

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 646**

21 Número de solicitud: 202030586

51 Int. Cl.:

A61K 35/741 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.06.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.12.2021

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (80.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE
(20.0%)**

72 Inventor/es:

AGUSTÍ FELIÚ, Ana;

CAMPILLO NUEVO, Isabel;

SANZ HERRANZ, Yolanda;

FELIPO ORTS, Vicente y

BALZANO, Tiziano

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **CEPA DEL GÉNERO *BACTEROIDES* PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO Y/O PREVENCIÓN DE TRASTORNOS ALIMENTARIOS**

57 Resumen:

Cepa del género *Bacteroides* para su uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos alimentarios. La presente invención se refiere a una cepa del género *Bacteroides*, preferiblemente a la cepa B. uniformis CECT 7771, para uso en la prevención o reducción del riesgo y en el tratamiento de formas sub-clínicas o clínicas de trastornos del comportamiento alimentario, tales como hiperfagia, el trastorno por atracón, la ingesta adictiva o selectiva de alimentos, la bulimia nerviosa, la anorexia nerviosa, la ansiedad asociada a alteraciones de la conducta alimentaria y la megarexia. La presente invención también se refiere a una composición que comprende dicha cepa para el mismo uso.

ES 2 886 646 A1

DESCRIPCIÓN**Cepa del género *Bacteroides* para su uso en el tratamiento y/o prevención de trastornos alimentarios**

5

La presente invención se refiere a una bacteria del género *Bacteroides* y, más específicamente, de la especie y la cepa *B. uniformis* CECT 7771 para su uso en la prevención, reducción del riesgo y/o el tratamiento de formas sub-clínicas o clínicas de trastornos de la conducta alimentaria, incluyendo el exceso de ingesta o hiperfagia, el trastorno por atracón, la ingesta adictiva o selectiva de alimentos, la bulimia nerviosa y la anorexia nerviosa, entre otros. La presente invención se encuadra dentro del campo de la actividad terapéutica de composiciones o preparaciones farmacéuticas, así como dentro del campo de la alimentación.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los trastornos de la conducta alimentaria se caracterizan por una falta de control sobre la ingesta de alimentos. Estas alteraciones pueden conllevar un aumento de la ingesta y, por tanto, contribuir a la obesidad y sus complicaciones, así como derivar en un comportamiento compulsivo o adictivo, contribuyendo al desarrollo de patologías mentales. Su origen es complejo, interviniendo factores biológicos, psicológicos y socioculturales y, por tanto, también su tratamiento y prevención.

Los trastornos de la conducta alimentaria, relacionados con el consumo excesivo y/o descontrolado de alimentos, están aumentando y muestran una prevalencia que varía desde un 5% en la población general hasta más del 40% en los individuos obesos, lo que agrava las consecuencias de la obesidad (Lemeshow AR, et al. *Eat BehavDec*; (2016) 23:110-114). Estas alteraciones del comportamiento alimentario también están asociadas con otros trastornos mentales, con el abuso de sustancias, y a menudo se presentan conjuntamente (por ejemplo, la bulimia y abuso del alcohol), incrementando la dimensión del problema (Munn-Chernoff MA, et al. *Addict Biol*. (2020) Feb 16: e12880. doi: 10.1111/adb.12880). Estas asociaciones sugieren que estas patologías mentales pueden tener un sustrato etio-patológico común. Además, estudios epidemiológicos han asociado las alteraciones del comportamiento alimentario con otros trastornos psiquiátricos como la ansiedad, entre otros (Levin BE. *Am J Physiol*. (1996) Feb;270(2 Pt 2):R456-61).

En el control de la ingesta alimentaria intervienen dos componentes: los aspectos homeostáticos relacionados con el balance energético y los hedónicos, relacionados con la sensación de placer o recompensa que provoca la ingesta de alimentos. El objetivo principal del componente homeostático es cubrir las necesidades energéticas para

5 mantener las funciones vitales del organismo. Diferentes hormonas que se producen en el tracto gastrointestinal y tejidos periféricos, como el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), la insulina, la grelina, la leptina, la colecistoquinina o el péptido YY regulan el equilibrio energético y la sensación de hambre o saciedad (Cummings, D.E. and J. Overduin. *J Clin Invest*, (2007) 117(1), 13-23). A nivel del sistema nervioso central, el hipotálamo es una de

10 las áreas cerebrales más importantes para la regulación de la ingesta alimentaria a corto y largo plazo mediante la síntesis de neuropéptidos orexigénicos, como el neuropéptido Y (NPY) y el "agouti-related peptide" (AgRP), y los neuropéptidos anorexigénicos, como el transcrito regulado por la cocaína y las anfetaminas (CART) y la proopiomelanocortina (POMC), entre otros (Arora, S. and Anubhuti, *Neuropeptides*, (2006) 40(6), 375-401).

15

Entre los componentes que regulan el aspecto hedónico de la ingesta de alimentos, uno de los principales es el sistema dopaminérgico. El principal neurotransmisor asociado con la respuesta de recompensa en el sistema mesolímbico es la dopamina (DA) y es crucial para el "deseo" de ingerir comida (Tindell, A.J., *et al. Eur J Neurosci*, (2005) 22(10), 2617-

20 34). Las neuronas DA se proyectan al estriado, corteza, hipotálamo y sistema límbico, incluyendo el núcleo accumbens (NAc) y regulan diferentes funciones fisiológicas, incluyendo la secreción de hormonas, así como la motivación y las emociones (Tritsch, N.X., and Sabatini, B. L., *Neuron* (2012) 76, 33–50). El estudio de la neurobiología del circuito de recompensa se ha centrado en el NAc ya que la mayoría de las drogas de abuso

25 liberan DA en el NAc cada vez que se toman (Wise, R.A., *et al., Psychopharmacology (Berl)*, (1995) 120(1), 10-20) y se ha observado un efecto similar en modelos animales que se alimentan con alimentos sabrosos o apetecibles (Bassareo, V. and G. Di Chiara, *Eur J Neurosci*, (1999) 11(12), 4389-97).

30 Evidencias científicas indican que existe una comunicación bidireccional entre el intestino y el cerebro (llamado eje intestino-cerebro) que está regulada por señales hormonales, inmunológicas y neurales. El microbiota intestinal actúa como regulador del llamado eje intestino-cerebro y, a través de las interacciones con la dieta, e influye en el sistema nervioso central y en el comportamiento, como se ha demostrado en estudios de

35 intervención con probióticos o antibióticos que modifican la microbiota, sobre todo en animales de experimentación (Rodgers R. J. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*

(2010) 97(1), 3–14). En cuanto a su función en la regulación del componente homeostático que regula la ingesta, algunos estudios sugieren que la microbiota intestinal y los metabolitos producidos por ésta (ácidos grasos de cadena corta) pueden estimular la producción de hormonas gastrointestinales, como el GLP-1 y el PYY, y reducir el apetito a corto plazo (Cummings, D.E. and J. Overduin. *J Clin Invest* (2007) 117(1), 13-23). Sin embargo, se desconoce en gran medida su posible función en el control de los aspectos hedónicos de la ingesta, así como en complicaciones mentales asociadas a los trastornos alimentarios.

10 Debido al aumento continuado de la prevalencia de alteraciones del comportamiento alimentario, resulta necesario continuar con la búsqueda de estrategias preventivas y terapéuticas eficaces. Éstas pueden estar basadas en nuevas cepas bacterianas, que sean parte de la microbiota intestinal de individuos sanos, y en sus moléculas activas, que medien en la relación intestino cerebro y que puedan actuar sobre vías neurales implicadas en el control del componente hedónico y los sistemas de recompensa que regulan la ingesta de alimentos, como se propone en la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere en un primer aspecto a una cepa bacteriana del género *Bacteroides* (en adelante, cepa de la invención), o a una cepa derivada de ella, para su uso en la prevención, reducción del riesgo y/o el tratamiento de formas sub-clínicas y clínicas de trastornos de la conducta alimentaria.

25 En una realización más preferida, la cepa bacteriana para su uso es una cepa de la especie *B. uniformis*.

En una realización aún más preferida, la cepa bacteriana para su uso es la cepa *B. uniformis* CECT 7771.

30

Los trastornos de la conducta alimentaria son alteraciones derivadas de una falta de control sobre la ingesta de alimentos, incluyendo la hiperfagia o exceso de ingesta, el trastorno por atracón, la ingesta adictiva o selectiva de alimentos, la bulimia nerviosa y la anorexia nerviosa, entre otros.

35

En una realización preferida de la invención, el trastorno de la conducta alimentaria es

seleccionado de la lista que comprende: ingesta excesiva o hiperfagia, el trastorno por atracón, la ingesta adictiva o selectiva de alimentos, la bulimia nerviosa, la anorexia nerviosa, ansiedad asociada a alteraciones de la conducta alimentaria y megarexia.

