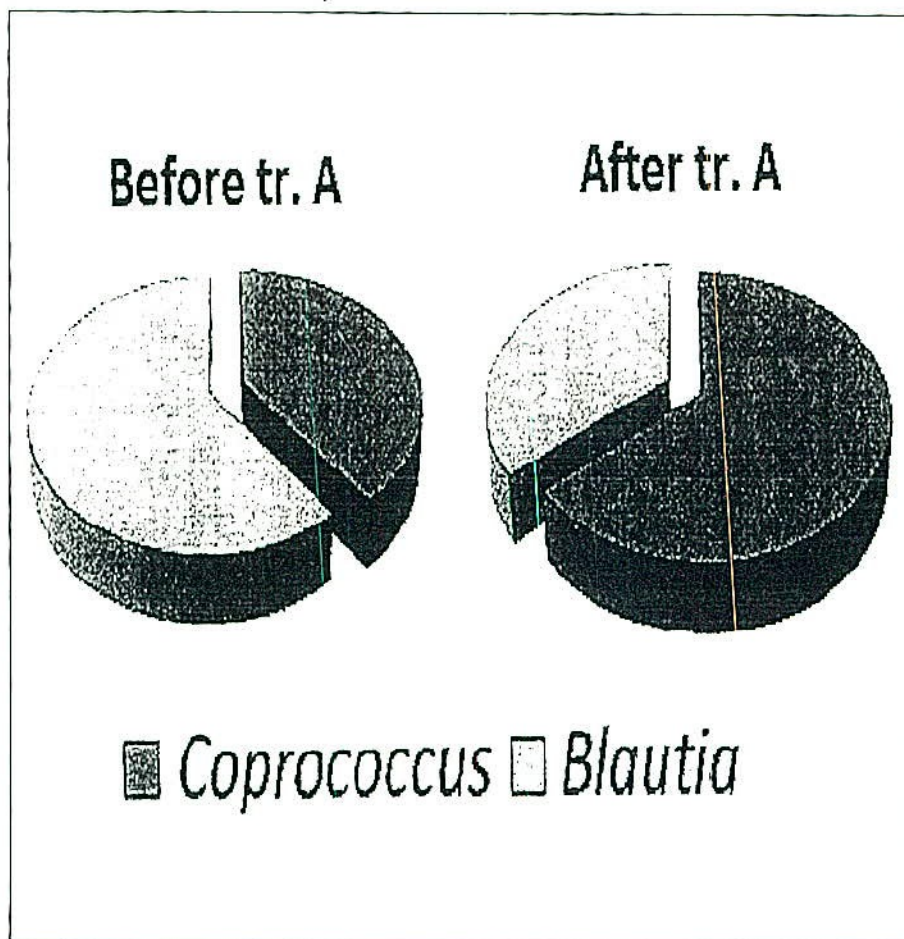
10	DECLARACIÓN(ES) DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO		
1.	(33) PAÍS DE ORIGEN Italia	CÓDIGO PAÍS - IT	(31) NÚMERO MI2013 A001473
2.			(32) FECHA (AAAA/MM/DD) -2013/09/06
3.			

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.	

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.	

13	REDUCCIÓN DE TASAS
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.	
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Universidades públicas o privadas ☐ Entidades sin ánimo de lucro ☐	
Si aplica, debe aportar los soportes de acuerdo a lo que se indica en el numeral 18 - Documentos que acompañan la solicitud	

14	RESUMEN
<u>RESUMEN</u> La presente invención se refiere a un método para determinar la actividad probiótica/paraprobiótica de una composición que comprende microorganismos, en particular bacterias, dicho método basándose en la evaluación, mediante análisis metagenómico, del cambio cualitativo y/o cuantitativo de la microbiota fecal como consecuencia de consumir la composición. Además, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo dicho método.	



16 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO

N°

Fecha

17 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

18 DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD

Documentación Técnica***Solicitud Internacional en castellano**

1. ☒ Descripción N° de folios: 28
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 12
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 8
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☒ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**
Micro, pequeñas o medianas empresas
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.
Universidades públicas o privadas
☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación
Entidades sin ánimo de lucro
☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar
14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0031718

Bogotá D.C., Abril 05 de 2016 - 09:10:18

RECIBIDO DE : CASTILLO PINEDA SAS

NI 860.046.502

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	791328403	04/04/2016	1.496.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	80.000.00	80.000.00
			\$80.000.00

SON: **OCHENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-084061-00000-0000

Fecha: 2016-04-05 09:17:36
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR.NULVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 51

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 5 de 2016 - 09:10:19

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 16 - 0031722

Bogotá D.C., Abril 05 de 2016 - 09:10:18

RECIBIDO DE : CASTILLO PINEDA SAS

NI 860.046.502

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	791328403	04/04/2016	1.496.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
6 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	40.000.00	240.000.00
			\$240.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 16-084061- -00000-0000

Fecha: 2016-04-05 09:17:36 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 51

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 5 de 2016 - 09:10:19

4

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE UNA COMPOSICIÓN QUE
COMPRENDE MICROORGANISMOS EN LA MICROBIOTA INTESTINAL.

La presente invención se refiere a un método para determinar la actividad probiótica/paraprobiótica de una composición que comprende microorganismos, en particular bacterias, dicho método basándose en una evaluación del cambio cualitativo y/o cuantitativo de la microbiota fecal como consecuencia del consumo de la composición. Asimismo, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo dicho método.

El tracto gastrointestinal comprende numerosas poblaciones de microorganismos que se han desarrollado y multiplicado durante el desarrollo de cada individuo y constituyen la denominada microbiota intestinal o flora intestinal.

Por lo tanto, la microbiota intestinal representa un ecosistema muy complejo y la condición de equilibrio entre las diferentes poblaciones de microorganismos que la componen, o denominada eubiosis, es fundamental para asegurar la salud y el bienestar corporal, puesto que la microbiota condiciona de modo significativo el desarrollo y la homeostasis de la mucosa intestinal del individuo huésped.

En otros términos, la microbiota intestinal representa un órgano verdaderamente dicho. En efecto, las modificaciones cualitativas y/o cuantitativas de la microbiota intestinal de un individuo, o la denominada disbiosis o disbacteriosis, puede dar lugar a pérdida de

la homeostasis intestinal, que a su vez puede condicionar la etiopatogénesis de un amplio espectro de patologías.

A los fines del tratar una condición de disbiosis intestinal, o de todos modos con el objetivo de mantener el equilibrio de la microbiota intestinal, se está volviendo cada vez más frecuente la práctica de consumir productos probióticos/paraprobióticos.

De conformidad con la definición de la Organización para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud (en inglés FAO/WHO), un prebiótico viene definido como "microorganismos vivos que, cuando vienen suministrados en cantidades adecuadas, confieren beneficio a la salud del huésped".

En aras de lo anterior, las ventajas relacionadas con el desarrollo de un método que haga posible evaluar, con rapidez y de modo fiable, los efectos de una composición/formulación exógena que comprende microorganismos sobre la composición bacteriana de la microbiota intestinal de un individuo son bastante evidentes.

En efecto, en base a los efectos medidos con tal método, es decir en base a la modalidad de cómo el consumo de la composición que comprende microorganismos modifica cuantitativa y/o cualitativamente la microbiota intestinal, será posible establecer si dicha composición es capaz de favorecer y/o asegurar la salud y el bienestar del cuerpo humano y, por consiguiente, si satisface uno de los prerequisites fundamentales de ser identificada como un probiótico/paraprobiótico.

La presente invención satisface los requisitos antes

mencionados proporcionando un método para determinar, mediante análisis molecular, el cambio cualitativo y/o cuantitativo de la composición de la microbiota fecal de un individuo como consecuencia de haber consumido una composición que comprende microorganismos, preferentemente bacterias, de conformidad con un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo.

En efecto, la parte Solicitante ha demostrado experimentalmente, por primera vez, la necesidad de llevar a cabo protocolos de estudios de intervención que sean cruzados, especialmente sobre una población sana, para prevenir que la marcada variabilidad intraindividuos esconda los posibles efectos de un tratamiento, en particular un tratamiento con un probiótico/paraprobiótico, o que lleve a falsos positivos estadísticos.

El método de la presente invención, aparte de ser sumamente ventajoso a los fines de determinar los efectos de una composición genérica que comprende microorganismos (es decir un supuesto probiótico/paraprobiótico) sobre la microbiota fecal, es útil también a los fines de confirmar los efectos benéficos para la salud de un probiótico/paraprobiótico conocido sobre el cuerpo humano, o a los fines de determinar cualquier nuevo efecto específico de un probiótico/paraprobiótico conocido, por ejemplo estudiando cuales poblaciones de microorganismos son estimulados e/o inhibidos en su crecimiento como consecuencia del consumo de la composición. En efecto, en base a las actividades

7

principales en las cuales vienen implicadas las poblaciones de microorganismos cuyo crecimiento es estimulado e/o inhibido como consecuencia del consumo de la composición, será posible definir los posibles nuevos efectos de la misma. Por ejemplo, si, como consecuencia del consumo de un probiótico de conformidad con el método de la presente invención, se hallara que una determinada población bacteriana hubiese crecido en términos cuantitativos y que esta población bacteriana tuviese un metabolismo implicado principalmente en la producción, por ejemplo de ácido butírico, es posible deducir que el probiótico puede ser consumido para aumentar la cantidad de ácido butírico en el tracto intestinal.