5 Los inventores han descubierto que el género *Bacteroides* y más específicamente la especie *B. uniformis* y la cepa *B. uniformis* CECT 777 presenta capacidad de reducir la ingesta de calorías totales y la cantidad de comida sólida en forma de atracón en un modelo animal. Episodios de ingesta en forma de atracón (ingesta excesiva en un corto período de tiempo) son característicos de la hiperfagia, el llamado trastorno por atracón, la ingesta adictiva o selectiva de alimentos y la bulimia nerviosa y también se producen en la anorexia nerviosa, en la que se pueden alternar períodos de ayuno con episodios puntuales de ingesta en forma de atracón. Este efecto se ha demostrado (tal y como se muestra en los ejemplos proporcionados en la invención) mediante la administración de la cepa *B. uniformis* CECT 7771 por vía oral a un modelo animal en el que se induce la pérdida de control de la ingesta y la ingesta por atracón mediante la introducción de períodos intermitentes de ayuno y posterior exposición a comida normal y/o comida sabrosa (por ejemplo, alta en azúcares como la sacarosa). Los estudios realizados han demostrado que al final del protocolo (18 días) el grupo experimental que ha recibido el vehículo come más calorías totales en el período de atracón que el grupo experimental que ha sido tratado con *B. uniformis* CECT 7771, que atenúa esta alteración en la ingesta. También se ha observado que la administración de *B. uniformis* CECT 7771 durante el estudio reduce, especialmente, la ingesta de alimento sólido en forma de atracón, ya que mientras que en el grupo que recibió el vehículo aumentó significativamente la ingesta de comida sólida entre el día 2 y el día 18, en el grupo que recibió la cepa CECT 7771 no se observó un aumento significativo, sugiriendo que esta bacteria atenúa el aumento de ingesta de comida sólida inducido por el ayuno intermitente (Ejemplo 1, Figura 1B)..

Los inventores también han demostrado que una cepa del género *Bacteroides* reduce la ansiedad asociada a alteraciones en el control de la ingesta de alimentos, tanto en el período de actividad y, por tanto, de búsqueda de alimentos e ingesta (nocturno), como en periodo de descanso (luz). En concreto, los inventores han demostrado que la bacteria *B. uniformis* CECT 7771, cuyo uso es el objeto de la invención, reduce el número de entradas a la zona clara en el test light-dark, que están aumentadas en el modelo que recibe el vehículo, indicando que reduce la ansiedad y el comportamiento arriesgado durante el período de actividad. Además, se demuestra que la administración de la bacteria *B. uniformis* CECT 7771 reduce el tiempo de latencia a entrar en contacto con el alimento,

que está aumentado en el modelo, mediante el test de ansiedad frente a hambre realizado en el período de descanso. (Ejemplo 2, Figura 2D).

5 Tal y como se demuestra en la presente invención, el uso de la bacteria *B. uniformis* CECT 7771 permite restablecer la expresión de los receptores de dopamina en la corteza prefrontal del cerebro (D1R) y en el intestino (D1R y D2R). La mejora de la señalización de dopamina a nivel del sistema nervioso entérico y central, mediante la normalización de la expresión de estos receptores, constituye un mecanismo de regulación del sistema de recompensa, que puede explicar la reducción de la ingesta en forma de atracón, como
10 resultado de la administración de la bacteria.

Adicionalmente, el uso de la bacteria *B. uniformis* CECT 7771 permite restablecer algunas de las alteraciones causadas por el ayuno intermitente en la microbiota intestinal, como la reducción de la abundancia de *Muribaculum* spp. ya que sus concentraciones se
15 normalizan al administrar la bacteria objeto de la patente. Además, la administración de *B. uniformis* CECT 7771 aumenta la prevalencia y abundancia de ésta y otras especies bacterianas (*Akkermanisa muciniphila* y *Christensenella minuta*) que pueden explicar sus efectos beneficiosos sobre la ingesta y la ansiedad (Ejemplo 4, Figura 5).

20 En el ámbito de la presente invención, la cepa *B. uniformis* CECT 7771 se refiere a una cepa aislada de heces de lactantes, identificada y depositada en la colección española de cultivos tipo (CECT) el 21 de Julio de 2010 y a la que le correspondió el número de depósito CECT 7771. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia Edificio de investigación Campus de Burjassot 46100 Burjassot (Valencia).

25 En el ámbito de la invención, es posible utilizar una cepa derivada de la cepa *B. uniformis* CECT 7771, donde dicha cepa mantiene o mejora las capacidades descritas a lo largo de la presente invención. El microorganismo derivado puede producirse de forma natural o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la
30 técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, el crecimiento del microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, modificando las condiciones de crecimiento (por ejemplo, aumentando la aireación o exposición al oxígeno, el pH o la temperatura) o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Según una realización preferida, se utiliza una cepa derivada de la cepa *B.*
35 *uniformis* CECT 7771 generada por adaptación al entorno o por modificación genética dirigida. Los términos “cepa mutante” o “cepa derivada” pueden ser utilizados

indistintamente.

La cepa *B. uniformis* CECT 7771 o cualquier mutante o derivado de la misma, puede ser utilizada en cualquier forma que ejerza los efectos descritos, como por ejemplo, según una
5 realización preferida de la presente invención, la cepa *B. uniformis* CECT 7771 está en forma de células viables (cultivables o no cultivables), o según otra realización preferida de la invención la cepa está en forma de células no viables (células “muertas” inactivadas por cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, calor, congelación, disrupción mecánica o química o radiación ultravioleta).

10

En la presente invención también se contempla la combinación de los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa CECT 7771 para su uso en el tratamiento (de formas sub-clínicas o clínicas) y/o en la reducción del riesgo y prevención de trastornos de la conducta
15 alimentaria.

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

30

Un segundo aspecto de la invención se refiera a una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende una cepa del género *Bacteroides*, más

preferiblemente de la especie *Bacteroides uniformis* y aun más preferiblemente la cepa *B. uniformis* CECT 7771, una cepa derivada de ella y/o los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa o cualquiera de sus combinaciones para su uso en la prevención, reducción del riesgo y/o el tratamiento de formas sub-clínicas o
5 clínicas de trastornos de la conducta alimentaria.

Preferiblemente, los trastornos de la conducta alimentaria son los descritos en el primer aspecto de la invención.

10 En una realización preferida, la composición de la invención para su uso tiene una concentración de la cepa de la invención de entre 10^4 y 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.

La composición de la invención para su uso además puede comprender al menos otro
15 microorganismo adicional diferente a la cepa *B. uniformis* CECT 7771 y/o sus componentes celulares, metabolitos o moléculas secretadas, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, pero sin limitarse, el microorganismo adicional que puede formar parte de dicha composición es seleccionado entre al menos uno de los siguientes grupos:

- al menos una cepa de otra especie del género *Bacteroides* y, especialmente, o de
20 la especie *Bacteroides uniformis*;

- al menos una bacteria láctica o bifidobacteria de origen intestinal, alimentario o ambiental. La bacteria láctica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, una bacteria del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* o *Streptococcus*;

25 - al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariontes de origen intestinal, alimentario o ambiental, como por ejemplo pero sin limitarse a Archaea, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Metanobacteria, Spirochaetes, Fibrobacteres, Deferribacteres, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cyanobacteria*, *Methanobrevibacterium*,
30 *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Christensenella* o *Clostridium*;

35 - al menos una cepa de hongo o levadura, como, por ejemplo, pero sin limitarse, perteneciente al género *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*,

Aspergillus, Rhizopus, Mucor o Penicillium.

Dicho microorganismo adicional puede ser una cepa de la misma especie o de diferente especie o grupo taxonómico de microorganismos del que le corresponde a la cepa de la
5 invención. Las células que comprende la composición pueden ser no viables o viables y estar en cualquier fase del estado de desarrollo o crecimiento (latente, exponencial, estacionaria, etc.), independientemente de la morfología que presente. En una realización particular, dicho microorganismo adicional comprende al menos una bacteria intestinal o una bacteria láctica.

10

Opcionalmente, en otra realización particular, la composición de la invención para su uso puede además comprender al menos un componente bioactivo (sustancia activa, principio activo o agente terapéutico), como son por ejemplo componentes de alimentos, productos vegetales y/o fármacos.

15

El término “componente bioactivo” hace referencia a un compuesto con actividad biológica en el ámbito de aplicación de la patente que pueda mejorar o complementar la actividad de la cepa *Bacteroides* de la invención (preferiblemente *B. uniformis* CECT 7771), incluyendo ingredientes o componentes de los alimentos (por ejemplo y sin limitar: ácidos grasos poli-
20 insaturados, ácido linoléico conjugado, prebióticos, fibra, goma Guar, glucomanano, quitosano, picolinato de cobre, calcio, etc.), otros probióticos, plantas, extractos o componentes de plantas y fármacos.

En una realización particular, la composición de la invención es una composición
25 farmacéutica. La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formado al menos por la cepa de la invención en cualquier concentración; o al menos por los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cualquiera de sus combinaciones, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado
30 general de su salud o reducción del riesgo de enfermedad. Dicha composición farmacéutica puede ser un medicamento.

El término medicamento tiene un significado más limitado que el significado de “composición farmacéutica”, tal como se define en la presente invención, ya que el
35 medicamento implica necesariamente un efecto preventivo o terapéutico. El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El

“medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

Además del requerimiento de la eficacia terapéutica donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y un componente bioactivo, donde a dicho componente bioactivo se le atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento. Dicho compuesto de la invención se refiere obviamente a la cepa de la invención, o a la cepa derivada de ella, o a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de la invención.

En una realización particular, la composición de la invención para su uso comprende al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptables.

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

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

Además, como entiende el experto en la materia, el excipiente y el vehículo deben ser
20 farmacológicamente aceptables, es decir, que el excipiente y el vehículo estén permitidos y evaluados de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

La composición farmacéutica o medicamento de la invención para su uso se puede presentar bajo cualquier forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad
25 terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, puede estar en forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral, preferiblemente en una forma adaptada a la administración oral. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución,
30 supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. En una realización particular, la composición de la invención para su uso se presenta en una forma adaptada
35 a la administración oral, sublingual, nasal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.

En una realización más particular, la composición farmacéutica de la invención para su uso se presenta en una forma adaptada a la administración oral. La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral.

5 Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

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

15 En la presente invención, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad del componente de la composición farmacéutica que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir la prevención y/o el tratamiento, tal como se define más adelante, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad de la cepa de la invención; de los
20 componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, en cualquier forma de presentación; la cantidad terapéuticamente efectiva variará también según la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la
25 gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

30 Alternativamente a la composición farmacéutica, la composición de la invención para su uso también puede ser una composición nutritiva.

35 El término "composición nutritiva" de la presente invención se refiere a aquel alimento o componente de los alimentos que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención o reducción del riesgo y/o tratamiento de una

enfermedad o condición sub-clínica o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término “composición nutritiva” de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal.

- 5 En una realización particular, la composición nutritiva es un alimento, un suplemento, un nutracéutico, un probiótico o un simbiótico.

En una realización más particular, el alimento se selecciona de la lista que comprende: producto lácteo, producto vegetal, producto cárnico, aperitivo, chocolate, bebida o alimento
10 infantil. El producto lácteo se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, producto derivado de leche fermentada (por ejemplo, pero sin limitar yogur o queso) o no fermentada (por ejemplo, pero sin limitar, helado, mantequilla, margarina, suero lácteo). El producto vegetal es, por ejemplo, pero sin limitarse, un cereal en cualquier forma de presentación, fermentado o no fermentado. La bebida puede ser, pero sin limitarse,
15 cualquier zumo de frutas o leche no fermentada.

El término “suplemento”, sinónimo de cualquiera de los términos “suplemento dietético”, “suplemento nutricional”; o “suplemento alimenticio” es un “ingrediente alimenticio” destinado a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos
20 son, pero sin limitarse, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. No se presentan como sustitutos de un alimento convencional ni como componente único de una comida o de la dieta alimenticia sino como complemento de la dieta.

25 El término “nutracéutico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto beneficioso sobre la salud.

El término “probiótico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a
30 microorganismos vivos que cuando son suministrados en cantidades adecuadas promueven beneficios en la salud del organismo hospedador.

El término “simbiótico” tal como se emplea en la presente invención se refiere a aquellos alimentos que contienen una mezcla de prebióticos y probióticos. Por regla general
35 contienen un componente prebiótico que favorece el crecimiento y/o actividad metabólica y en definitiva el efecto del probiótico con el que se combina, como por ejemplo y sin limitar

puede ser la asociación de la fructooligosacáridos, galactooligosacáridos o arabinooligosacáridos a las bifidobacterias.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa de la invención, de una cepa derivada de ella, de los componentes derivados de ella o la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento, de una composición nutritiva o de un alimento.

10 En la presente invención, el término “tratamiento” se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
- 15 (iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

En la presente invención, el término “prevención” se refiere a evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular,
20 cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica. El término reducción del riesgo se refiere a reducir al menos uno de los factores causales de la condición patológica.

En la presente invención, los trastornos o alteraciones del comportamiento alimentario
25 incluyen, sin limitar a, la hiperfagia o exceso de ingesta, el trastorno por atracón, la ingesta adictiva de alimentos, el síndrome del comedor selectivo, la bulimia nerviosa, la anorexia nerviosa, la megarexia, etc.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con la cepa de invención, la cepa
30 derivada de la cepa de invención, el componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenidas a partir de la cepa de invención, o la composición de la invención, para su uso como coadyuvante en el tratamiento de condiciones sub-clínicas o clínicas y/o prevención o reducción del riesgo de trastornos o alteraciones del comportamiento alimentario.

35

En la presente invención se entiende por “coadyuvante” a aquel compuesto que ayuda a

mejorar la efectividad o eficiencia de otros medicamentos para el tratamiento de los trastornos o alteraciones del comportamiento alimentario, lo que permitiría reducir su dosis y/o la frecuencia de administración o potenciar su eficacia mediante la administración de una formulación de la cepa de la invención con mecanismos de acción complementarios.

5

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

10

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Efecto de *B. uniformis* CECT 7771 sobre la ingesta (calorías totales, comida sólida y solución de sacarosa) durante el atracón en los días 2 y 18 del experimento, y el peso corporal en un modelo de trastorno del comportamiento alimentario. Suma de la ingesta calórica total (kcal) (A), media de la ingesta de comida sólida (g) (B), media de la ingesta de sacarosa al 10% (g) (diferencia del peso de los biberones antes y después del atracón) (C), evolución del peso corporal (g) (D) en ratas C y ratas IF tratadas o no con *B. uniformis* CECT 7771. Abreviaturas de los grupos experimentales: C, grupo control (n=15), grupo control C-D2 el día 2 (n=15), C-D18, grupo control en día 18 (n=15), IF, ratas que ayunaron 12 h diariamente y recibieron vehículo a través de una sonda (n = 15), IF-D2 e IF-D18, grupo IF el día 2 y 18 respectivamente (n=15), IF + B, ratas que ayunaron 12 h y recibieron una dosis diaria de 1×10^8 UFC *B. uniformis* CECT 7771 por sonda (n=15), IF + B-D2 e IF + B-D18, IF + B ratas el día 2 y 18 respectivamente (n=15) Las ratas se pesaron todas las semanas durante el período de estudio (3 semanas). Las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo C-D2 se indican con un asterisco (*), diferentes de C-D18 se indican con (#), diferentes de IF-D2 se indican con (&), diferentes de IF + B-D2 se indican con (\$), diferentes de IF-D18 se indican con (@). * p < 0.050, *** p < 0.0010, ### p < 0.0010, & p < 0.050, &&& p < 0.0010, \$\$\$ p < 0.0010, @@@ p < 0.0010.

20

25

30

Figura 2. Efecto de *B. uniformis* CECT 7771 sobre la ansiedad en un modelo de trastorno

del comportamiento alimentario. Prueba de luz/oscuro o light/dark test (A, B, C). Número de entradas en el área clara (A), Latencia para moverse al área clara (s) (B), Tiempo de permanencia en el área clara (s) (C). Efecto de *B. uniformis* CECT 7771 sobre la ansiedad después de 18 h de privación de comida en una prueba de ansiedad *versus* hambre (D, E).
 5 Latencia para iniciar el contacto con la comida (D), Latencia y comer (E). Abreviaturas de los grupos experimentales: C, grupo de control (n=15), IF, ratas que ayunaron 12 h diariamente y recibieron vehículo por sonda (n=15), IF + B, ratas que ayunaron 12 h y recibieron una dosis diaria de 1×10^8 UFC *B. uniformis* CECT 7771 por sonda (n=15). Las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo C se indican con un asterisco (*), diferentes del grupo IF se indican con #. * p <0.050, ** p <0.010.
 10

Figura 3. Expresión de los receptores de dopamina D1R y D2R en PFCx e intestino en un modelo de trastorno del comportamiento alimentario. La inmunohistoquímica se realizó usando anticuerpos contra D1R (A,C) o D2R (B,D). El número de células D1 positivas (A, C) y células D2 positivas (B, D) se cuantificaron en el PFCx e intestino delgado. Los valores son la media \pm SEM de tres ratas por grupo. Abreviaturas de los grupos experimentales: C, grupo de control (n = 3), IF, ratas que ayunaron 12 h diariamente y recibieron vehículo por sonda (n = 3), IF + B, ratas que ayunaron 12 h y recibieron una dosis diaria de 1×10^8 UFC *B. uniformis* CECT 7771 por sonda (n = 3). Las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo C se indican con un asterisco (*), diferentes del grupo IF se indican con (#). ** p <0.010, *** p <0.0010, # p <0.050, ### p <0.0010.
 15
 20

Figura 4. Expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en el hipotálamo en un modelo de trastorno del comportamiento alimentario. Efecto de *B. uniformis* CECT 7771 sobre la expresión relativa de NPY (A), CART (B) AgRP (C), y POMC (D) en el hipotálamo en un modelo de atracón y adicción a los alimentos. Abreviaturas de los grupos experimentales: C, grupo de control (n = 15), IF, ratas que ayunaron 12 h diariamente y recibieron vehículo por sonda (n = 15), IF + B, ratas que ayunaron 12 h y recibieron una dosis diaria de 1×10^8 UFC *B. uniformis* CECT 7771 por sonda (n=15). Las diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo C se indican mediante asteriscos (*). * p <0.050, ** p <0.010.
 25
 30

Figura 5. Diferencias en la abundancia de unidades taxonómicas operativas (OTUs, del inglés *operational taxonomic units*) entre los distintos grupos experimentales. Se muestran los resultados del análisis LDA y los valores p del análisis estadístico. Los cuatro paneles superiores muestran OTUs que presentan mayores abundancias en el grupo de control
 35

que en los del trastorno alimentario (IF y IF + B). Los paneles restantes muestran las OTUs que fueron más abundantes en los grupos de animales con trastorno del comportamiento alimentario (IF e IF +B) que en los controles. Las diferencias estadísticamente significativas encontradas en el grupo IF+B en comparación con el grupo IF se destacan con un asterisco rojo. El color del grupo de la leyenda corresponde a los siguientes grupos experimentales: amarillo-controles; azul: modelo de trastorno alimentario al que se administró vehículo; naranja: modelo de trastorno alimentario al que se administró *B. uniformis*. Las abreviaturas utilizadas son las siguientes: C, grupo control con acceso libre a la comida; IF, grupo sometido a ayuno intermitente como modelo de trastorno del comportamiento alimentario y que recibió vehículo; IF + B, grupo sometido a ayuno intermitente como modelo de trastorno del comportamiento alimentario y que recibió una dosis diaria de 10^8 UFC de *B. uniformis*.