Otras ventajas del método de la presente invención se pondrán aún más de manifiesto a partir de la descripción detallada que sigue y a partir de los ejemplos, que, de todos modos, se presentan a título ilustrativo y, por ende, no limitativo.

Para permitir un mejor entendimiento de la descripción detallada, a este documento se han adjuntado las figuras de 1 a 4:

- la figura 1 muestra el resultado de los análisis estadísticos conducidos para evaluar el incremento de la población bacteriana del género *Coprococcus* (figura 1.1) y la disminución de la población bacteriana del género *Blautia* (figura 1.2) antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención (A) y, al mismo tiempo, la disminución de la población bacteriana del género *Coprococcus* (figura 1.1) y el aumento de la población bacteriana del género *Blautia* (figura 1.2)

antes y después del tratamiento con el placebo (B);

- la figura 2.1 muestra el incremento de la población bacteriana del género *Coprococcus* (gris oscuro) y la disminución de la población bacteriana del género *Blautia* (gris claro) antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención;

- la figura 2.2 muestra el incremento en porcentaje de la población bacteriana del género *Coprococcus* (gris oscuro) y la disminución en porcentaje de la población bacteriana del género *Blautia* (gris claro) antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención (A) y la disminución en porcentaje de la población bacteriana del género *Coprococcus* (gris oscuro) y el aumento en porcentaje de la población bacteriana del género *Blautia* (gris claro) antes y después del tratamiento con el placebo (B);

- La figura 3 muestra el resultado de los análisis estadísticos conducidos para establecer el aumento en el metabolismo de ácido nicotínico antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención y su disminución antes y después del tratamiento con el placebo; y

- la figura 4 muestra el resultado de los análisis estadísticos llevados a cabo para establecer el incremento de la biosíntesis del ácido fólico antes y después del tratamiento con la composición de la presente invención y la falta de toda modificación, por el contrario, antes y después del tratamiento con el placebo.

Un primer aspecto de la presente invención se

refiere a un método para determinar el cambio de la composición de la microbiota fecal de un individuo como consecuencia del consumo de una composición/formulación que comprende microorganismos, de conformidad con un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo, dicho método comprendiendo las etapas de:

- a) recolectar información acerca del estado de salud y/o costumbres alimenticias de dicho individuo antes y/o durante y/o después de consumir la composición o el placebo de conformidad con el protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo;
- b) obtener al menos una muestra fecal del individuo antes y/o durante y/o después del consumo de la composición o placebo de conformidad con un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo;
- c) analizar la microbiota mediante análisis metagenómico llevado a cabo sobre la muestra fecal obtenida en la etapa b);
- d) comparar, preferentemente cualitativa y/o cuantitativamente, la microbiota fecal del individuo antes y/o durante y/o después del consumo de la composición o placebo de conformidad con un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo.

En el contexto de la presente invención, el término microbiota fecal significa la totalidad de las poblaciones de microorganismos presentes en las heces de un individuo y refleja la totalidad de las poblaciones de microorganismos presentes en el intestino del mismo. Por

lo tanto, en este contexto el término microbiota fecal es sinónimo de microbiota intestinal.

En particular, los microorganismos incluidos en la composición de la presente invención son bacterias y/o levaduras y/u otros microorganismos, consumidos individualmente o en combinación.

Una composición que comprende bacterias es muy preferida para los fines de la presente invención. En particular, las bacterias que pertenecen al género seleccionado entre: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* y *Enterococcus*. Más preferiblemente, dicha bacteria es del género *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*.

En particular, el *Lactobacillus* es seleccionado entre: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*,

Lactobacillus sakei, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus sanfranciscensis*.

Sumamente preferidas a los fines de la presente invención son las bacterias que pertenecen a las especies *Lactobacillus paracasei*, más preferiblemente a la cepa *Lactobacillus paracasei* DG.

La cepa bacteriana *Lactobacillus paracasei* DG fue depositada por SOFAR S.p.A. con la Colección Nacional de Culturas de Microorganismos del Instituto Pasteur de Paris el 05/05/1995, bajo el número de depósito CNCM I-1572. Al comienzo, la cepa recibió la denominación de *Lactobacillus casei* DG sub.*casei*.

En particular, las bacterias del género *Bifidobacterium* vienen seleccionadas entre: *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*.

Preferentemente las levaduras son del género *Saccharomyces*, más preferiblemente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

En general, los microorganismos incluidos en la composición de la presente invención son microorganismos individuales o combinaciones de cualquier especie microbiana especificada en la lista QPS de EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/3020.pdf>).

Preferentemente, los microorganismos de la composición de la presente invención están vivos y, por ende, la composición puede definirse como probiótica. Alternativamente, los microorganismos de la composición están muertos y/o bajo la forma de un lisato o un

extracto y, por ende, también la composición puede ser definida como paraprobiótica. Por lo tanto, la composición de la presente invención también es conocida o supuesta probiótica o paraprobiótica.

En una forma de realización de la invención, la composición comprende aproximadamente 1-50 mil millones de unidades formadoras de colonias (Colony Forming Unit = CFU) de microorganismos, preferentemente 15-30 mil millones, más preferiblemente 20-25 mil millones de CFUs de microorganismos.

En una forma de realización de la presente invención, la composición es formulada para el suministro oral. En particular, la composición es formulada en forma sólida, preferiblemente como pastillas, cápsulas, comprimidos, polvo granular, cápsulas duras, gránulos solubles en agua, sobrecitos o píldoras.

Alternativamente, la composición de la invención es formulada en forma líquida, por ejemplo como un jarabe o bebida, o bien es agregada a un alimento, por ejemplo a un yogurt, queso o jugo de fruta.

Alternativamente, la composición de la invención es formulada en una forma capaz de ejercer una acción por vía tópica, por ejemplo como enema.

En otra forma de realización de la invención, la composición también comprende excipientes generalmente aceptados para la producción de productos probióticos y/o farmacéuticos.

En otra forma de realización de la invención, la composición de la invención es enriquecida con vitaminas, oligoelementos como por ejemplo zinc y selenio, enzimas

y/o sustancias prebióticas como por ejemplo fructo-oligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos (GOS), inulina, goma guar o combinaciones de los mismos.

Por lo que concierne al consumo de la composición, como se ha explicado con anterioridad, sigue un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo. En otros términos, durante el consumo ni el investigador ni los individuos que llevaron a cabo la prueba eran conscientes de los tratamientos asignados (los tratamientos son indistinguibles, doble ciego) y un mismo individuo es expuesto en momentos diferentes al tratamiento tanto con la composición que contiene microorganismos como con el placebo (cruzado o crossover), de conformidad con una secuencia aleatoria.

En una forma de realización de la invención, dicho protocolo comprende las siguientes etapas: 1) una etapa de preadmisión, en la cual preferentemente los individuos no ingieren la composición que comprende microorganismos o el placebo; y/o 2) una primera etapa de tratamiento, en la cual preferentemente los individuos ingieren la composición que comprende microorganismos o el placebo; y/o 3) una etapa de eliminación (wash-out), en la cual preferentemente los individuos no ingieren la composición que comprende microorganismos o el placebo; y/o 4) una segunda etapa de tratamiento, en la cual preferentemente los individuos ingieren el placebo o la composición que comprende microorganismos.

La ingestión de la etapa 2 y de la etapa 4 tiene lugar de modo aleatorio, doble ciego como se ha especificado con anterioridad. Queda claro que el

individuo que ingiere el placebo en la primera etapa ingerirá la composición que comprende microorganismos en la segunda etapa y viceversa.

Preferentemente la duración de las diferentes etapas del protocolo es la misma. En particular, la duración de al menos una de esas etapas, preferentemente de todas las etapas, es de aproximadamente cuatro semanas.

En el contexto de la presente invención, el término wash-out significa un período que transcurre entre dos etapas de ingestión de la composición que comprende microorganismos o del placebo en la cual el individuo no ingiere nada y, por ende, debería "eliminar" lo que ha ingerido con anterioridad, es decir un período de falta de tratamiento con el cometido de eliminar todo efecto residual.

En una forma de realización de la invención, la composición de la presente invención preferentemente viene ingerida una vez por día, más preferentemente después de despertarse.

Alternativamente, también es posible ingerirla a la tarde, preferentemente al menos 3 horas después de las comidas.

Preferentemente la etapa de recolectar información concerniente al estado de salud y/o a las costumbres alimenticias del individuo es llevada a cabo recolectando dicha información en un cuestionario. Dicho cuestionario viene redactado *ad hoc* para recolectar datos concernientes al estado de salud y/o a las costumbres alimenticias de un individuo que pone en acto el método de la invención.

En particular, dicho cuestionario es una hoja estándar sobre la cual se formulan preguntas relacionadas con el estado de salud y/o las costumbres alimenticias de dicho individuo. Por lo que concierne al estado de salud, el individuo puede contestar usando escalas de puntuación asociadas con cada pregunta. Preferentemente la escala de puntuación es una escala digital verbal (Verbal Numeric Scale = VNS), una escala analógica visual (Visual Analogue Scale = VAS) o una escala de puntuación verbal (Verbal Rating Scale = VRS). Por lo que concierne a las costumbres alimenticias, el individuo puede contestar indicando los alimentos que consuma cotidianamente, especificando, de ser posible, también las cantidades que consume.