15 EJEMPLOS

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

20 **Ejemplo 1. Efectos de *B. uniformis* CECT 7771 sobre la ingesta en un modelo de trastorno del comportamiento alimentario.**

1.1 Diseño experimental del modelo animal y toma de muestras

Se emplearon ratas Wistar Kyoto macho (170-200 g) de los laboratorios Charles Rivers (L'Arbresle Cedex, Francia). Durante 10 días, las ratas se adaptaron a las instalaciones y a un nuevo horario de luz / oscuridad, adelantando el reloj 30 minutos cada día. El nuevo horario consistió en 12 h de luz (de 3,30 h a 15,30 h) y 12 h de oscuridad (de 15:30 h a 3:30 h). Luego, se homogeneizó la microbiota mezclando el lecho (serrín) usado de todas las ratas y se distribuyó nuevamente en las diferentes jaulas. Las ratas permanecieron en estas jaulas con el lecho mezclado al menos durante 3 días. Finalmente, las ratas se alojaron individualmente en una jaula de acero inoxidable en una habitación con temperatura controlada (23 ° C) con una humedad relativa de 40- 50%. Luego, las ratas se dividieron aleatoriamente en tres grupos (n = 14 ratas por grupo) de la siguiente manera: (1) un grupo de control (C) que recibió una dieta normal y agua durante 24 h y se le administró el vehículo o placebo (10% de leche desnatada), (2) grupo sometido a ayuno intermitente para inducir alteración de la conducta alimentaria (IF) que ayunó durante 12 h (y agua ad libitum) y recibió una dieta normal y sacarosa (10%) en el agua potable durante

las 12 h restantes, a este grupo se le administró vehículo (10% de leche desnatada) y (3) grupo sometido a ayuno y tratado *B. uniformis* CECT 7771 (IF +B), que ayunó durante 12 h (con agua *ad libitum*) y recibió una dieta normal y sacarosa (10%) en el agua potable durante las 12 h restantes, a este grupo se le administró una dosis diaria de 1×10^8 unidades formadoras de colonias [UFC]) de la cepa bacteriana.

Los experimentos se realizaron en estricto cumplimiento de las recomendaciones proporcionadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valencia (Servicio Central de Apoyo a la Investigación [SCSIE], Universidad de Valencia, España), y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética (Número de aprobación 2015 / VSC / PEA / 00041).

Transcurridas estas 3 semanas, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical para la obtención de muestras, incluyendo intestino, cerebro y heces.

1.2 Inducción de alteración del comportamiento alimentario.

Para inducir ingesta por atracón y comportamiento adictivo por la comida se empleó el protocolo desarrollado por Avena et al., 2008 (Avena, N.M., et al., *Physiol Behav*, (2008) 94(3): p. 309-15). Todos los días a las 3.30 h, las luces se encendieron durante 12 h (3:30-15.30 h). A las 7.30 h, la bacteria o vehículo se administraron con gelatina y se pesaron los alimentos y la bebida con sacarosa al 10%. Solo el grupo de control tuvo acceso a alimentos y a bebida con un 10% de sacarosa. Posteriormente, a las 15.30 h se apagaron las luces. En ese momento comenzó el "craving" (4h) (15.30-19.30 h). El "craving" es el ansia que se produce frente a la falta de una droga o alimento (como en este caso). Este "craving" se produce porque las ratas están en ayunas durante 8 h en la fase de luz ("fase basal", 7.30-15.30 h) y, luego, en la fase de oscuridad, cuando las luces se apagan 15.30 h, las ratas comienzan su "fase activa" sin acceso a la comida o a la bebida con 10% de sacarosa durante al menos 4 horas más y, como consecuencia, las ratas comienzan a sentir síntomas de abstinencia. En resumen, las ratas IF y IF + P ayunaron durante 12 h (8 h con luz "fase basal" más 4 h en oscuridad "fase activa"). A las 19.30 h todos los grupos tuvieron acceso a la comida y a bebida al 10% de sacarosa durante 12 h. La primera hora de estas 12 h la llamamos "atracón". Durante esta hora cuantificamos cuánto comían y cuánto bebían. Posteriormente, las ratas tuvieron acceso libre a la comida y bebida hasta las 7.30 h.

1.3. Efecto sobre la ingesta.

Se analizaron los efectos de *B. uniformis* en la ingesta compulsiva de comida y solución de sacarosa al 10% comparando el día 2 y el día 18 del experimento. El efecto del protocolo

de ayuno intermitente en el atracón de comida, de solución de sacarosa o ambos se analizó al principio (el día 2) y al final (el día 18) del estudio (Figura 1A), lo que demuestra la validez del modelo. El protocolo de ayuno intermitente causó un aumento en la ingesta de comida, sacarosa y ambos (como se expresa en g o en Kcalorías totales) en ambos grupos experimentales (IF e IF + B) en comparación con los controles desde el comienzo del estudio. Este efecto se incrementó en el tiempo, especialmente en ratas que recibieron vehículo, mientras que en aquellos que recibieron *B. uniformis* CECT 7771 se atenuó. El análisis de la suma de la ingesta calórica total (comida y bebida) (Figura 1A) mostró que ambos grupos experimentales que estaban en ayunas durante 12 h recibiendo el vehículo (IF) o la bacteria (IF + B) consumieron más calorías durante el atracón ($359 \text{ kcal} \pm 1.40$, $p < 0.0010$ y $361 \text{ kcal} \pm 1.50$, $p < 0.0010$, respectivamente) que las ratas control ($176 \text{ kcal} \pm 1.20$) en el segundo día del estudio. Después de 18 días de rutina de ayuno y alimentación intermitentes, las ratas IF consumieron significativamente más calorías ($502 \text{ kcal} \pm 2.40$, $p < 0.0010$) que las ratas control ($118 \text{ kcal} \pm 1.00$) y significativamente más que el segundo día del experimento ($p < 0.0010$) durante el atracón (comparando el mismo grupo día 2 *versus* día 18), lo que indica que el tamaño del efecto aumentó a lo largo del tiempo de estudio. Asimismo, las ratas IF + B mostraron una mayor ingesta calórica ($425 \text{ kcal} \pm 1.70$, $p < 0.0010$) que las ratas control ($118 \text{ kcal} \pm 1.00$) después de 18 días de intervención. Las diferencias dentro del grupo (IF + B) en la ingesta calórica entre el día 2 y el día 18 también fueron significativas ($p < 0.001$) durante el atracón. Sin embargo, la suma de la ingesta calórica total de las ratas IF + B se redujo con respecto a las ratas IF que recibieron el vehículo ($p < 0.001$), lo que sugiere que *B. uniformis* CECT 7771 redujo la ingesta calórica durante el atracón.

Las ratas IF y las ratas IF + B comieron significativamente más comida (Figura 1B) durante el atracón ($4.80 \text{ g} \pm 0.40$, $p < 0.050$ y $4.94 \text{ g} \pm 0.32$, $p < 0.050$, respectivamente) que las ratas control ($2.86 \text{ g} \pm 0.40$) en el segundo día del experimento como resultado del ayuno (Figura 1B). Al final de la intervención, el grupo IF comió significativamente más ($7.03 \text{ g} \pm 0.73$, $p < 0.0010$) que las ratas control ($2.36 \text{ g} \pm 0.28$) y significativamente más que el segundo día del experimento ($p < 0.050$) durante el atracón, lo que indica que la magnitud de la ingesta de comida aumentó a lo largo del tiempo de estudio. Las ratas IF + B mostraron una mayor ingesta de comida ($5.72 \text{ g} \pm 0.41$, $p < 0.001$) en comparación con las ratas control ($2.36 \text{ g} \pm 0.28$) después de 18 días de intervención; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas con respecto al segundo día del experimento en las comparaciones dentro del grupo, lo que sugiere que el aumento de la ingesta de comida inducida por el protocolo de ayuno se mejoró ligeramente por la administración de *B. uniformis* CECT 7771. Ambos grupos, IF e IF + B, bebieron significativamente más solución

de sacarosa (Figura 1C) en el segundo día del experimento ($11.25 \text{ g} \pm 0.77$, $p < 0.0010$ y $12.71 \text{ g} \pm 2.34$, $p < 0.0010$, respectivamente) que las ratas control que solo bebieron agua ($2.73 \text{ g} \pm 0.22$). Después de 18 días, las ratas IF e IF + B bebieron significativamente más que las ratas control ($p < 0.0010$) y un poco más que el segundo día del experimento ($13.75 \text{ g} \pm 1.34$ y $12.27 \text{ g} \pm 1.31$, respectivamente). No se detectaron diferencias significativas en la ingesta de solución de sacarosa entre los grupos IF e IF + B.

No encontramos ningún efecto sobre el peso corporal de las ratas a lo largo de las 3 semanas del experimento (Figura 1D), posiblemente debido a la corta duración del ensayo.

10 **Ejemplo 2. Efectos de *B. uniformis* CECT 7771 sobre la ansiedad en un modelo animal de trastorno del comportamiento alimentario.**

2.1. Prueba de luz/oscuridad (Light/Dark test).

Esta prueba se basa en un conflicto entre la aversión innata a las áreas iluminadas y el comportamiento exploratorio espontáneo en un entorno novedoso. Consiste en una caja con luz-oscuridad hecha de plexiglás ($44 \times 44 \times 40 \text{ cm}$). El compartimento oscuro es un tercio de la caja con paredes negras, en la que dos tercios es el compartimento claro con paredes blancas. La caja se iluminó con 300 lux y una puerta abierta ($10 \times 7,5 \text{ cm}$) comunica los compartimentos claro y oscuro. Durante la fase de oscuridad (fase activa), las ratas se colocaron individualmente en la caja oscura (20 lux) y se les permitió explorar libremente la caja completa (clara y oscura) durante 10 minutos y se registraron con una cámara de video (Sony EXview HADCCDII, Cornellá (Barcelona), España). La latencia para salir del lado oscuro de la caja (cuatro patas en el lado iluminado), las visitas al compartimento de la luz y el tiempo que pasan allí son medidas de ansiedad. Todos estos parámetros se midieron y analizado comparativamente (Panlab, Barcelona, España). Esta prueba se realizó durante la fase oscura (fase activa).

2.2. Prueba de ansiedad *versus* hambre.

Esta prueba mide la ansiedad de la rata *versus* la motivación del hambre en un campo abierto u openfield (OP). Se basa en el conflicto entre neofobia / ansiedad y hambre. Para realizar este ensayo, las ratas ayunaron durante 18 horas (Control, IF y IF + B) con acceso a agua ad libitum. Durante la fase de luz, las ratas se colocaron individualmente en una esquina de un OP blanco ($45 \times 90 \times 60 \text{ cm}$) se colocó gelatina en el centro del OP (la misma que se usó para administrar *B. uniformis*). El OP fue iluminado con 500 lux (luz de laboratorio). Las ratas se observaron y registraron (Sony EXview HADCCDII, Cornellá, Barcelona, España) durante 8 minutos y se analizaron diferentes parámetros, incluyendo la latencia (tiempo) para iniciar el contacto con la comida y la incidencia de la ingesta. Al

final de cada experimento, los animales fueron devueltos a sus jaulas y a la alimentación ad libitum. Todos estos parámetros fueron medidos y analizados comparativamente (Panlab, Barcelona, España). El OP se limpió después de cada animal con etanol al 5%.

5 2.3. Efecto sobre la ansiedad en los dos test de comportamiento.

El comportamiento ansiogénico se evaluó con dos pruebas de comportamiento diferentes: la prueba de luz/oscuridad o light/dark test (Figura 2 A, B, C) y la prueba de ansiedad *versus* hambre (Figura 2 D, E). El light/dark test se realizó durante el ayuno en oscuridad o “craving”, lo que significa que las ratas ayunaron alrededor de 10 h (8 h durante la fase de luz + aproximadamente 2 h durante la fase de oscuridad). Por lo tanto, las alteraciones del comportamiento mostradas por esta prueba podrían deberse al hecho de que bajo la privación de alimentos hay un aumento en la búsqueda de alimentos debido a una mayor necesidad de energía. El análisis de datos indicó que los animales IF mostraron un aumento significativo en el número de entradas al área de luz (Figura 2A) respecto a las ratas control (4.8 ± 0.8 *versus* 1.9 ± 0.6 , $p < 0.05$) y la administración de la bacteria redujo el número de entradas, alcanzando valores similares al grupo de control (2.6 ± 1.3). El grupo IF mostró una reducción leve pero no significativa en el tiempo para moverse desde el área oscura hacia la clara (latencia) respecto a las ratas control (184 ± 43 s *versus* 316 ± 48 s) (Figura 2B). La administración diaria de *B. uniformis* CECT 7771 tendió a aumentar el tiempo de latencia, alcanzando valores similares a los del grupo control (289 ± 73 s). El tiempo en el área de luz (Figura 2C) también tendió a aumentar en las ratas IF con respecto al control (99.4 ± 22.3 *versus* 65.7 ± 24.5 , respectivamente) pero el grupo que recibió *B. uniformis* CECT 7771 tendió a mostrar valores similares al control (60.7 ± 24.7 s).

Para evaluar el comportamiento similar a la ansiedad durante la fase de luz, realizamos la prueba de ansiedad *versus* hambre usando un openfield blanco (Figura 2 D, E). Esta prueba se basa en el conflicto entre neofobia / ansiedad y hambre. Todas las ratas estuvieron en ayunas durante 18 h; por lo tanto, el efecto del ayuno influyó en todos los grupos por igual. Las ratas aumentaron significativamente el tiempo de latencia para iniciar el contacto con la comida con respecto a los controles (218 ± 26 s *versus* 118 ± 30 s, $p < 0.050$) (Figura 2D), lo que sugiere un aumento del comportamiento ansiogénico. La administración de *B. uniformis* CECT 7771 redujo el tiempo de latencia (117 ± 27 s, $p < 0.050$) lo que indica una reducción de la ansiedad. Con respecto a la latencia para iniciar el contacto con la comida y comer (Figura 2E), las ratas IF y las ratas IF + B necesitaron más tiempo para comenzar a comer (237 ± 25 s y 236 ± 28 s, respectivamente) que las ratas control (177 ± 32 s), aunque este aumento no fue significativo.

Ejemplo 3. Efectos de *B. uniformis* CECT 7771 sobre la expresión de neuropéptidos y receptores de dopamina en un modelo de trastorno del comportamiento alimentario.**3.1. Análisis de la expresión de los receptores de dopamina D1 y D2 en intestino y cerebro.**

5 Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico y se realizó una perfusión transcardíaca con solución salina al 0,9%, seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 mol / L (pH 7,4). Los cerebros se extrajeron y se fijaron posteriormente en la misma solución fijadora durante 24 horas a 4° C. Luego, las muestras se colocaron dentro de casetes de histología y se procesaron para la inclusión permanente de parafina en un procesador de
10 tejidos Leica ASP 300 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemania). Se cortaron secciones montadas en parafina de 5 micrómetros de espesor (5 µm) y se montaron en un vidrio deslizante revestido. Las secciones de tejido se procesaron luego con el kit Envision Flex + (DAKO, Santa Clara, CA, EE. UU.) Bloqueando la actividad de la peroxidasa endógena durante 5 minutos y luego se incubaron con el anticuerpo primario. La reacción fue
15 visualizada por Envision Flex+horseradish + peroxidasa durante 20 minutos y, finalmente, diaminobenzidina durante 10 minutos. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Mayer (DAKO S3309; Lista para usar) durante 5 minutos. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: Anticuerpo anti-receptor de dopamina D1 (Abcam, ab40653, 1: 500 durante 40 minutos) y anticuerpo anti-receptor de dopamina D2 - C-
20 terminal (Abcam, ab191041, 1:500 durante 40 minutos). La cuantificación se realizó utilizando Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.) (1.48v). Para el análisis de los receptores de dopamina D1 y D2, se seleccionaron las áreas de interés. Las células positivas para D1 y D2 se contaron manualmente utilizando ImageJ. Para cada rata, se cuantificaron al menos 10 campos (40 ×) y los resultados se expresaron como
25 porcentaje de ratas de control.

3.2. Expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en el hipotálamo

Para medir la expresión de los neuropeptidos se aisló el ARN del tejido, el hipotálamo (área cerebral) y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa o PCR
30 cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR). Para ello el hipotálamo se extrajo y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. El ARN se extrajo del tejido usando el reactivo TRIsure (Bioline, Londres, Reino Unido) y un proceso de homogeneización usando un procesador ultrasónico UP400S (Hielscher, Teltow, Alemania). La calidad del ARN se evaluó midiendo la relación de absorbancia (A) A260 / A280 en un espectrofotómetro
35 NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU.). El ARN (2 µg) se sometió a transcripción inversa (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.). Se usó una cantidad de

20 ng del ADN complementario resultante (ADNc) como plantilla para amplificaciones por PCR en tiempo real. Los niveles de ARN mensajero (ARNm) para genes específicos se determinaron en un instrumento LightCycler 480 (Roche, Branchburg, EE. UU.). Para cada reacción de PCR, se añadió una plantilla de ADNc a LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Branchburg, EE. UU.) que contenía los pares de cebadores para el gen correspondiente. Se usó B2-microglobulina ($\beta 2M$) como gen de mantenimiento. La secuencia y la información para los cebadores se muestran en la Tabla complementaria 1. Todas las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado y se usaron números de ciclo umbral promedio (Ct) de los triplicados para calcular la expresión relativa de ARNm de genes candidatos. La magnitud del cambio de expresión de ARNm para los genes candidatos se calculó utilizando el método estándar de $2^{-h\Delta\Delta Ct}$. Todos los datos se normalizaron al contenido del gen de mantenimiento y se expresaron como porcentaje de control.

15 Tabla complementaria 1. F: Cebador directo (forward primer), R: Cebador inverso (reverse primer).

Gen	Abreviación	Secuencia Cebador 5' - 3'
Neuropeptido Y	NPY	F:GTGGACTGACCCTCGCTCTATC (SEQ ID NO: 1) R:ATGAGATTGATGTAGTGTCGCAGA (SEQ ID NO: 2)
Proteína r-Agouti	AgRP	F:CAGAGGTGCTAGATCCACAG (SEQ ID NO: 3) R:AGGTATTGAAGAAGCGGCAG (SEQ ID NO: 4)
Pro-opiomelanocortina	POMC	F:GAGGTTAAGGAGCAGTGACTAAGAG (SEQ ID NO: 5) R:GTAGCAGAATCTCGGCATCTTCC (SEQ ID NO: 6)
Transcripción regulada de cocaína y anfetamina	CART	F:GCTCAAGAGTAAACGCATTCC (SEQ ID NO: 7) R:AAGAATTGCAAGAAGTTCCTCG (SEQ ID NO: 8)

3.3. Efectos sobre la expresión de neuropéptidos y receptores de dopamina

20 *B. uniformis* CECT 7771 aumenta la expresión de las células positivas D1 en PFCx pero no D2. Analizamos los posibles efectos de *B. uniformis* CECT 7771 sobre los receptores

de dopamina D1R en la corteza prefrontal en cerebro (PFCx) (Figura 3A) y D2R en el intestino delgado (Figura 3B). Las células que expresan los receptores D1R y D2R se analizaron por inmunohistoquímica. Las ratas IF tienden a mostrar una disminución en el número de células que expresan D1R en comparación con el control (263 ± 12 versus 343 ± 25) en el PFCx, aunque las diferencias no fueron significativas. *B. uniformis* CECT 7771 normalizó la expresión de D1R en PFCx (398 ± 37 , $p < 0.050$). Las ratas IF mostraron una disminución significativa en las células D2 positivas con respecto a las ratas control (185 ± 13 versus 390 ± 29 , $p < 0.0010$). La administración de *B. uniformis* CECT 7771 no restableció esta alteración (237 ± 16 , $p < 0.010$). Estos resultados sugieren que *B. uniformis* CECT 7771 disminuye las células D1 y D2 positivas en el intestino delgado.