Preferentemente, la etapa de recolectar información es llevada a cabo al inicio de la etapa de preadmisión y/o antes y/o después de la primera etapa de tratamiento y/o antes y/o después de la finalización del segundo tratamiento.

Preferentemente la obtención de al menos una muestra fecal tiene lugar al inicio y/o al final del primer tratamiento y/o al inicio y/o al final del segundo tratamiento.

Preferentemente la muestra fecal es tomada con una antelación no superior a 48 horas, más preferiblemente con una antelación no superior a 24 horas antes de ser procesada o conservada a una temperatura preferiblemente comprendida entre $+4^{\circ}\text{C}$ y -20°C , más preferiblemente a -20°C , por un período de tiempo que preferiblemente no supera los 7-10 días. La conservación de la muestra fecal

antes de procesarla o conservarla a una temperatura baja preferiblemente tiene lugar a temperatura ambiente.

La etapa de analizar la microbiota por análisis metagenómico de la muestra fecal es llevada a cabo sobre ácidos nucleicos, preferiblemente sobre el ADN (en inglés DNA) extraído de la microbiota fecal.

En particular, el análisis de la microbiota mediante análisis metagenómico comprende al menos una de las siguientes etapa, pero preferiblemente todas:

- extracción de ácidos nucleicos, preferiblemente del DNA de la muestra fecal; y
- tipificación de modo molecular de la microbiota fecal.

La extracción de los ácidos nucleicos en general, y del DNA en particular, de la muestra fecal se logra usando los procedimientos a tal efecto que cualquier persona avezada en la técnica conoce.

En una forma de realización de la invención, la tipificación de las poblaciones de microorganismos se obtiene analizando la secuencia nucleotida de al menos una porción del gen codificador por una subunidad del ribosoma, preferiblemente la subunidad 16S del ribosoma, es decir el gen codificador para la molécula rRNA 16S.

A tal efecto, el DNA extraído de las muestras fecales viene amplificado usando técnicas conocidas en el sector, por ejemplo mediante PCR. Preferiblemente, la amplificación se obtiene usando un par de oligonucleótidos (cebadores o primers); preferiblemente usando SEQ ID NO: 1 (Probio_Uni 5'-CCTACGGGRSGCAGCAG-3') y SEQ ID NO: 2 (Probio_Rev 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3') (Milani

17
17

C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turrone F, et al. (2013) Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. PLoS ONE 8(7): e68739).

Las condiciones para llevar a cabo la PCR pueden variar en función de la calidad y la cantidad de ácido nucleico que se desea amplificar y/o de los primers que se usan. De todos modos, la configuración de las condiciones de PCR es una actividad de rutina para toda persona experta en la técnica.

Preferiblemente, a posteriori las porciones de ácido nucleico amplificadas vienen secuenciadas.

A tal efecto una persona avezada en la técnica puede usar cualquier método conocido. Preferiblemente, los métodos empleados vienen seleccionados entre: secuenciación basada en el método de Sanger, métodos de pirosecuenciación y método de secuenciación de Ion Torrent.

En el caso de Ion Torrent, es preferible usar primers que preferiblemente tienen en la extremidad 5' secuencias adaptadoras. En la forma de realización sumamente preferida de la presente invención, las secuencias adaptadoras son SEQ ID NO: 1 y 2.

Una vez que las secuencias han sido obtenidas y, por ende, una vez que las poblaciones de microorganismos de la microbiota fecal han sido tipificadas, preferiblemente la comunidad de microorganismos viene caracterizada por medio de programas de agrupamiento jerárquico o análisis taxonómico y/o construyendo dendrogramas filogenéticos, preferiblemente con mapas de calor. A tal efecto, el

software QIIME es muy preferido a los fines de la presente invención.

Finalmente, preferiblemente los datos obtenidos a partir de los análisis de caracterización vienen analizados con métodos estadísticos de tipo paramétrico y/o no paramétrico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para poner en acto el método de conformidad con la presente invención, dicho kit comprendiendo:

- un código de identificación del kit;
- al menos una formulación oral de una composición que comprende microorganismos, preferiblemente perteneciente a la especie *Lactobacillus paracasei*, más preferiblemente a la cepa *Lactobacillus paracasei* DG, en una cantidad comprendida entre 1 y 50 mil millones de unidades formadoras de colonias (Colony Forming Unit = CFU) de microorganismos, preferiblemente 15-30 mil millones, más preferiblemente 20-25 mil millones de CFUs de microorganismos;
- al menos una formulación oral de un placebo que no contiene microorganismos;

dicha composición de microorganismos siendo tomada de conformidad con un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado respecto a dicho placebo, y dicha composición que comprende microorganismos y dicho placebo siendo identificados mediante un código.

Preferiblemente el placebo es idéntico estéticamente, es decir su forma es la misma, pero difiere de modo substancial de dicha formulación oral de una composición que comprende microorganismos,

preferiblemente perteneciente a la especie *Lactobacillus paracasei*, más preferiblemente a la cepa *Lactobacillus paracasei* DG. La formulación oral del placebo no contiene microorganismos.

En una forma de realización preferida de la invención, el kit comprende al menos 28 cápsulas o comprimidos o pastillas o comprimidos por vía oral o cápsulas duras o sobrecitos que contienen la formulación oral de la composición que comprende microorganismos, y, preferiblemente, la misma cantidad de comprimidos o pastilla o comprimidos por vía oral o cápsulas duras o sobrecitos que contienen la formulación oral de placebo.

De conformidad con una forma de realización preferida de la invención, dicha al menos una formulación oral es al menos una cápsula, al menos un comprimido, al menos una pastilla, al menos un comprimido por vía oral, al menos una cápsula dura, al menos un sobrecito o al menos una píldora.

Dichas formulaciones orales vienen identificadas mediante un código, por ejemplo un código de colores, un código numérico, un código alfabético o un código alfanumérico. A los fines del método, dicho código servirá para entender cuando la composición que comprende microorganismos ha sido tomada y cuando ha sido tomado el placebo como se ha descrito con anterioridad.

Las formulaciones orales son idénticas en términos estéticos, es decir su forma es la misma, pero difieren en su sustancia porque una contiene la composición que comprende microorganismos mientras que la otra contiene un placebo. Además, las dos formulaciones son

identificadas individualmente mediante un código.

De este modo, la composición que comprende microorganismos y el placebo contenidos en un kit son tales de ser indistinguibles por parte de un individuo. Además, la composición que comprende microorganismos y el placebo contenidos en el kit son identificados unívocamente mediante un código cualquiera, por ejemplo un código de colores, un código numérico, un código alfabético o un código alfanumérico.

La correspondencia de este código con la naturaleza de la sustancia, es decir si es la composición que comprende microorganismos o el placebo, la conoce solamente el fabricante del kit.

De conformidad con otra forma de realización de la presente invención, el kit además comprende cuestionarios redactados *ad hoc* para recolectar datos concernientes al estado de salud del individuo que pone en acto el método de la invención.

En particular, los cuestionarios son hojas estándares sobre las cuales se formulan las preguntas relacionadas al estado de salud y/o a las costumbres alimenticias de dicho individuo. Por lo que concierne al estado de salud, el individuo puede contestar usando escalas de puntuación asociadas con cada pregunta. La escala de puntuación preferiblemente es una escala digital verbal (Verbal Numerical Scale = VNS), una escala analógica visual (Visual Analogue Scale = VAS) o una escala de puntuación (Verbal Rating Scale = VRS). Por lo que concierne a las costumbres alimenticias, el individuo puede contestar indicando los alimentos que consume

21

cotidianamente, especificando, de ser posible, también las cantidades que consume.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de dicho kit para fines de diagnóstico y/o terapéuticos.

EJEMPLO

Tratamiento.

Se llevó cabo un estudio aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo de intervención dietética sobre individuos sanos.

Los voluntarios fueron admitidos en base a los siguientes criterios:

- criterio de inclusión: mujeres y hombres sanos, de una edad comprendida entre 18 y 55 años que hayan firmado el formulario de consentimiento informado;
- criterios de exclusión: tratamiento antibiótico durante el mes anterior al examen; episodios de enteritis viral o bacteriana en los dos meses anteriores al primer examen; úlceras gástrica o duodenal en los 5 años anteriores al primer examen; embarazo o amamantamiento; casos de alcoholismo recientes o supuestos y consumo de drogas; otras condiciones de no cumplimiento con el protocolo de estudio..

La intervención dietética probiótica fue llevada a cabo de conformidad con un diseño cruzado, como está esquematizado en la Tabla I de abajo.

Tabla I

Preadmisión	Tratamiento 1	Wash-up	Tratamiento 2
4 semanas	4 semanas	4 semanas	4 semanas

Entrevista	1 (V0)	2 (V1)	3 (V2)	4 (V3)	5 (V4)
Recolección de muestra fecal	1	2	3	4	
	↓	↓	↓	↓	
Análisis metagenómico de la microbiota fecal					

En la etapa de preadmisión (4 semanas) los voluntarios siguieron sus dietas acostumbradas, sin consumir productos lácteos fermentados probióticos (por ende, el yogurt tradicional fue permitido), suplementos dietéticos probióticos o suplementos dietéticos prebióticos.

Al final del periodo de preadmisión, los voluntarios fueron aleatorizados para recibir una cápsula por día de un probiótico o placebo por 4 semanas.

A título ejemplificador, como probiótico para suministrar se empleó Enterolactis Plus; está constituido por cápsulas de 420 mg que contienen 24 mil millones de unidades formadoras de colonias (CFU = Colony Forming Unit) de *Lactobacillus paracasei*, cepa DG.

El placebo consistía en cápsulas con el mismo aspecto que tenían los probióticos, obviamente sin el agente probiótico.

El sabor y el color de la sustancia activa (es decir el probiótico) y del placebo eran iguales.

El producto fue tomado a la mañana con el estómago vacío, al menos diez minutos antes del desayuno o, en caso de olvido, a la tarde antes de ir a dormir y de todos modos al menos dos horas después de la última comida.

Después de las primeras cuatro semanas de

23
25

tratamiento, los voluntarios pasaron un período de cuatro semanas de eliminación (wash-out) igual al período de preadmisión.

Al final del período de wash-out, los voluntarios tomaron una cápsula por día de Enterolactis Plus o placebo por cuatro semanas de conformidad con el diseño cruzado descrito arriba.

Resumiendo, el estudio implicó 4 etapas, cada una de las cuales de una duración de 4 semanas:

- *Etapas de preadmisión:* los individuos no fueron sometidos a ningún tratamiento con Enterolactis Plus y tampoco al tratamiento con placebo.
- *Tratamiento 1:* los individuos fueron sometidos a tratamiento con Enterolactis Plus o al tratamiento con el placebo.
- *Wash-out:* los individuos no fueron sometidos al tratamiento con Enterolactis Plus y tampoco al tratamiento con placebo.
- *Tratamiento 2:* los individuos fueron sometidos al tratamiento con el placebo o al tratamiento con Enterolactis Plus, respectivamente.

Exámenes y recolección de muestras.

Al comienzo cada voluntarios fue instruido sobre cómo seguir todo el procedimiento, el cual implicó un total de 5 reuniones por voluntario.

Durante la primera reunión, se obtuvo el consentimiento informado y los datos personales del voluntario. Además, el voluntario recibió información general acerca de cómo debía ser llevado a cabo el

estudio y fue instruido acerca de los cambios a aplicar en la dieta durante las siguientes 4 semanas de preadmisión (prohibición de consumir los productos especificados con anterioridad).

Después de 4 semanas, el voluntario fue a la segunda reunión con una muestra fecal (muestra T0), recolectada durante las precedentes 24 horas en un contenedor especial entregado durante la primera reunión.

Para asegurar una óptima conservación, las muestras fecales fueron conservadas a temperatura ambiente y llevadas al laboratorio dentro de 24 horas.

Durante la segunda reunión, además, al voluntario le fue dado el producto probiótico (o placebo) a tomar durante las próximas 4 semanas. Además, el voluntario fue instruido sobre cómo tomar el producto.

Al final de las 4 semanas de tomar el producto (o placebo), el voluntario fue a la tercera reunión con otra muestra fecal (muestra T1) recolectada durante las 24 horas precedentes.

Durante la tercera reunión, el voluntario rellenoó un cuestionario sobre los posibles efectos, tanto benéficos como no deseados, consiguientes del consumo del producto.

Luego, el voluntario fue instruido acerca de las próximas 4 semanas, durante las cuales nuevamente no debería tomar los productos antes mencionados.

Al final de esas 4 semanas, el voluntario fue a la cuarta reunión con una muestra fecal (muestra T2) y recibió el producto probiótico (o placebo) a tomar durante las próximas 4 semanas.

Finalmente, después de 4 semanas de tomar el

producto (o placebo), el voluntario fue a la quinta reunión para entregar la última muestra fecal (muestra T3).

Durante esta última reunión, el voluntario relleno un cuestionario semejante al recibido durante la tercera reunión.

Todas las muestras fecales recolectadas fueron almacenadas a -20°C por un período no superior a 7 días antes de ser sometidas al análisis de la microbiota.

Análisis de microbiota fecal

La microbiota fecal fue evaluada analizando la secuencia nucleótida de porciones del gen codificador de la subunidad bacteriana rRNA 16S. Más en particular, fue adoptada una estrategia metagenómica; la cual, sucintamente, consisten en las siguientes etapas:

1. extraer, cuantificar y normalizar el DNA metagenómico proveniente de las muestras fecales;
2. amplificar la región hipervariable V3 del gen bacteriano codificador de la 16S rRNA mediante PCR;
3. cuantificar los productos de PCR;
4. secuenciar los productos de amplificación;
5. analizar bioinformáticamente las secuencias.

Los procedimientos de conformidad con las etapas 1 y 3 son técnicas muy conocidas en el sector y, por ende, se llevan a cabo con los protocolos usados normalmente en este campo. Por ejemplo, los métodos descritos en los manuales de laboratorio como los de Sambrook et al. 2001, o Ausubel et al. 1994,

La etapa 2 de amplificar la región V3 de los genes RNA ribosomal 16S fue llevada a cabo por medio de la

técnica de amplificación de DNA conocida como PCR, usando Probio_Uni 5'-CCTACGGGRRSGCAGCAG-3' (SEQ ID NO: 1) y Probio_Rev 5'-ATTACCGCGGCTGCT-3' (SEQ ID NO: 2) como oligonucleótidos (cebadores o primers).

En particular, el par de primers SEQ ID NO: 1 y 2 amplifica la región V3 del gen rRNA 16S.

La etapa 4 puede ser llevada a cabo con las técnicas conocidas en el sector para tal fin, por ejemplo técnicas basadas en el método Sanger, pirosecuenciado o el método de secuenciación Ion Torrent Fusion Primers usado en el ejemplo específico de la presente invención de conformidad con el protocolo descrito en la sección materiales y métodos del artículo científico de Milani et al. (2013).

En el caso de la técnica de Ion Torrent, los primers son proyectados y sintetizados de manera de incluir, en la extremidad 5', una de las dos secuencias adaptadoras usadas en esta específica técnica de secuenciación de DNA. En este caso, las secuencias adaptadoras fueron SEQ ID NO: 1 y 2.

Las condiciones bajo las cuales fue llevada a cabo la PCR son las siguientes:

- 5 minutos a 95°C;
- 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, y 90 segundos a 72°C por 35 ciclos;
- 10 minutos a 72°C.

Al final de la PCR fue verificada la integridad de lo amplificado mediante electroforesis.

La etapa 5 del método, necesaria para caracterizar las comunidades microbianas, puede ser llevada a cabo con

numerosas técnicas conocidas en la actualidad a tal efecto. Más en particular, se utilizó análisis de agrupamiento jerárquico, análisis taxonómico y construcción de dendogramas filogenéticos con mapas de calor de conformidad con el protocolo descrito en la sección materiales y métodos del artículo científico de Milani et al. (2013); más en particular, el análisis de datos de secuencia fue llevado a cabo usando el software QIIME.

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico fue llevado a cabo usando el software STATISTICA (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

Para detectar diferencias significativas, los datos fueron analizados usando métodos estadísticos paramétricos (ANOVA multivariado e invariado de medidas repetidas) y no paramétricos (Wald-Wolfowitz y Mann-Whitney).

La normalidad de la serie de datos (importante para ANOVA) fue evaluada por medio de los tests Shapiro - Wilk y Kolmogorov-Smirnov.

Resultados del tratamiento

El estudio fue completado por un total de 22 individuos (11 mujeres y 11 hombres).

Al comienzo fueron admitidos treinta y tres individuos, pero 11 de ellos se retiraron antes de tiempo por distintos motivos: consumo de antibióticos (4), no querer seguir el estudio (1), frecuentes episodios de diarrea (1), consumo de otros probióticos durante el período de estudio (3), cambio drástico de las costumbres

alimenticias (1) y gripe estacional con episodios de diarrea (1).

A la conclusión del estudio y finalización del análisis de los resultados de los dos tratamientos, se descubrió lo oculto y se observó que: el tratamiento A era el tratamiento activo, que contenía *Lactobacillus paracasei* DG; el tratamiento B era el placebo, exteriormente igual al tratamiento activo, pero sin lactobacilli.

Cuando fueron analizados los datos obtenidos del estudio, se observó una elevada estabilidad, desde el punto de vista taxonómico, de la microbiota intestinal de los participantes al estudio.

En efecto, se halló que:

- a) Dos divisiones bacterianas de las 15 identificadas, es decir, Bacteroidetes y Firmicutes, constituyen más del 90% de las secuencias;
- b) 11 familias de las 131 identificadas constituyen más del 90% de las secuencias; y
- c) 20 géneros de los 262 identificados constituyen más del 90% de las secuencias.

Asimismo, este estudio confirmó que la microbiota intestinal humana a niveles taxonómicos inferiores (es decir a los niveles de familia y género) es altamente variable de un individuo a otro.

Por lo tanto, la evidencia experimental puso de manifiesto la necesidad de llevar a cabo, sobre una población sana, experimentos de intervención cruzada para impedir que la variabilidad marcada intraindividuos esconda los posibles efectos del tratamiento probiótico o

conduzca a falsos positivos estadísticos.

Cuando fueron evaluadas las modificaciones inducidas en la microbiota intestinal por los dos tratamientos, surgió una diferencia estadísticamente significativa en términos de géneros exclusivamente en el grupo que recibió el tratamiento con *Lactobacillus paracasei* DG (tratamiento activo). Más en particular, se observó un aumento del género *Coprococcus*. En efecto, como se puede ver en las figuras 1.1, 2.1 y 2.2, antes y después del tratamiento con *Lactobacillus paracasei* DG se observó un aumento estadísticamente significativo de coprococci. Por el contrario, en el grupo que recibió el tratamiento con placebo se observó una moderada reducción de los mismos.

Además, después del tratamiento con *Lactobacillus paracasei* DG, se observó una reducción estadísticamente significativa de bacterias del género *Blautia*. Por el contrario, en los grupos que recibieron el tratamiento con placebo se observó un moderado aumento (figuras 1.2, 2.1 y 2.2).

Los Coprococci se hallan entre los principales productores de butirato a nivel intestinal.

El butirato es un compuesto fundamental a nivel intestinal, puesto que por un lado contribuye a restablecer la integridad de la mucosa intestinal y a mantenerla a lo largo del tiempo, y por otro lado tiene importantes efectos antiinflamatorios, hasta el punto que se usa como un coadyuvante para tratamientos dietéticos para colopatías intestinales (por ejemplo, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas).

Además, un análisis de sus genomas revela que esas

bacterias pueden usar succinato como substrato de fermentación.

Esta información es fundamental, en consideración del hecho que los miembros del género *Blautia* generan acetato y succinato como productos finales principales de la fermentación de glucosa.

El succinato es considerado un factor ulcerógeno, por ende capaz de agravar la condición de individuos con colitis ulcerosa, puesto que es el probable responsable del daño mucosal presente sobre todo en las etapas activas de la enfermedad.

En conclusión, como consecuencia del tratamiento con un probiótico, en este caso como consecuencia de la administración de *Lactobacillus paracasei* DG, se observa un incremento de las bacterias que pertenecen al género *Coprococcus* y, por ende, un incremento de la concentración intestinal de butirato.

Al mismo tiempo, se observa una reducción de la concentración de succinato, que puede ser responsable del daño mucosal de individuos con colitis ulcerosa, de manera directa, porque como consecuencia del tratamiento con el probiótico, en este caso como consecuencia de la administración de *Lactobacillus paracasei* DG, se tiene una reducción de las bacterias pertenecientes al género *Blautia*, y, de manera indirecta, porque la aumentada población de coprococci, además es capaz de disminuir la concentración de succinato usándolo como substrato en su proceso de fermentación.

En conclusión, como consecuencia del tratamiento con el probiótico, en el ejemplo específico como consecuencia

de la administración de *Lactobacillus paracasei* DG, se tiene un aumento de la concentración de ácido butírico en las heces de los individuos, con simultánea reducción de otros ácidos orgánicos, como por ejemplo ácido succínico.

Finalmente se usaron los datos correspondientes a la composición de microbiota fecal para un análisis bioinformático orientado a una reconstrucción virtual del metagenoma basado en el conocimiento de los genomas bacterianos (Okuda S, Tsuchiya Y, Kiriya C, Itoh M, Morisaki H. Virtual metagenome reconstruction from 16S rRNA gene sequences. Nat Commun. 2012;3:1203); en otros términos se estableció in silico cuales genes potenciales están presentes y en qué abundancia en una determinada microbiota. Este análisis permitió verificar un aumento putativo de los genes codificadores para la síntesis de ácido fólico y el metabolismo del ácido nicotínico (figuras 3 y 4). Esas dos moléculas representan vitaminas importantes para el huésped humano (denominadas vitamina B9 y B3 respectivamente). La vitamina B9, en particular, representa un factor nutricional de primaria importancia, cuyo déficit, especialmente en condiciones fisiológicas específicas, como por ejemplo embarazo, puede conducir a graves consecuencias para la salud. El tratamiento con el probiótico usado en este estudio, por lo tanto, podría favorecer la habilidad de la microbiota intestinal a producir ácido fólico (vitamina B9), con consiguiente beneficio nutricional para el huésped humano.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención se considera como novedad y por lo tanto se reclama como propiedad lo descrito en las siguientes reivindicaciones:

1.- Método *in vitro* para determinar el cambio de la composición de la microbiota fecal de un individuo como consecuencia de consumir una composición que comprende microorganismos y un placebo, según un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado con placebo, dicho método comprendiendo las etapas de:

(i) recolectar información acerca del estado de salud y/o de las costumbres alimenticias de dicho individuo antes y/o durante y/o después de tomar la composición o el placebo según dicho protocolo;

(ii) obtener una muestra fecal del individuo antes y/o durante y/o después de tomar la composición o el placebo según dicho protocolo;

(iii) analizar la microbiota llevando a cabo un análisis metagenómico sobre la muestra fecal obtenida según la etapa (ii);

(iv) comparar, preferiblemente cualitativa y/o cuantitativamente, la microbiota fecal del individuo antes y/o durante y/o después de tomar la composición o el placebo según dicho protocolo.

2.- Método según la reivindicación 1, donde dichos microorganismos son bacterias y/o levaduras tomadas individualmente o en combinación.

3.- Método según la reivindicación 1 o 2, donde dichos microorganismos pertenecen al género seleccionado entre: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*,

Propionibacterium, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* y *Enterococcus*; preferiblemente dicho microorganismo es una bacteria del género *Lactobacillus* y/o *Bifidobacterium*.

4.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde dichos microorganismos son bacterias del género *Lactobacillus* seleccionado entre las especies: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylolyticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus aviaries*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius* y *Lactobacillus sanfranciscensis*.

5.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, donde dichos microorganismos son bacterias de la especie *Lactobacillus paracasei*, más preferiblemente es la cepa *Lactobacillus paracasei* DG.

6.- Método según una cualquiera de las

reivindicaciones de 1 a 5, donde dichos microorganismos están presentes en la composición en una cantidad comprendida entre 1 y 50 mil millones de unidades formadoras de colonias (Colony Forming Unit = CFU) de microorganismos, preferiblemente 15-30 mil millones, más preferiblemente de 20 a 25 mil millones de CFUs de microorganismos.

7.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, donde dichos microorganismos están presentes en la composición como microorganismos vivos o muertos, o en la forma de lisato o extracto.

8.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 7, donde la composición que comprende microorganismos es formulada para administración oral, preferiblemente en forma sólida, preferiblemente con la forma de pastillas, cápsulas, comprimidos, polvo granular, cápsulas duras, gránulos solubles en agua, sobrecitos o píldoras.

9.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8, donde el análisis metagenómico comprende al menos una de las siguientes etapas, preferiblemente todas:

- extracción de los ácidos nucleicos, preferiblemente DNA, de la muestra fecal, y
- tipificación molecular de los microorganismos presentes en la microbiota fecal.

10.- Método según la reivindicación 9, donde la tipificación de la microbiota fecal es llevada a cabo analizando la secuencia nucleotida de al menos una porción del gen codificador de la subunidad 16S de

ribosoma.

11.- Método según la reivindicación 9 o 10, donde la tipificación de la microbiota fecal se obtiene amplificando la secuencia nucleotida de al menos una porción del gen codificador de la subunidad 16S de ribosoma mediante PCR.

12.- Método según la reivindicación 11, donde la PCR es llevada a cabo usando SEQ ID NO: 1 y 2.

13.- Método según la reivindicación 11 o 12, donde la secuencia nucleotida amplificada es secuenciada, preferiblemente usando la técnica de secuenciación de Ion Torrent.

14.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones de 9 a 13, donde los microorganismos vienen caracterizados por medio de programas de agrupamiento jerárquico y/o análisis taxonómico, y/o construyendo dendogramas filogenéticos, preferiblemente con mapas de calor.

15.- Método según la reivindicación 14, donde los resultados de la caracterización vienen analizados usando métodos estadísticos paramétricos y/o no paramétricos.

16.- Kit para llevar a cabo el método según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 15, que comprende:

- un código de identificación del kit;
- al menos una formulación oral de una composición que comprende microorganismos, preferiblemente de la especie *Lactobacillus paracasei*, más preferiblemente la cepa *Lactobacillus paracasei* DG, en una cantidad comprendida entre 1 y 50 mil millones de unidades formadoras de

colonias (Colony Forming Unit = CFU) de microorganismos, preferiblemente 15-30 mil millones, más preferiblemente de 20 a 25 mil millones de CFUs de microorganismos;

- al menos una formulación oral de un placebo que no contiene microorganismos;
- dicha composición de microorganismos siendo tomada de conformidad con un protocolo aleatorizado, cruzado, doble ciego, controlado respecto a dicho placebo, y dicha composición que comprende dichos microorganismos y placebo siendo identificados mediante un código.

71S066212W01@ES SequenceListing
SEQUENCE LISTING

<110> Sofar SpA
<120> Método para evaluar los efectos de una composición que comprende
microorganismos sobre la microbiota intestinal
<130> 71.S0662.12.IT.1
<160> 2
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Probio_Uni
<400> 1
cctacgggrs gcagcag 17

<210> 2
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Probio-Rev
<400> 2
attaccgcgg ctgct 15

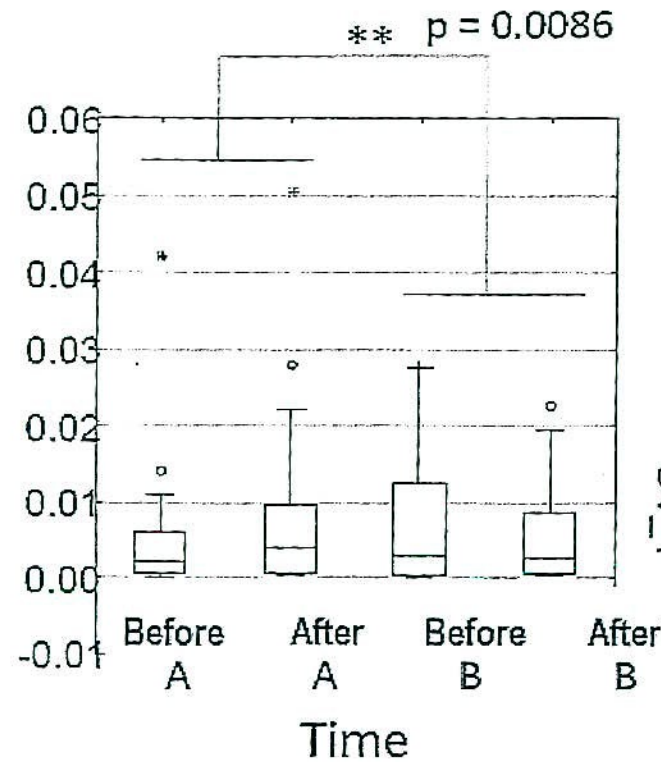
RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para determinar la actividad probiótica/paraprobiótica de una composición que comprende microorganismos, en particular bacterias, dicho método basándose en la evaluación, mediante análisis metagenómico, del cambio cualitativo y/o cuantitativo de la microbiota fecal como consecuencia de consumir la composición.

Además, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo dicho método.

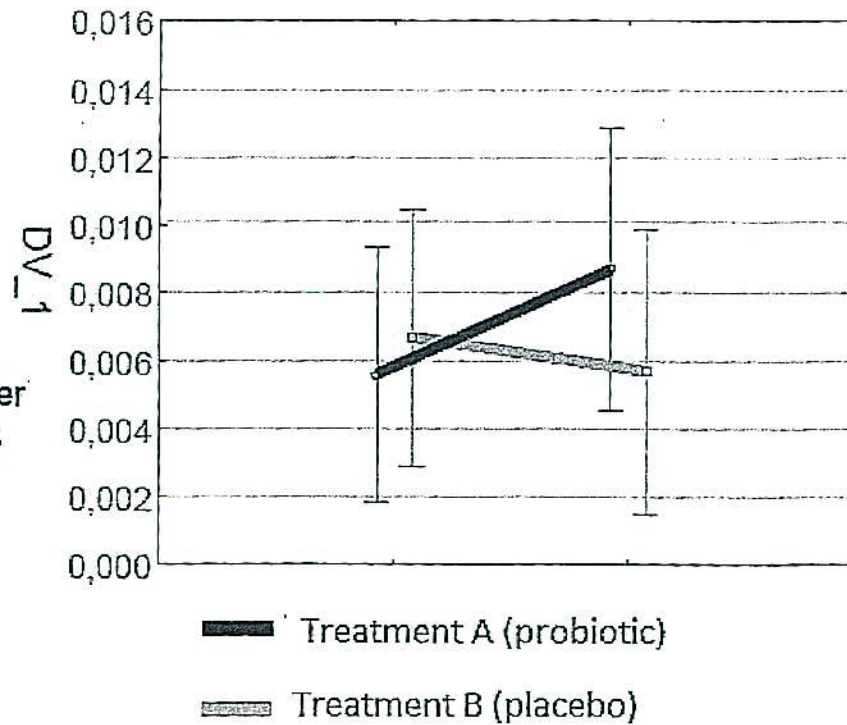
Coprococcus ssp.

Fig.1.1



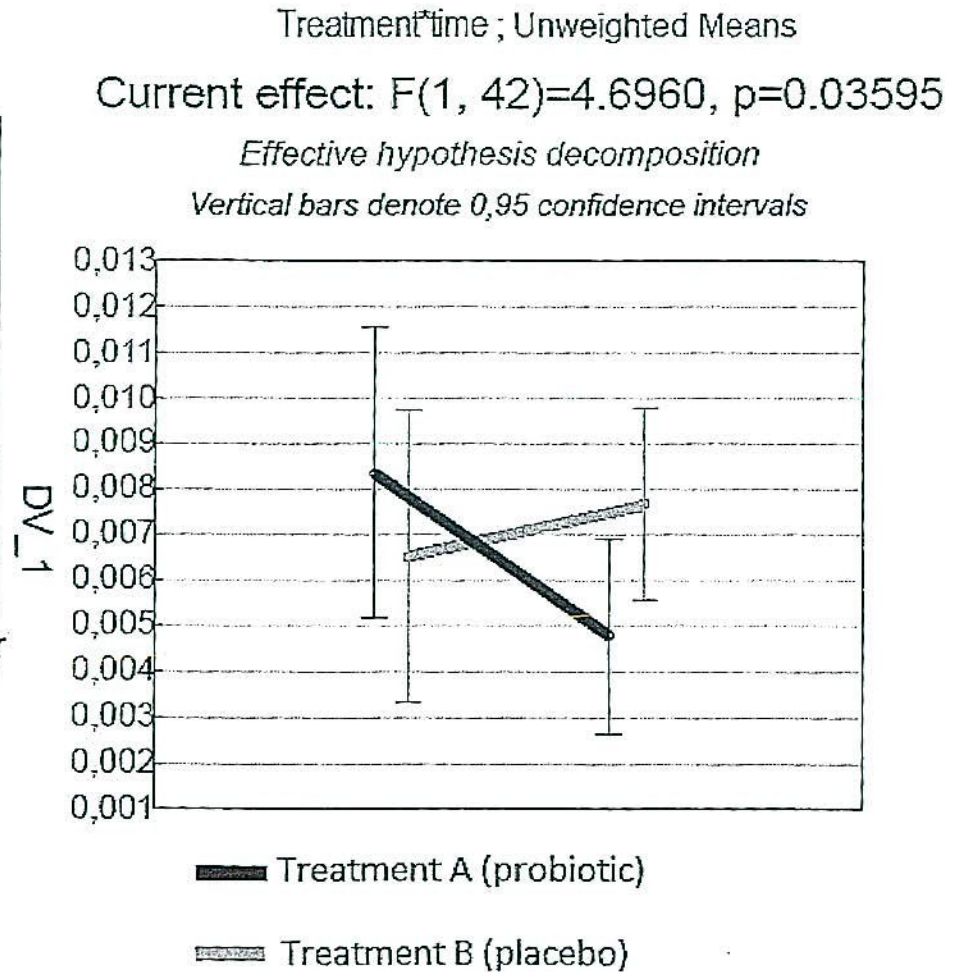
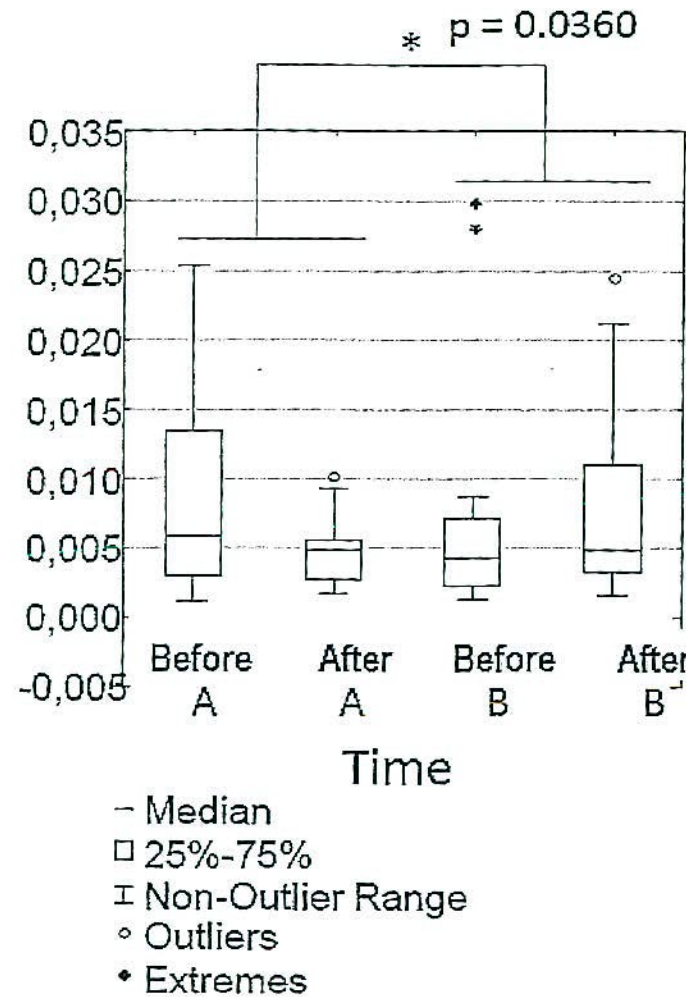
- Median
- 25%-75%
- ├ Non-Outlier Range
- ° Outliers
- * Extremes

Treatment*time ; Unweighted Means
 Current effect: $F(1, 42)=7.6014, p=0.00859$
 Effective hypothesis decomposition
 Vertical bars denote 0,95 confidence intervals



Blautia ssp.

Fig.1.2



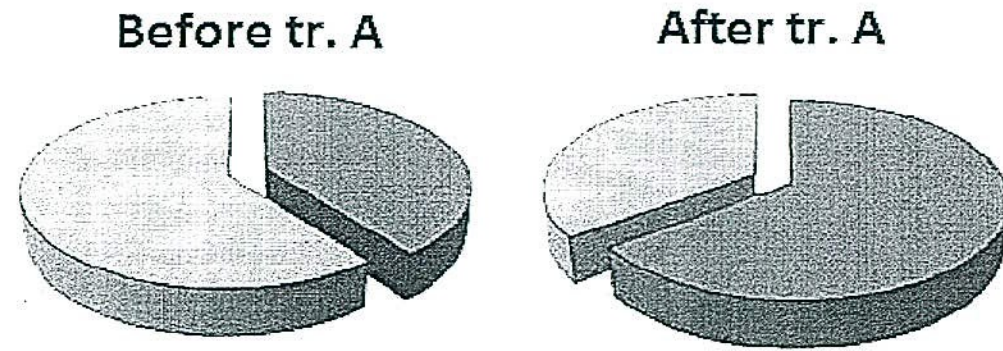


Fig.2.1

■ *Coprococcus* □ *Blautia*

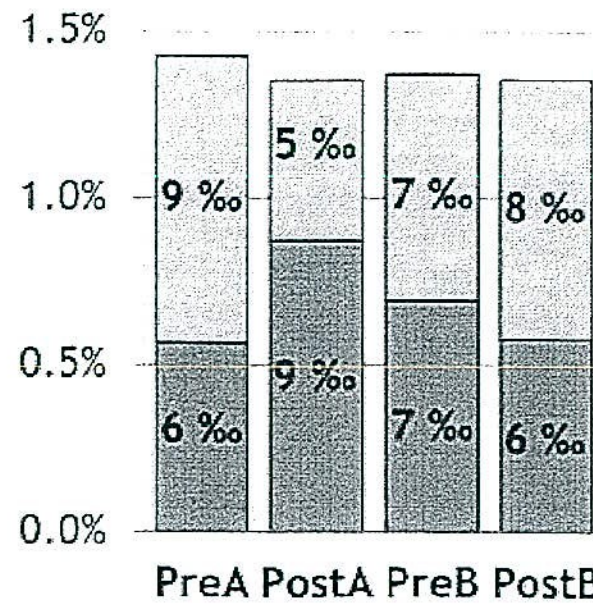


Fig.2.2

Fig.3

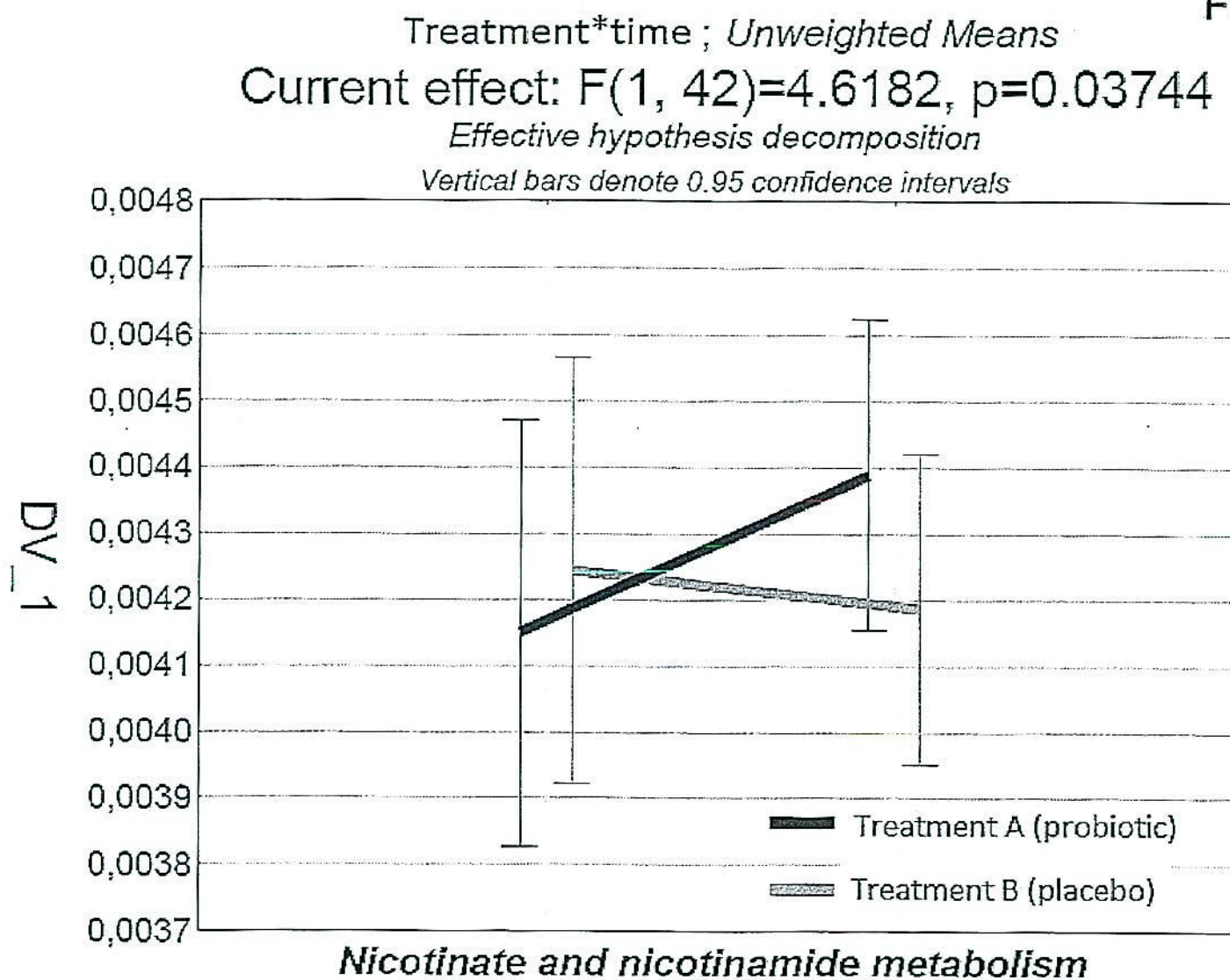


Fig.4

Treatment*time; *Unweighted Means*
 Current effect: $F(1, 42)=4.8817, p=0.03265$

Effective hypothesis decomposition

Vertical bars denote 0.95 confidence intervals

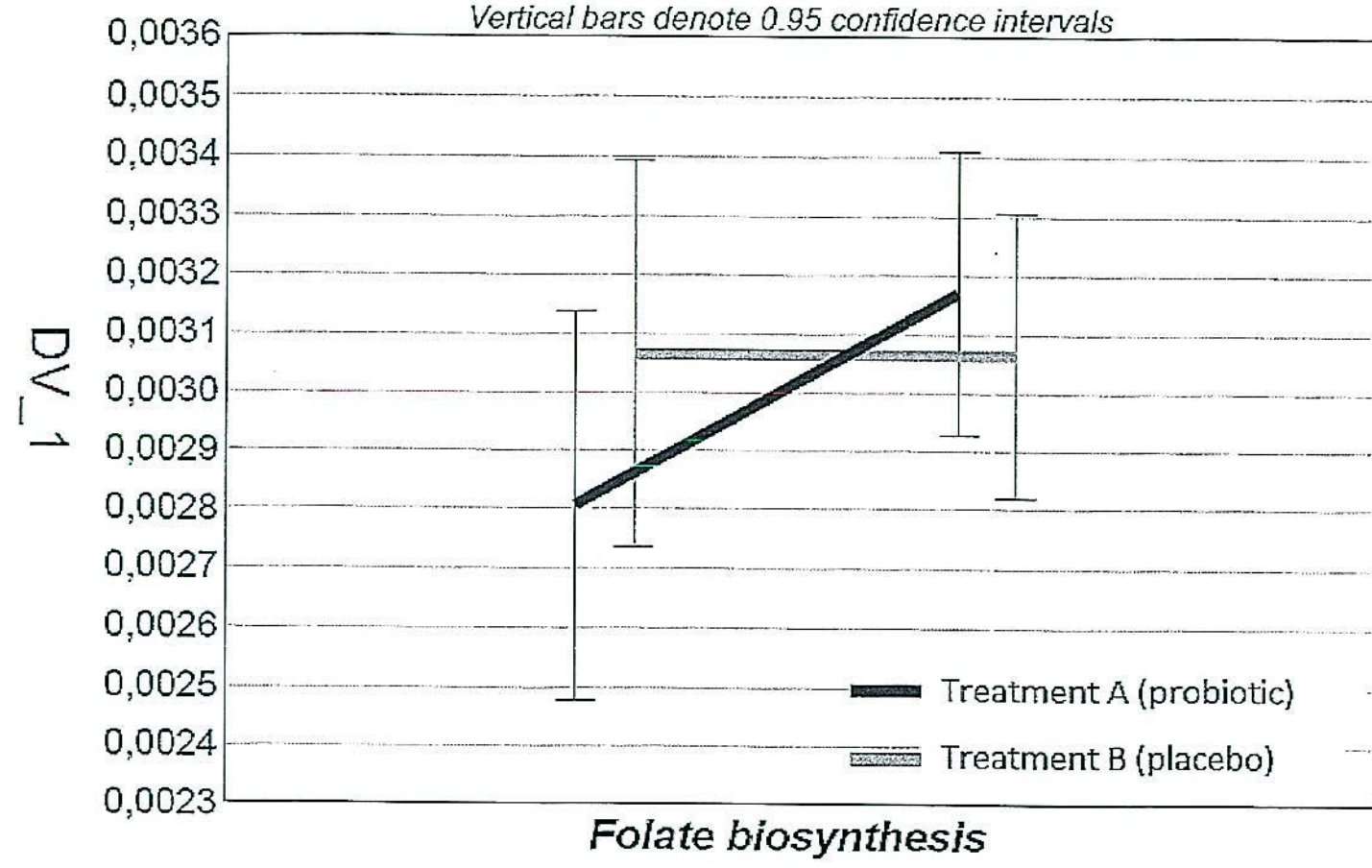


Figura 1.1

Género Coprococcus

Antes Después Antes Después

Tiempo

- Median

□ 25% - 75%

I Non-Outlier Range

= Outliers

= Extremes

Tiempo * tratamiento; Medias no ponderadas

Current effect: $F(1,42)=7,6014$, $p=0,00859$

Effective hypotshesis decomposition

Las barras verticales denotan intervalos de confianza de 0,95

Tratamiento A (probiótico)

Tratamiento B (placebo)

Figura 1.2

Género Blautia

Antes Después Antes Después

Tiempo

- Median

□ 25% - 75%

I Non-Outlier Range

= Outliers

= Extremes

Tiempo * tratamiento; Medias no ponderadas

Current effect: $F(1,42)=4,6960$, $p=0,03595$

Effective hypothesis decomposition

Las barras verticales denotan intervalos de confianza de 0,95

Tratamiento A (probiótico)

Tratamiento B (placebo)

Figura 2.1

Antes de tratamiento A

Después de tratamiento A

Coprococcus

Blautia

PreA PostA PreB PostB

Figura 3

Tiempo * tratamiento; Medias no ponderadas

Current effect: $F(1,42)=4,6182$, $p=0,03744$

Effective hypothesis decomposition

Las barras verticales denotan intervalos de confianza de 0,95

Tratamiento A (probiótico)

Tratamiento B (placebo)

Metabolismo nicotinado y nicotinamido

Figura 4

Tiempo * tratamiento; Medias no ponderadas

Current effect: $F(1,42)=4,8817$, $p=0,03265$

Effective hypothesis decomposition

Las barras verticales denotan de intervalos de confianza de 0,95

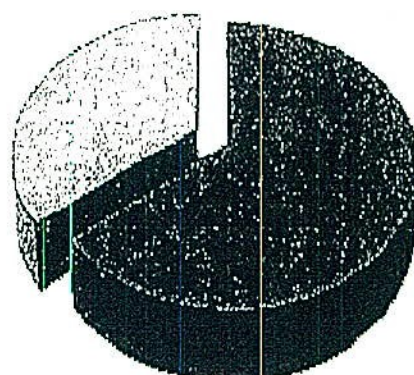
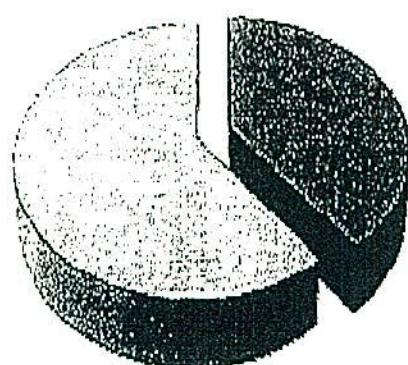
Tratamiento A (probiótico)

Tratamiento B (placebo)

Biosíntesis de folato

Before tr. A

After tr. A



■ *Coprococcus* ■ *Blautia*

LAW OFFICES
PEDRO CASTILLO PINEDA & ASOCIATES
 P.O. BOX 48362
 Bogotá, Colombia / South America

COLOMBIA

Poder General

(1)
 SOFAR S.P.A.

Domiciliado en (2)
 20060 Trezzano Rosa (Milano), Italia

Nombra al Dr. JERONIMO CASTILLO BONILLA y/o Dra. XIMENA BONILLA PEREIRA y/o Dr. ALVARO CASTILLO CASTILLO GRAU, Calle 93A N° 14-17 Oficina 311 en Bogotá, Colombia, como sus representantes con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Modelos y de Dibujos Industriales, de Nombres Comerciales y Enseñas, Lemas Comerciales y Denominaciones de Origen, lo mismo que trasposos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, acciones de cancelación contra Registros de marca, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, emiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares; solicitar la nulidad de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, así como la de Registro de marcas ante la autoridad nacional competente; aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos, cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir y tomar en fin todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades legales necesarias. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Dado y firmado en (3)

Procura

(1)
 SOFAR S.P.A.

Domiciliato in (2) Via Firenze 40
 20060 Trezzano Rosa (Milano), Italia

nomina con la presente Dott. JERONIMO CASTILLO BONILLA e/o Dott. XIMENA BONILLA PEREIRA e/o Dott. ALVARO CASTILLO GRAU, , Calle 93A N° 14-17 Office 311, Bogotá, Colombia suoi rappresentanti con la facoltà speciale, ampia e sufficiente ad ottenere dagli uffici e dalle autorità Colombiane, amministrative, giudiziarie e di polizia, in prima o seconda istanza, brevetti di invenzione, registrazione di marchi, di modelli e disegni industriali, di nomi commerciali ed insegne, come pure cessioni, estensioni, rinnovi, cambiamenti di nome, registrazione di licenze di sfruttamento e di licenze di uso riferentisi a quanto sopra, dando facoltà di compiere di fronte a dette autorità tutti i passi necessari per gli scopi indicati, depositare domande, presentare descrizioni, correzioni, proteste, dichiarazioni, appelli e reclami, richiedere l'applicazione di misure precauzionali, di accettare in sua vece e rappresentanza la cessione di diritti di invenzione e titoli di invenzione che possa assergli fatta da qualunque persona, di pagare tutte le tasse, quote e pagamenti prescritti dalla legge, di ricevere tutti i documenti e titoli e di acusarne ricevuta; di compiere quanto altro necessario, rinunciare e compiere in fatto ogni altra azione che sia giudicata necessaria per la salvaguardia dei nostri interessi, e qualora vengano presentate opposizioni interposti come attore e convenuto, con tutte le facoltà legalmente richieste. Questa procura comprende la facoltà di accettare, rinunciare, ottenere compromessi e transazioni, sostituire in tutto o in parte, revocare sostituzioni, riceverli notifiche e nominare avvocati per scopi extra giudiziali o giudiziali.

Dado e suscritto in (3)

March 3, 2016
 BIFFI Andrea, CEO



LAW OFFICES
PEDRO CASTILLO PINEDA & ASSOCIATES
P.O BOX 48362
Bogotá, Colombia / South America

Power with Assignment

The undersigned

- Simone Domenico, GUGLIELMETTI, domiciled at Via Cima Otto e Camillo 23, 20134 Milano, Italia
- Ruggero ROSSI, domiciled at Via Federico Engels 1, 20153 Milano, Italy
- Walter FIORE, domiciled at Via Giuseppe Rossini 12, 20060 Trezzano Rosa (Milano), Italy
- Andrea BIFFI, domiciled at Via Mulino Vecchio 146, 24059 Ugnano (Bergamo), Italy

hereby appoints JERÓNIMO CASTILLO BONILLA and/or XIMENA BONILLA PEREIRA and/or ALVARO CASTILLO GRAU domiciled at Calle 93A N° 14-17 of Bogotá, Colombia, conjointly, alternatively or indistinctly as attorneys with special and sufficient powers to apply and obtain from the competent offices and authorities of Colombia Patent of Invention for

METHOD FOR EVALUATING THE EFFECTS OF A COMPOSITION COMPRISING MICROORGANISMS ON INTESTINAL MICROBIOTA, Corresponding to International Appln: PCT/IB2014/064284

to be issued in the name of

SOFAR S.P.A.

domiciled at Via Firenze 40, 20060 Trezzano Rosa (Milano), Italy

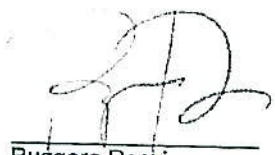
to whom assignment has been made of all right and title of said Patent for the territory Colombia without any restriction.

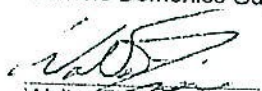
The assignee also signs these presents in token of acceptance of the said assignment and hereby authorizes the said attorneys to take all necessary steps before the said offices and authorities for the purpose above stated; to make petitions, declarations and claims and to use all means which said attorneys shall deem proper for the safeguard of the interests of the constituent.

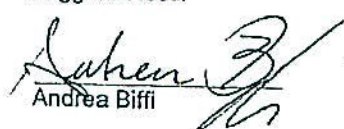
Signatures

Assignors


Simone Domenico Guglielmetti


Ruggero Rossi


Walter Fiore


Andrea Biffi

Assignee


by SOFAR S.P.A.
Andrea BIFFI, CEO



No. 16-084061- -00000-0000

Fecha: 2016-04-05 09:17:36 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 51

4
51



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