El análisis de los receptores DA en la mucosa del intestino delgado mostró que las ratas IF presentaban un mayor número de células que expresaban D1R en comparación con los controles (376 ± 29 versus 219 ± 12 , $p < 0.0010$) como se muestra en la Figura 3C. La administración diaria de *B. uniformis* CECT 7771 restauró parcialmente esta alteración reduciendo la expresión de este receptor (304 ± 23 , $p < 0.010$). El análisis por inmunohistoquímica de células D2 positivas (Figura 3D) también mostró un aumento significativo de la expresión de D2R en ratas IF respecto al control (497 ± 41 versus 232 ± 21 , $p < 0.0010$). *B. uniformis* CECT 7771 restauró por completo esta alteración (241 ± 31 , $p < 0.0010$) en el modelo de alimentación adictiva. Estos resultados indican que *B. uniformis* CECT 7771 podría modular el sistema dopaminérgico en el sistema nervioso entérico.

Para dilucidar si el efecto de *B. uniformis* CECT 7771 en el atracón y el comportamiento estuvo mediado por cambios en las señales de apetito / saciedad, estudiamos la expresión de ARNm de neuropéptidos en el hipotálamo (Figura 4 A, B, C, D). Los niveles de expresión del NPY orexigénico (Figura 4A) aumentaron significativamente en ratas IF con respecto a los controles (1.55 ± 0.14 versus 1.00 ± 0.11 , $p < 0.050$). De manera similar, los niveles de expresión del AgRP anorexigénico (Figura 5C) se elevaron en el hipotálamo de las ratas IF en comparación con los controles (1.84 ± 0.20 versus 1.00 ± 0.14 , $p < 0.010$). La administración de *B. uniformis* CECT 7771 no redujo estas alteraciones (1.58 ± 0.16 , $p < 0.050$ para NPY y 1.97 ± 0.23 , $p < 0.010$ para AgRP). El análisis de la expresión de ARNm de los neuropéptidos anorexigénicos CART (Figura 4B) y POMC (Figura 4D) no reveló diferencias entre IF y ratas de control ($p < 0.050$); ninguna administración de la bacteria tuvo ningún efecto (Figura 4 B, D). Estos resultados sugieren que el aumento de los atracones observados en el modelo animal de adicción a la comida podría explicarse, al menos en parte, por la mejora de los neuropéptidos hipotalámicos NPY y AgRP. Sin embargo, estos neuropéptidos no están involucrados en el mecanismo por el cual *B. uniformis* CECT 7771 redujo la ingesta calórica durante el atracón.

Ejemplo 4. Influencia de *B. uniformis* CECT 7771 en la composición de la microbiota en un modelo de trastorno del comportamiento alimentario.

5 4.1. Análisis de la microbiota por secuenciación del gen del 16S rRNA

El aislamiento de ADN a partir de contenido intestinal se realizó utilizando el kit MoBio PowerSoil™ siguiendo las instrucciones del fabricante. Previamente se favoreció la lisis celular mediante incubación con lisozima y mutanolisina a 37°C durante 1 h y, posteriormente, mediante disrupción celular mecánica en un Mini-Bead Beater (BioSpec Products, Bartlesville, EE.UU.) con dos ciclos de agitación durante 1 minuto. El ADN genómico fue cuantificado por medida de la absorbancia al UV (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, USA). Las regiones hipervariables V3-V4 del gen del ARNr 16S, se amplificaron por triplicado mediante PCR utilizando 20 ng de ADN (1 µL) y 25 ciclos de PCR a 95°C durante 20 s, 40°C durante 30 s y 72°C durante 20 s. Las muestras se marcaron con códigos de barras para permitir la multiplexación durante el proceso de secuenciación. Durante la PCR se utilizaron la Taq Polimerasa de alta fidelidad Phusion (Thermo Scientific) y los cebadores con código de barras S-D-Bact-0341-b-S-17 (CCTACGGNGGCWGCAG) (SEQ ID NO: 9) y S-D-Bact-0785-a-A-21 (GACTACHVGGTATCTAATCC) (SEQ ID NO: 10). Los productos de la PCR (~500 pb) se purificaron con el Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido) y se cuantificaron mediante el método Qubit 3.0 y el Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras se multiplexaron en una sola secuenciación mediante la combinación de cantidades equimolares de ADN amplificado (~50 ng por muestra) y se secuenciaron en un carril de la plataforma MiSeq de Illumina con una configuración de 2x300 PE (CNAG, Barcelona, España).

4.2. Análisis bioinformático y estadístico

Las secuencias se filtraron en función de su calidad utilizando el software Flash y se separaron en función de sus códigos de barras con la herramienta MOTRUR v1.39.5. Tras la eliminación de los códigos de barras/cebadores, se eliminaron las quimeras con el algoritmo UCHIME y la base de datos de referencia de secuencias de 16S SILVA. Las Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) o potenciales especies se identificaron con el algoritmo UCLUST implementado en USEARCH v8.0.1623. Las OTUs fueron alineadas usando PyNAST y FastTree para estimar la diversidad basada en la distancia filogenética. El análisis de la diversidad alfa y beta se realizó utilizando QIIME v1.9.1. Para los análisis estadísticos se aplicaron métodos no paramétricos, como las pruebas de

Kruskal-Wallis y Wilcoxon, aplicando la corrección de Benjamini-Hochberg en el caso de comparaciones múltiples. Se realizó un análisis lineal discriminante (LDA) para comparar la abundancia de las unidades taxonómicas (OTUs) entre los diferentes grupos experimentales y se establecieron diferencias significativas cuando las OTUs mostraron un valor LDA ≥ 3.0 . Se realizó el análisis PERMANOVA para evaluar los cambios en la estructura de la microbiota utilizando los datos de distancias de Bray-Curtis. El Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) permitió para visualizar los cambios en la composición de la microbiota entre los grupos. Los análisis se realizaron en R v3.6.

10 4.3. Efectos en la composición de la microbiota intestinal

Los principales efectos del protocolo de ayuno (IF) y la administración de *B. uniformis* (IF + B) se observaron en la prevalencia y abundancia de diversas OTUs (Figura 5).

La administración de *B. uniformis* permitió incrementar la abundancia de *Muribaculum* spp. significativamente reducida en el grupo IF comparado con el control (LDA score = 4.44, p = 0.013). Estas especies son componentes autóctonos de la microbiota de ratones. Además, la administración de *B. uniformis* aumento la abundancia y prevalencia de las siguientes especies: *Akkermanisa muciniphila* (LDA = 3,89, p = 0,044), *Christensenella minuta* (LDA = 3,11, p < 0,001) y *Faecalimonas umblicata* (LDA = 3,65, p = 0,003). La especie *B. uniformis* también fue más abundante en el grupo IF + B que en el IF y en el control.

En resumen, los resultados demuestran que *B. uniformis* es capaz de restablecer parcialmente algunas de las alteraciones de la microbiota inducidas por el protocolo de ayuno y aumentar algunas especies con efectos potencialmente positivos frente a la obesidad y la ingesta de alimentos (por ejemplo, *Akkermanisa muciniphila* y *Christensenella minuta*).

REIVINDICACIONES

1. Una cepa del género *Bacteroides*, o una cepa derivada de ella, para su uso en la prevención, reducción del riesgo y/o tratamiento de condiciones sub-clínicas o clínicas de trastornos del comportamiento alimentario.
5
2. Cepa del género *Bacteroides* para su uso, donde la cepa es *B. uniformis* CECT 7771.
- 10 3. Cepa según la reivindicación 1 o 2, donde los trastornos del comportamiento alimentario se seleccionan de la lista que comprende: el exceso de ingesta, hiperfagia, el trastorno por atracón, la ingesta adictiva o selectiva de alimentos, la bulimia nerviosa, la anorexia nerviosa, la ansiedad asociada a alteraciones de la conducta alimentaria y la megarexia.
15
4. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha cepa está en la forma de células viables o en la forma de células no viables.
- 20 5. Composición que comprende una cepa del género *Bacteroides*, o cepa derivada de ella, para su uso en la prevención, reducción del riesgo y/o el tratamiento de condiciones sub-clínicas o clínicas de trastornos del comportamiento alimentario.
- 25 6. Composición para su uso según reivindicación 5 donde la cepa es *B. uniformis* CECT 7771.
- 30 7. Composición para su uso según reivindicación 5 o 6, donde los trastornos o alteraciones del comportamiento alimentario se seleccionan de la lista que comprende: ingesta excesiva, hiperfagia, el trastorno por atracón, la ingesta adictiva o selectiva de alimentos, el síndrome del comedor selectivo, la bulimia nerviosa, la anorexia nerviosa, la ansiedad asociada a alteraciones de la conducta alimentaria y la megarexia.
8. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la cepa está en la forma de células viables o en la forma de células no viables.
- 35 9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 que adicionalmente comprende al menos un componente bioactivo.

10. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9 que adicionalmente comprende al menos un microorganismo distinto a cepa CECT 7771 o cepa derivada o mutante de ella.
- 5 11. Composición para su uso según reivindicación 10 donde el microorganismo distinto es otra cepa del género *Bacteroides*, una bacteria láctica o una cepa de levadura.
12. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 donde la composición es una composición farmacéutica o nutritiva.
- 10 13. Composición para su uso según reivindicación 12 donde la composición es farmacéutica y comprende al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 14. Composición para su uso según reivindicación 13 donde dicha composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.
- 20 15. Composición para su uso según reivindicación 12 donde la composición es nutritiva y está seleccionada de la lista que comprende un alimento, un suplemento, un nutracéutico, un probiótico y un simbiótico.
- 25 16. Composición para su uso según reivindicación 15 donde la composición es un alimento seleccionado de la lista que comprende: producto lácteo, un producto vegetal, un producto cárnico, un aperitivo, chocolate, bebida o alimento infantil.
- 30 17. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16 donde la composición tiene una concentración de la cepa de entre 10^4 y 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.

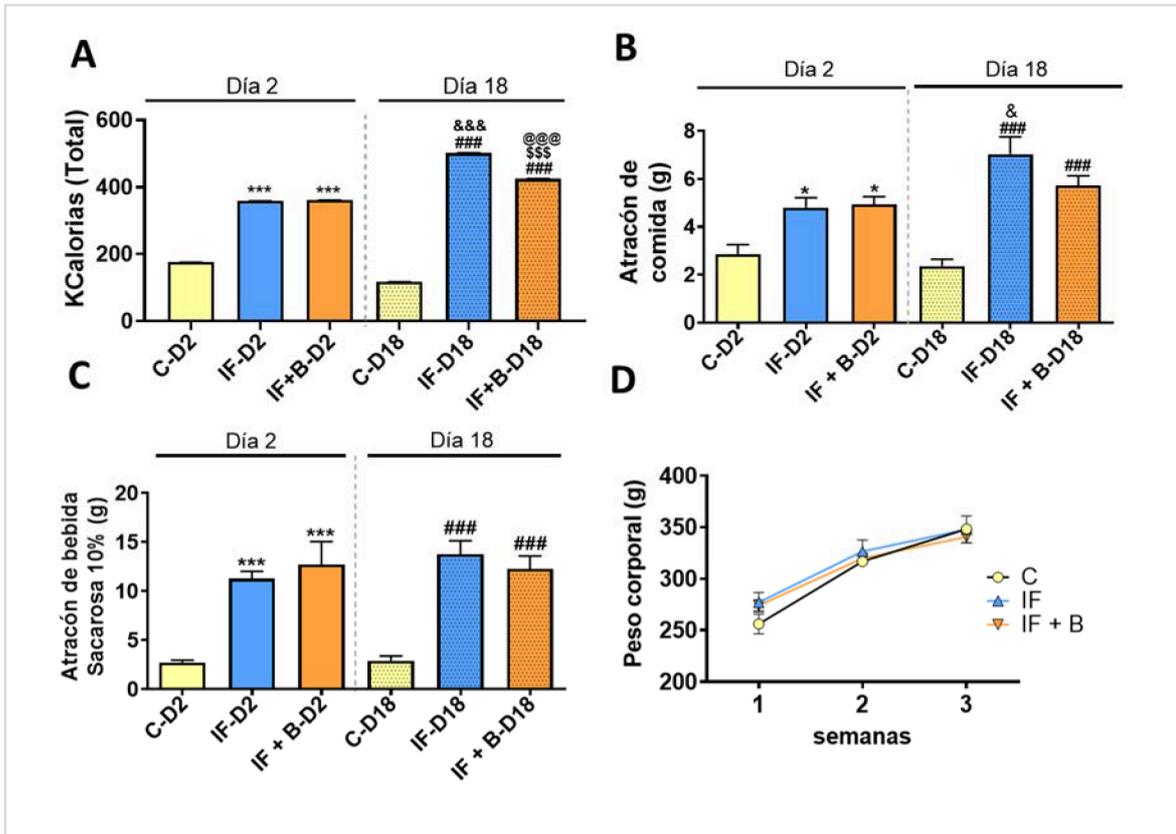


Fig. 1

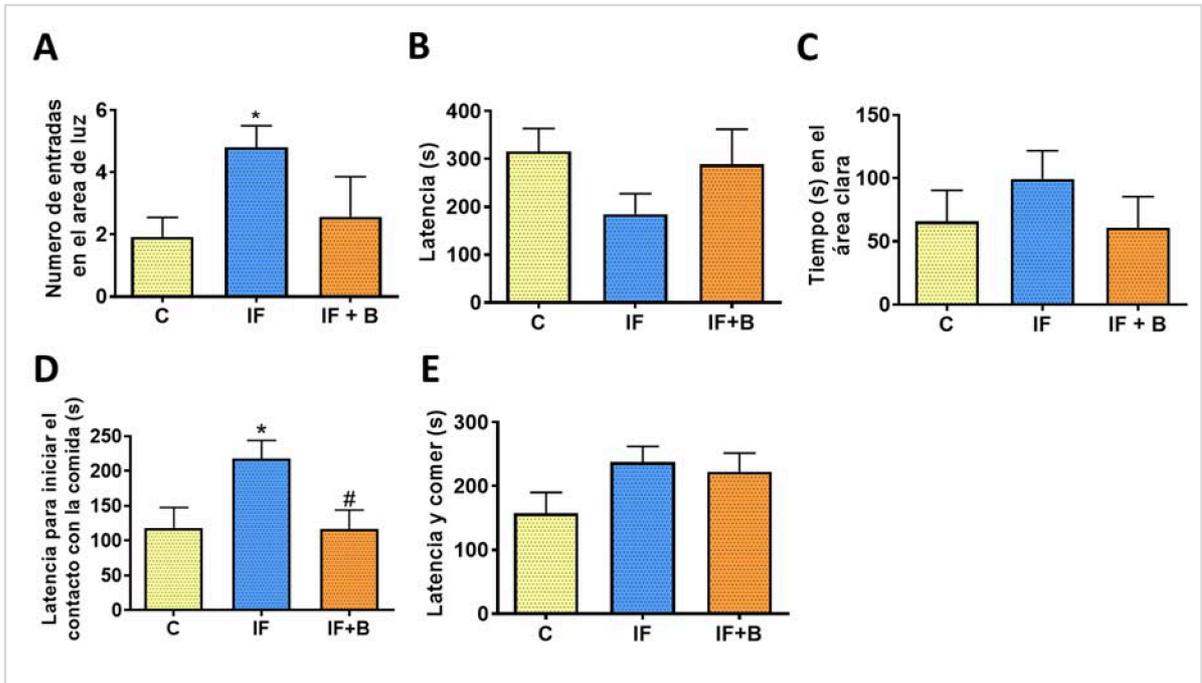


Fig. 2

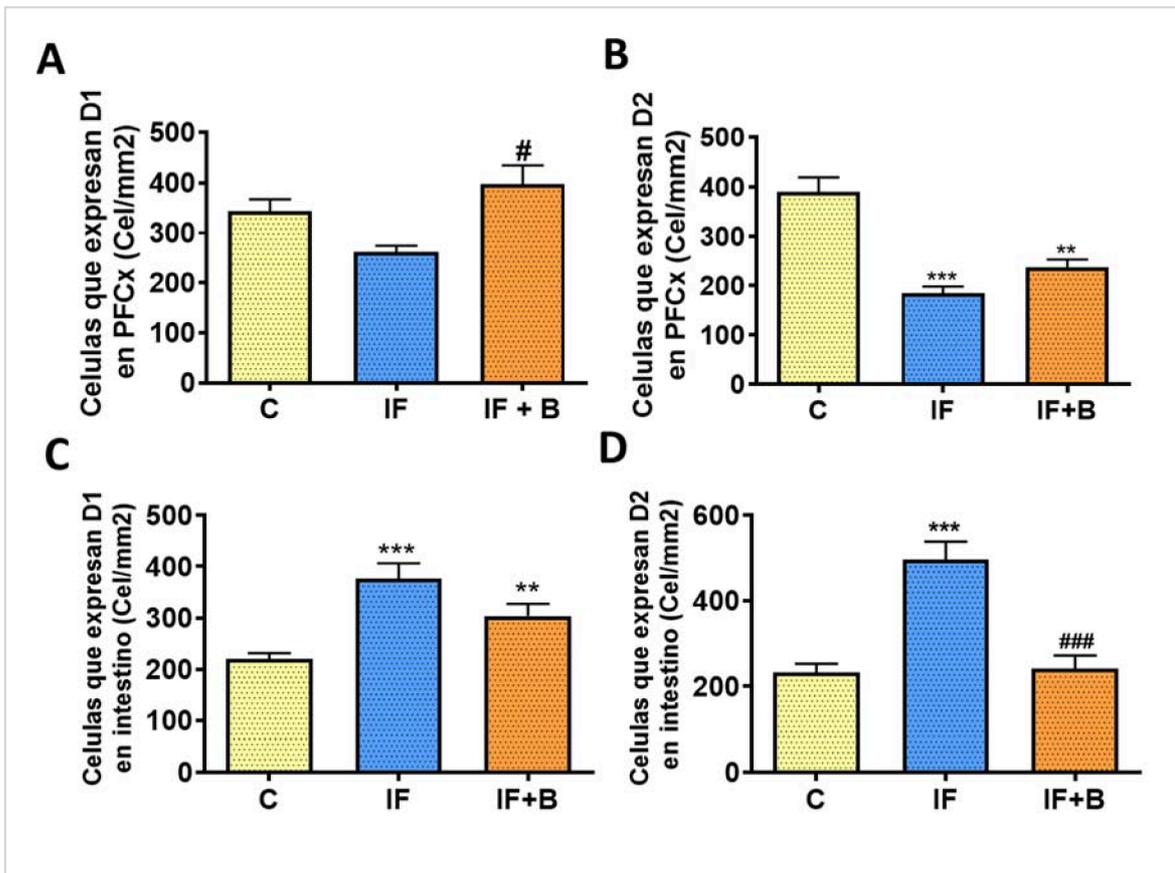


Fig. 3

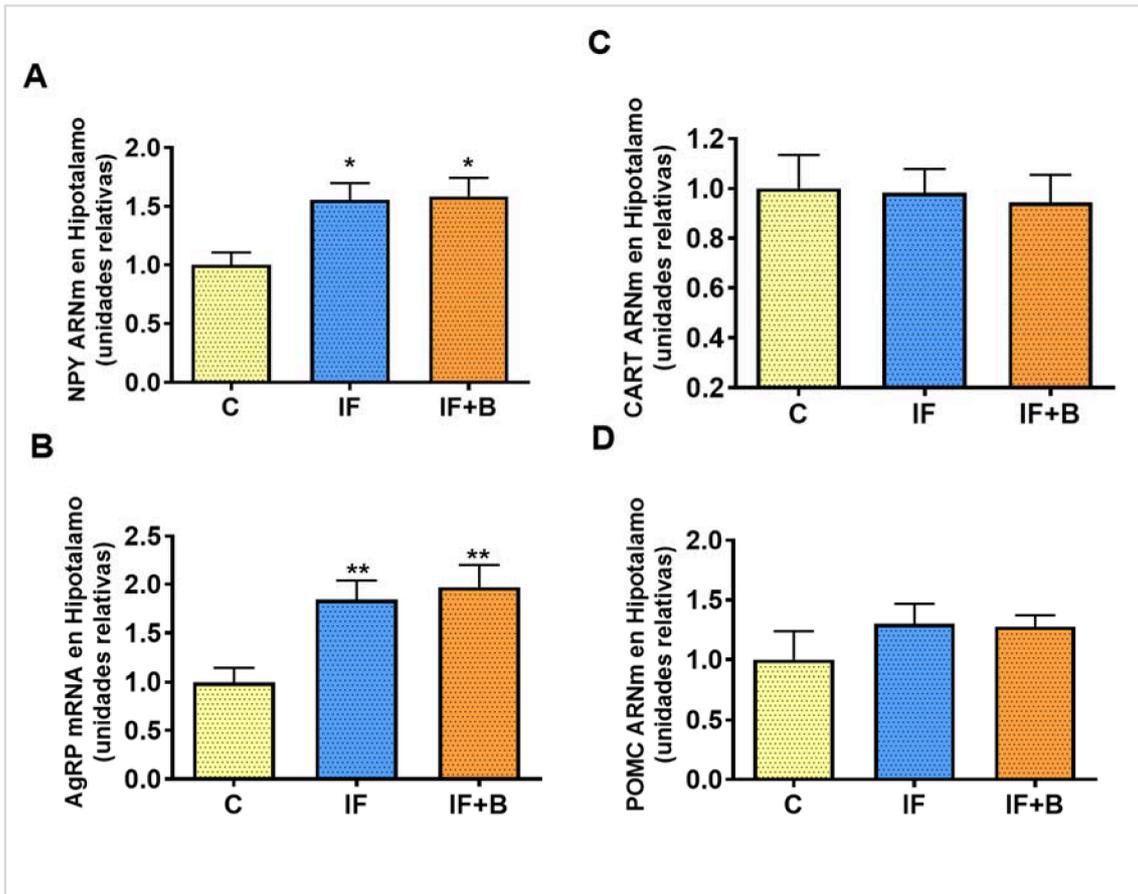


Fig. 4

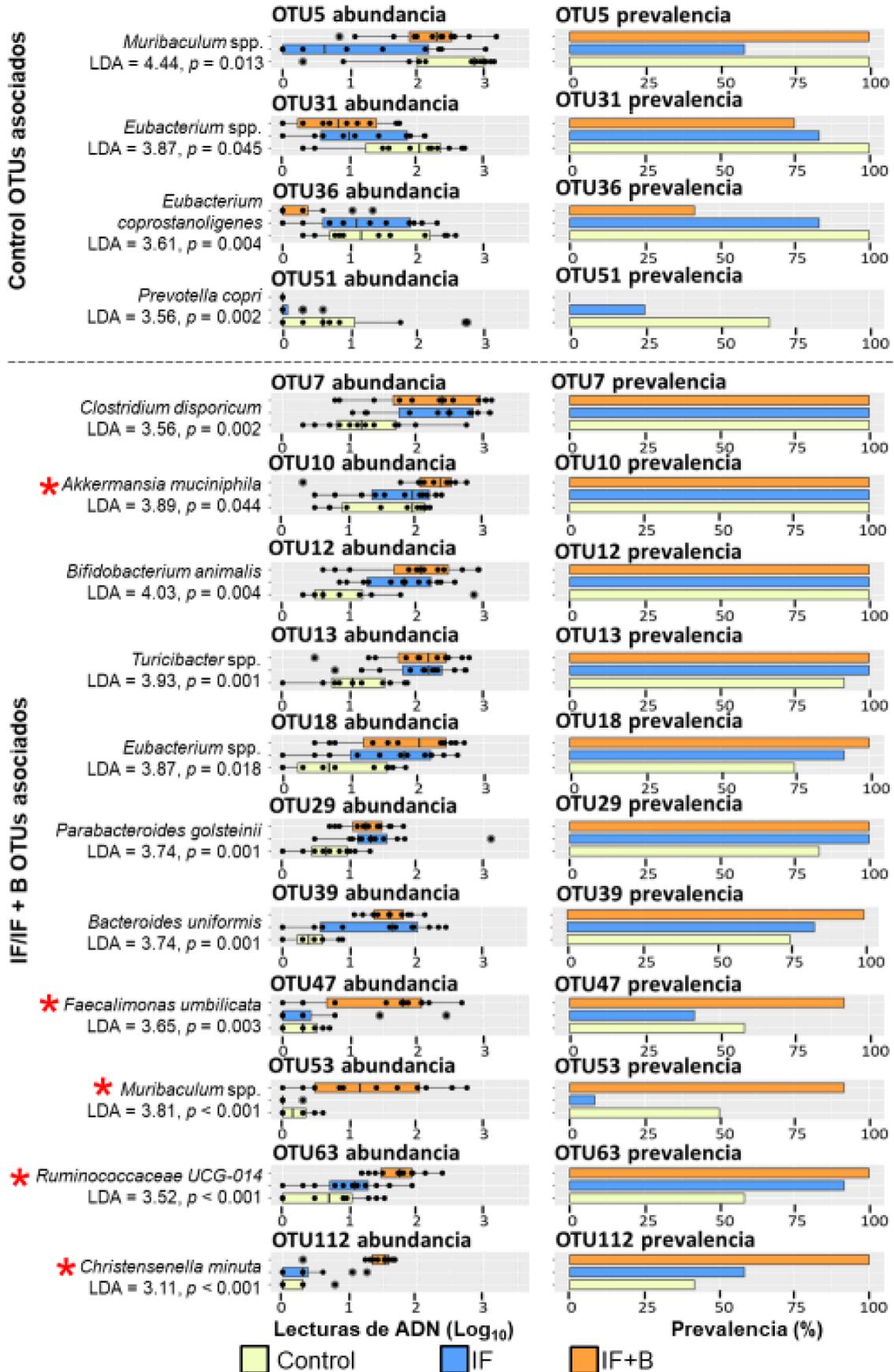


Fig. 5



- ②1 N.º solicitud: 202030586
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 17.06.2020
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **A61K35/741** (2015.01)
A23L33/135 (2016.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HATA TOMOKAZU et al. The Gut Microbiome Derived From Anorexia Nervosa Patients Impairs Weight Gain and Behavioral Performance in Female Mice. <i>Endocrinology</i> , 2019, vol. 160 (10), páginas 2441-2452, ISSN 0013-7227(print) ISSN 1945-7170(electronic), DOI:10.1210/en.2019-00408	1, 3-5, 7-17
X	ES 2436251 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 27/12/2013 Reivindicaciones 1-17.	2, 12, 15-17
A	US 2004028689 A1 (BORODY THOMAS JULIUS) 12/02/2004 Reivindicaciones 4-28, 77, párrafos 1, 28, 61, 121; ejemplo 1.	1-17
A	WO 2009055362 A1 (MOORE BRENDA E) 30/04/2009 Reivindicaciones.	1-17
A	ZAPLATIC E GARCIA-GONZALEZ N et al. P.108 Cannabinoid receptor 1 epigenetic regulation and effect of probiotic treatment in anorexia nervosa. <i>European Neuropsychopharmacology - Abstracts of the ECNP Workshop for Junior Scientists in Europe, 5-8 March 2020, Nice, France</i> vol. 31, páginas S7, ISSN 0924-977X (print) ISSN 1873-7862 (electronic), DOI:10.1016/j.euroneuro.2019.12.009	1-17
A	RUUSUNEN ANU et al. The gut microbiome in anorexia nervosa: relevance for nutritional rehabilitation. <i>Psychopharmacology</i> , 2019, vol. 236, páginas 1545-1558, ISSN 1432-2072 (Electronic), DOI:10.1007/s00213-018-5159-2 pubmed:30612189	1-17
A	NOVA ESTHER et al. Effects of a nutritional intervention with yogurt on lymphocyte subsets and cytokine production capacity in anorexia nervosa patients. <i>European Journal of Nutrition</i> , 2006, vol. 45, páginas 225 - 233, ISSN 1436-6207 (Print), DOI: pubmed:16525751	1-17
A	TAN HUIZI et al. Investigations of <i>Bacteroides</i> spp. towards next-generation probiotics. <i>Food Research International</i> , 2019, vol. 116, páginas 637-644, ISSN 0963-9969, DOI:10.1016/j.foodres.2018.08.088	1-17

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 13.01.2021	Examinador A. I. Polo Diez	Página 1/2
---	--------------------------------------	----------------------

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

A61K, A23L

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, INTERNET, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL