



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 746**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)	A23K 1/00 (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01)	A61P 1/04 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)	A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 37/04 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)	C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05851002 .5**

96 Fecha de presentación : **28.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1835021**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.09.2007**

54

Título: **Nueva cepa que confiere propiedades terapéuticas a las composiciones de células huésped y bacterianas.**

30

Prioridad: **28.12.2004 JP 2004-379693**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

73

Titular/es: **MEIJI SEIKA KAISHA Ltd.**
4-16, Kyobashi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8002, JP

72

Inventor/es: **Miwa, Takehiro;**
Watanabe, Hiroshi;
Ishihara, Mamoru;
Hino, Tsuneo y
Asanuma, Narito

74

Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 358 746 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Campo Técnico

La presente invención se refiere a una nueva composición de células bacterianas que contiene células de *Butyrivibrio fibrisolvens* (de aquí en adelante referido también como *B. fibrisolvens*) que tienen una elevada capacidad productora de ácido butírico y que es útil para inhibir la carcinogénesis, para mejorar la inmunidad, para prevenir y tratar infecciones por patógenos, para prevenir y tratar la enfermedad inflamatoria intestinal y para prevenir y tratar enfermedades alérgicas.

Antecedentes de la Invención

En los años recientes, se ha informado de preparaciones de probióticos que utilizan *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, etcétera, que tienen una elevada capacidad productora de ácido láctico (Referencia de Patente 1) y muchas de ellas están en el mercado. La función básica de las preparaciones es regular las funciones del intestino. Cuando un huésped ingiere las preparaciones, el pH del tracto intestinal disminuye debido al ácido láctico producido por la cepa productora de ácido láctico incluida en las preparaciones. Por consiguiente, se considera que se reduce el número de bacterias no favorables que no pueden crecer en un entorno con dicho pH bajo y, como resultado de ello, se produce la regulación de las funciones intestinales. La idea general de que los probióticos que proporcionan a los huéspedes efectos tales como una mejora de la salud y resistencia a las enfermedades por tal función microbiana, está ampliamente aceptada en la sociedad y los efectos han sido también reconocidos. Los probióticos de acuerdo con la presente invención implican a un microorganismo viable que muestra actividades útiles sobre la salud de animales y seres humanos.

Más recientemente, se ha informado no sólo del ácido láctico producido por las bacterias productoras de ácido láctico, sino también del hecho de que las bacterias productoras de ácido láctico tienen actividad inmunoestimulante en el huésped debida al péptidoglicano y a las proteínas similares que están contenidas en las propias células microbianas suministradas y a la bacteriocina que muestra un estrecho rango de actividad antibacteriana para ciertas bacterias específicas (Referencia No Patente 1).

Adicionalmente, los ácidos grasos de cadena corta producidos por la fermentación entérica en humanos y animales han llamado la atención. Con respecto a los ácidos grasos de cadena corta, se ha mostrado su función reductora del pH del tracto intestinal, efectos que aceleran el movimiento del intestino (Referencia No Patente 2) y que aceleran la absorción de Na y similares. Entre los ácidos grasos de cadena corta, destaca particularmente el ácido butírico. Entre sus funciones, se ha demostrado que es importante como fuente de energía de las células epiteliales del colon (Referencia No Patente 3) y que proporciona efectos muy útiles a los huéspedes, tales como su actividad anticancerosa (Referencia No Patente 4) y su efecto para acelerar la diferenciación de las células de la mucosa intestinal.

Sin embargo, existe un problema en vista de su olor característico y de su seguridad cuando el ácido butírico es administrado directamente y oralmente. Así, parece ser eficaz producir el mismo en el intestino en pequeña cantidad y llevar a cabo su absorción continua en el huésped, más que su administración oral directa, con el fin de permitir que tal importante sustancia fisiológicamente activa actúe más eficazmente en el huésped.

Como aceleradores de la concentración de ácido butírico entérico que utilizan un microorganismo, se han descrito aquellos que utilizan células de *Lactobacillus acidophilus* y/o *Bifidobacterium longum* como ingrediente activo (Referencia de Patente 2). Sin embargo, en el documento no existe una descripción de su efecto en lo que se refiere a enfermedades reales y no está claro el grado de resistencia a la enfermedad debido a la administración de las células.

Además, se ha descrito también un método que utiliza *Clostridium butyricum* (referido también de aquí en adelante como *C. butyricum*) como microorganismo con capacidad para producir ácido butírico (Referencia No Patente 5). De acuerdo con tal referencia ya conocida, el *Clostridium butyricum* que está ya en el mercado como bacteria productora de ácido butírico, produce la regulación de las funciones del intestino. Sin embargo, en lo que se refiere a su efecto para inhibir células de lesiones precancerosas, existe el problema de que el efecto producido por el microorganismo solo es bajo, ya que es necesario administrar el mismo junto con un sustrato especial para obtener un efecto suficiente (Referencia No Patente 6). Además, como resultado de la investigación del efecto preventivo sobre la enfermedad inflamatoria intestinal llevada a cabo de la misma manera, existe el problema de que el efecto producido por el microorganismo solo es bajo.

WO 02 080947 A1 describe composiciones que contienen una bacteria capaz de convertir el ácido láctico en ácido butírico y un método para prevenir/tratar la acidemia hiperláctica del tracto digestivo y el cáncer de colon mediante la utilización de las mismas. Aunque se menciona entre otras *Butyrivibrio fibrisolvens* como cepa capaz de convertir el ácido láctico en ácido butírico, cepas de *Megasphaera* y *Mitsuokella* son utilizadas preferiblemente en la composición y el método de WO 02 080947 A1.

Adicionalmente, estas referencias no describen claramente un método ilustrativo que utilice *Butyrivibrio fibrisolvens* como probiótico y en las mismas no se revelan tampoco sus efectos.

Sobre la base de lo anterior, se ha dirigido un gran interés hacia una cepa bacteriana que tiene una elevada actividad de resistencia a enfermedades, debido a que tiene además las funciones de producir una elevada mejora de la salud, es anticancerosa e inmunoestimulante para el huésped y tiene también la capacidad de producir ácido butírico.

5 Referencia de Patente 1: JP-A-2002-306125

Referencia de Patente 2: JP-A-10-84909

Referencia No Patente 1: Kawai, Y. y col., Curr. Protein Pept. Sci., 2004, 5(5), 393-8, "The circular bacteriocins gassericin A and circulacin A"

10 Referencia No Patente 2: Cherbut, C. y col., American Journal of Physiology, 1998, 275, G1415-G1422, "Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat"

Referencia No Patente 3: Cummings, J.H., Gut, 1981, 22 763-779, "Short-chain fatty acids in the human colon"

Referencia No Patente 4: Hague, A. y col., Gastroenterology, 1997, 112, 1036-1040, "Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate"

15 Referencia No Patente 5: Kanauchi, O. y col., Curr. Pharm. Des., 2003, 9(4), 333-346, "Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease"

Referencia No Patente 6: Nakanishi, S., y col., Microbiol. Immunol., 2003, 47(12), 951-958, "Effects of high amylose maize starch and Clostridium butyricum on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon".

Descripción de la Invención

20 Problemas Resueltos por la Invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar células bacterianas de *Butyrivibrio fibrisolvens* recién aisladas que tienen efecto inhibitor sobre la carcinogénesis, efecto inmunoestimulante, efecto preventivo y de tratamiento de infecciones por patógenos, efecto preventivo y de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y efecto preventivo y de tratamiento de enfermedades alérgicas.

25 Medios para Resolver los Problemas

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo intensos estudios para buscar una preparación probiótica que tenga además la función de mejorar la salud, funciones anticancerosas e inmunoestimulantes para humanos y animales y que tenga también la capacidad de producir ácido butírico en el intestino, que sea segura y que pueda ser proporcionada de manera económica. Encontraron que la cepa MDT-1 de *Butyrivibrio fibrisolvens* tenía tales funciones y llevaron a cabo la presente invención.

30

Esto es, la presente invención está mostrada en lo siguiente:

(1) Una cepa de *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 depositada como FERM BP-10463 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. La cepa de *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 tiene una elevada capacidad para producir ácido butírico.

35

(2) Una composición de células bacterianas que contiene células bacterianas de la cepa MDT-1 de *Butyrivibrio fibrisolvens* de acuerdo con (1).

(3) Una preparación farmacéutica que contiene la composición de células bacterianas de acuerdo con (2) como ingrediente activo.

40

(4) Un aditivo alimentario que contiene la composición de células bacterianas de acuerdo con (2) como ingrediente activo.

(5) Una preparación farmacéutica de acuerdo con (3) para inhibir el desarrollo del cáncer.

(6) Una preparación farmacéutica de acuerdo con (3) para la inmunoestimulación.

(7) Una preparación farmacéutica de acuerdo con (3) para la prevención y/o el tratamiento de la infección por un patógeno.

45

(8) Una preparación farmacéutica de acuerdo con (3) para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal.

(9) Una preparación farmacéutica de acuerdo con (3) para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad

alérgica.

Efecto de la Invención

5 La composición de células bacterianas de la presente invención tiene actividad anticancerosa, efecto inmunoestimulante, efecto preventivo y de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, efecto preventivo y de tratamiento de la infección por un patógeno y efecto preventivo y de tratamiento de enfermedades alérgicas, etcétera.

Breve Descripción de las Figuras

10 La Fig. 1 es una figura que muestra la pauta de administración de la composición de células bacterianas y dimetilhidrazina.

La Fig. 2 es una figura que muestra el DAI en ratones administrados con DSS y *Butyrivibrio fibrisolvens*.

La Fig. 3 es una figura que muestra el efecto de la administración de la composición de células bacterianas sobre la formación de fibrosarcoma inducido por 3-MC.

15 La Fig. 4 es una figura que muestra la influencia de la administración de 3-MC y de la composición de células bacterianas sobre la ganancia de peso.

Modo Mejor de Llevar a Cabo la Invención

Lo que sigue a continuación describe con detalle la presente invención.

20 El "tipo I" de *Butyrivibrio fibrisolvens* de acuerdo con la especificación es una clase de la clasificación de la bacteria basada en la diferencia de la capacidad de fermentación (Shane, B.S. y col., J. Gen. Microbiol., 1969, 55, 445-457, "Cellulolytic bacteria occurring in the rumen of sheep contained to low-protein teff hay"). El tipo I forma una gran cantidad de ácido butírico, ya que su ruta de fermentación está inclinada hacia la producción de ácido butírico, y la tasa de ácido láctico formado por la fermentación bacteriana es pequeña en comparación con el tipo IIb.

25 Según se muestra en la tabla, la cepa MDT-1 de la presente invención tiene la resistencia más elevada a la disminución del pH extracelular entre las cepas de tipo I que producen una gran cantidad de ácido butírico. Por tanto, se espera que la misma crezca de manera ventajosa incluso en el tracto intestinal ácido.

Tabla 1. pH de crecimiento mínimo de *B. fibrisolvens*

Cepa	Tipo	pH de crecimiento mínimo
TH-1	IIb	5,2
MDT-1	I	5,3
51255	IIb	5,5
A38	I	5,8
OB156	IIb	6,0

30 El término "inhibición de la carcinogénesis", según se utiliza en la presente, indica, por ejemplo, la prevención de la formación de focos de criptas aberrantes que son lesiones precancerosas de la membrana mucosa del tracto del intestino grueso. Concretamente, en el caso de un estado normal en el cual no hay en absoluto posibilidad de carcinogénesis o en el caso en el que exista una posibilidad de carcinogénesis, la carcinogénesis puede ser prevenida completamente o su riesgo puede ser reducido mediante la administración con antelación a un ser humano o a un animal de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas. También de la misma manera, cuando exista la posibilidad de que la carcinogénesis haya ocurrido ya, el desarrollo del cáncer puede ser prevenido o reducido por la administración inmediata a un ser humano o a un animal de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas.

40 El término "inmunoestimulación", según se utiliza en la presente, indica, por ejemplo, el refuerzo adicional de la inmunidad cuando una bacteria o un virus patógeno o similar penetra en el organismo de un ser humano o de un animal mediante el incremento del número de células NK para mostrar rápidamente resistencia a la enfermedad, rapidez o eficacia de la respuesta de la inmunidad humoral tal como la producción de IgG, o rapidez o eficacia de la respuesta del sistema inmune del tracto intestinal. Concretamente, en el caso de un estado normal en el que no hay en absoluto posibilidad de producción de una infección por una bacteria o un virus patógeno, o en el caso en

el que exista la posibilidad de infección por una bacteria o un virus patógeno, la infección por la bacteria o el virus patógeno anteriormente mencionados que han entrado en el organismo puede ser completamente prevenida o reducida por la administración con antelación a un ser humano o a un animal de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas. También de la misma manera, cuando exista la posibilidad de que la bacteria o el virus patógeno haya penetrado ya en el organismo, la aparición o la crisis de las enfermedades causadas por la infección anteriormente mencionada con la bacteria o el virus patógeno o similar puede ser prevenida o reducida por la administración inmediata de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas a un ser humano o a un animal.

Además, el término “prevención y/o tratamiento de una infección por una bacteria patógena”, según se utiliza en la presente, significa, por ejemplo, la prevención de la infección por la bacteria patógena o de la aparición y la crisis de las enfermedades causadas por la infección cuando una bacteria patógena que está representada por el género *Salmonella* o por el género *Campylobacter* entra en el tracto digestivo o en el tracto respiratorio de un ser humano o de un animal. Concretamente, en el caso de un estado normal en el cual no hay en absoluto posibilidad de de infección o en el caso en el que exista una posibilidad de infección, la infección anteriormente mencionada por una bacteria patógena puede ser prevenida completamente o reducida por la administración con antelación a un ser humano o a un animal de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas. También de la misma manera, cuando exista la posibilidad de que un sujeto esté ya infectado por una bacteria patógena, la aparición y la crisis de las enfermedades causadas por la infección anteriormente mencionada por una bacteria patógena puede ser completamente prevenida o reducida por la administración inmediata a un ser humano o a un animal de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas.

El término “prevención y/o tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal”, según se utiliza en la presente, indica la prevención y/o el tratamiento de, por ejemplo, el desarrollo de un síntoma o de una enfermedad perteneciente a un grupo de enfermedades intratables conocida como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. Esto es, la enfermedad anteriormente mencionada puede completamente tratada o sus síntomas pueden ser aliviados mediante la administración de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas, a un ser humano o a un animal que padezca ya la enfermedad anteriormente mencionada. También de la misma manera, en el caso de un estado normal sin posibilidad en absoluto de padecer la enfermedad anteriormente mencionada, o en un caso en el que exista la posibilidad de padecer la enfermedad anteriormente mencionada, la enfermedad anteriormente mencionada puede ser prevenida o aliviada por la administración con antelación a un ser humano o a un animal de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas.

El término “prevención y/o tratamiento de una enfermedad alérgica”, según se utiliza en la presente, indica, por ejemplo, el efecto para la mejora y/o el tratamiento de los síntomas de una enfermedad alérgica por la inclinación del equilibrio de las células T cooperadoras Th1/Th2, que son células inmunes, hacia Th1. Específicamente, la enfermedad alérgica muestra dermatitis atópica, polinosis, diarrea causada por un componente originado de la alimentación y síntomas similares. Concretamente, en el caso de un estado normal en el que no exista en absoluto la posibilidad de mostrar síntomas alérgicos o en el caso de que exista la posibilidad de crisis de síntomas alérgicos, la crisis de los síntomas alérgicos puede ser completamente prevenida, o su riesgo puede ser reducido, por la administración con antelación a un ser humano o a un animal de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas. También de la misma manera, cuando exista la posibilidad de que se muestre ya un síntoma alérgico, la progresión del síntoma alérgico puede ser prevenida o aliviada por la administración inmediata de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención o de una preparación farmacéutica que contenga las mismas, a un ser humano o a un animal.

El origen de la célula bacteriana de la composición de células bacterianas de la presente invención es *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 (FERM BP-10463). Con respecto a las cepas mutantes de MDT-1, las mismas no están limitadas siempre que los efectos de la presente invención puedan ser obtenidos a partir de ellas. Un ejemplo de ello incluye una cepa subcultivada, una cepa mutante artificial y una cepa mutante natural, una cepa recombinante, etcétera, de MDT-1. Las propiedades bacteriológicas de la cepa MDT-1 son según sigue.

Propiedades bacteriológicas de MDT-1

La cepa MDT-1 de *Butyrivibrio fibrisolvens* es un bacillo Gram negativo. La bacteria es una bacteria estrictamente anaeróbica que requiere para su crecimiento un elevado grado de anaerobiosis. La utilización de azúcar por parte de la bacteria está mostrada en la tabla siguiente.

Tabla 2. Utilización de azúcar por

B. fibrisolvans MDT-1¹⁾

Bacterias	Azúcares ²⁾									
	Glu	Mal	Fru	Gal	Lac	Ara	Xil	Cel	Sta	Avi
Bacteria aislada	++	+	++	++	+	+	++	++	++	-
<i>B. fibrisolvans</i>	++	+	++	++	+	+	++	++	++	-

¹⁾ Con respecto a la utilización de azúcar, se midieron las cantidades restantes después de 24 horas de cultivo y se dividieron sobre la base de las cantidades consumidas: “++” indica 20 mM o más de consumo; “+” indica 5 mM o más de consumo; y “-” indica menos de 5 mM de consumo.

²⁾ Glu = glucosa, Man = manosa, Fru = fructosa, Gal = galactosa, Lac = lactosa, Ara = arabinosa, Xil = xilosa, Cel = celobiosa, Sta = almidón de maíz, Avi = avicel (celulosa microcristalina).

5 Adicionalmente, los productos de fermentación que se forman en el momento del crecimiento de la bacteria son según sigue.

Tabla 3. Productos de fermentación en el momento del crecimiento de *B. fibrisolvans* MDT-1¹⁾

Bacterias	Productos de fermentación ²⁾				
	Ácido láctico	Ácido fórmico	Ácido acético	Ácido butírico	Cantidad total
Bacteria aislada	11,8	9,9	10,3	11,3	43,3
<i>B. fibrisolvans</i>	12,2	9,7	9,8	11,5	43,2

¹⁾ Productos de fermentación después de 24 horas de cultivo utilizando como sustratos glucosa y celobiosa (2 g/l de cada una).

²⁾ No se detectaron ácido succínico ni ácido propiónico en ninguna de las dos bacterias.

10 A este respecto, la cepa MDT-1 de *Butyrivibrio fibrisolvans* fue depositada el 9 de Noviembre de 2004 como FERM P-20293 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (dirección: Central 6, 1-1 Higashi 1-chome, Tsukuba, Ibaraki, Japón) (a este respecto, la cepa MDT-1 fue transferida al International Depository el 5 de Diciembre de 2005 como FERM BP-10463).

A continuación se describe el método de cultivo de la cepa MDT-1.

15 Cuando se cultiva *Butyrivibrio fibrisolvans* en la presente invención, puede utilizarse un medio nutricional general siempre que contenga un componente que presente capacidad tamponante a pH alrededor de neutro, y puede utilizarse un medio natural o un medio sintético siempre que contenga de forma suficiente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, metales, ácidos grasos de cadena corta, vitaminas y aminoácidos.

20 Con respecto a la fuente de carbono del medio, puede utilizarse glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manosa, almidón, etcétera. Además, puede utilizarse como fuente de nitrógeno peptona, levadura, extracto de carne, etcétera. Adicionalmente, pueden utilizarse como sales inorgánicas hidrógenofosfato dipotásico, dihidrógenofosfato de potasio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, acetato de potasio, etcétera.

25 Con respecto al método de cultivo, *Butyrivibrio fibrisolvans* puede ser cultivado mediante cultivo con agitación a una temperatura de 10°C a 70°C, preferiblemente de 25°C a 60°C, más preferiblemente de 30°C a 45°C, durante un periodo de 2 a 96 horas, preferiblemente de 3 a 48 horas, más preferiblemente de 5 a 24 horas, manteniendo un grado de anaerobiosis más elevado mediante sustitución de la atmósfera por gas dióxido de carbono, gas nitrógeno o similar.

La composición de células bacterianas de la presente invención contiene células bacterianas del microorganismo anteriormente mencionado *Butyrivibrio fibrisolvans* MDT-1.

A continuación se describe la composición de células bacterianas de la presente invención con

referencia a un caso en el cual la composición de células bacterianas de la presente invención contiene células del microorganismo anteriormente mencionado *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1.

5 Se obtiene un precipitado que contiene las células bacterianas mediante tratamiento del líquido de cultivo obtenido. Adicionalmente, la composición de células bacterianas puede ser también obtenida suspendiendo las células bacterianas en una solución isotónica o en una solución similar. Como solución isotónica o solución similar, puede utilizarse una solución de cloruro de sodio o similar.

10 Con el fin de obtener la composición de células bacterianas de la presente invención que contiene un microorganismo *Butyrivibrio fibrisolvens* de la cepa MDT-1 con capacidad para producir ácido butírico, la composición de células bacterianas de la presente invención puede ser preparada llevando a cabo el cultivo bajo condiciones que sean apropiadas para el microorganismo según se describió anteriormente, seguido por la recuperación de las células que comprenden el microorganismo de la presente invención y, si es necesario, la adición de componentes opcionales (una solución, células distintas de dichas células, un vehículo, un diluyente, etcétera).

15 El contenido de células bacterianas en la composición de células bacterianas no está particularmente limitado, siempre que puedan demostrarse las funciones suficientes descritas anteriormente de acuerdo con el fin de la solicitud. Por ejemplo, el contenido puede ser del 0,01 al 99% en masa, preferiblemente del 0,1 al 80% en masa, sobre la base del peso total de la composición de células bacterianas.

20 Además de las células bacterianas de la invención, la composición de células bacterianas de la presente invención puede contener células bacterianas adicionales distintas de las células bacterianas de la invención, tales como células de al menos uno de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Clostridium*. Cuando se utilizan en combinación células bacterianas distintas de las células bacterianas de la presente invención, puede esperarse una mejora adicional del efecto probiótico en comparación con la composición de células bacterianas que contiene las células bacterianas de la presente invención solas.

25 La composición de células bacterianas de la presente invención puede contener las células bacterianas de la presente invención solas como ingrediente activo, o puede contener un vehículo y/o diluyente apropiado junto con las células bacterianas de la presente invención como ingrediente activo. Como el vehículo y/o diluyente anteriormente mencionado puede utilizarse un vehículo o un diluyente utilizado de manera general como vehículo o diluyente de composiciones de células bacterianas, tal como un excipiente (por ejemplo lactosa, cloruro de sodio, sorbitol, etcétera), un surfactante o un antiséptico, siempre que el efecto inhibitorio de la carcinogénesis, el efecto inmunestimulante, el efecto preventivo y de tratamiento de la infección por un patógeno, el efecto preventivo y de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y el efecto preventivo y de tratamiento de una enfermedad alérgica ejercidos por las células bacterianas de la presente invención como ingrediente activo no sean suprimidos o inhibidos por el mismo.

30 Mediante la utilización de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención solas o en forma de las preparaciones farmacéuticas anteriormente mencionadas, puede llevarse a cabo una inhibición de la carcinogénesis, una mejora de la inmunidad, la prevención de infecciones por patógenos, la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal y la prevención de enfermedades alérgicas en un ser humano o en un huésped animal. Alternativamente, incluso cuando el ser humano o el huésped animal tenga ya cáncer; tenga su inmunidad reducida; tenga posibilidad de infección por un patógeno; tenga la posibilidad de infección por una enfermedad inflamatoria intestinal o tenga la posibilidad de infección por una enfermedad alérgica, cada síntoma puede ser tratado o aliviado por la administración de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención.

35 El organismo diana de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitado, siempre que sea un organismo en el cual puedan expresarse eficazmente los efectos de la presente invención. Sus ejemplos incluyen humanos o animales. Un ejemplo de animales incluye animales vertebrados tales como mascotas y animales domésticos y, particularmente, peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos, etcétera. Sus ejemplos ilustrativos incluyen peces, anfibios y reptiles criados o atesorados, aves atesoradas, mascotas tales como perros, gatos o roedores, animales domésticos tales como ganado y cerdos y aves de corral domésticas.

40 Con respecto a la administración de las células bacterianas o de la composición de células bacterianas de la presente invención, es deseable una realización mediante la cual las células bacterianas o la composición de células bacterianas puedan alcanzar el tracto digestivo, y es más deseable una realización mediante la cual puedan alcanzar el intestino. Un ejemplo de una realización incluye la administración oral mediante tabletas, píldoras, cápsulas, gránulos, gránulos finos, polvos, soluciones orales para uso oral o similares, y la administración parenteral que utiliza supositorios.

45 La cantidad de la composición de células bacterianas anteriormente mencionada que ha de estar contenida como ingrediente activo en las medicinas, aditivos alimentarios, inhibidores de la carcinogénesis, inmunostimulantes, agentes para la prevención y el tratamiento de infecciones por patógenos, agentes para la prevención y el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y agentes para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas de la presente invención, no está particularmente limitada siempre que puedan obtenerse los efectos de la

invención, y cuando se expresa en cantidad de células bacterianas, es preferiblemente de 10^3 a 10^{14} UFC/g, más preferiblemente de 10^5 a 10^{13} UFC/g y, en particular, preferiblemente de 10^6 a 10^{12} UFC/g.

El método de administración de la composición de células bacterianas anteriormente mencionada (dosis, frecuencia de administración, periodo de administración) que es el ingrediente activo de las medicinas, aditivos alimentarios, inhibidores de la carcinogénesis, inmunostimulantes, agentes para la prevención y el tratamiento de infecciones por patógenos, agentes para la prevención y el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y agentes para la prevención y el tratamiento de enfermedades alérgicas de la invención y los métodos de la presente invención, no está particularmente limitado siempre que las células bacterianas anteriormente mencionadas puedan alcanzar el intestino y puedan crecer en el intestino y puedan obtenerse los efectos de la presente invención. Así, puede ser establecido apropiadamente considerando el animal diana, la finalidad y el estado de crecimiento de las células bacterianas.

La dosis no está particularmente limitada siempre que puedan obtenerse los efectos de la presente invención, pero cuando se expresa en cantidad de células bacterianas por administración, es preferiblemente de 10^3 a 10^{15} UFC, más preferiblemente de 10^6 a 10^{14} UFC y, en particular, preferiblemente de 10^8 a 10^{12} UFC por 1 kg del animal diana.

La dosis del rango anteriormente mencionado puede ser, por ejemplo, administrada una vez o administrada continuamente a lo largo de un cierto periodo de tiempo. En el caso de administración continua, el periodo de administración es, por ejemplo, preferiblemente de 2 días a 6 meses o más, más preferiblemente de 3 días a 6 meses o más, en particular, preferiblemente de 7 días a 6 meses o más. De acuerdo con la presente invención, los efectos de la presente invención pueden ser expresados además mediante la continuación de la administración a lo largo de un periodo de tiempo prolongado adicional.

En el caso de administración continua, la frecuencia de administración es, por ejemplo, preferiblemente de una o más administraciones en 1 mes, más preferiblemente de una o más administraciones en 2 semanas, en particular, preferiblemente de una vez por semana a administración diaria.

Con respecto al método de administración, fijando la dosis diaria en el rango anteriormente mencionado, la dosis total puede ser administrada una vez al día o puede ser administrada dividiéndola en 2 a 3 veces al día. Alternativamente, puede ser administrada mezclándola con el alimento o similar, de tal manera que la dosis diaria esté dentro del rango anteriormente mencionado.

Ejemplos

Aunque la presente invención se describe a continuación de forma ilustrativa sobre la base de ejemplos, éstos no limitan el ámbito de la presente invención y se incluyen en la misma todos los medios para cambiarla o modificarla que no están mostrados en la presente.

Ejemplo 1. Preparación de la composición de células bacterianas

Con el fin de obtener la composición de células bacterianas de la invención, un medio que constaba de 0,9 g de hidrógenofosfato dipotásico (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,9 g de dihidrógenofosfato de potasio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 1,8 g de cloruro de sodio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 1,8 g de sulfato de amonio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,24 g de cloruro de calcio deshidratado (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,375 g de sulfato de magnesio heptahidrato (producido por Wako Pure Chemical Industries), 1 g de acetato de potasio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,5 g de propionato de sodio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,3 g de n-butarato de sodio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,1 g de ácido valérico (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,1 g de ácido isobutírico (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,1 g de ácido isovalérico (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,1 g de butirato de 2-metilo (producido por Wako Pure Chemical Industries), 10 mg de citrato de amonio hierro (producido por Wako Pure Chemical Industries), 6 mg de cloruro de manganeso (producido por Wako Pure Chemical Industries), 2 mg de sulfato de cobalto (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,4 mg de cloruro de níquel (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,4 mg de molibdato de amonio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 1 mg de sulfato de cobre al 15% (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,3 mg de sulfato de aluminio potasio (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,3 mg de ácido bórico (producido por Wako Pure Chemical Industries), 2 mg de sulfato de zinc (producido por Wako Pure Chemical Industries), 2 mg de fosfato de piridoxal (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,5 mg de ácido p-aminobenzoico (producido por Wako Pure Chemical Industries), 0,2 mg de biotina (producida por Wako Pure Chemical Industries), 2 mg de propionato de fenilo (producido por Kanto Chemical Co., Ltd.), 2 mg de L-arginina (producida por Wako Pure Chemical Industries), 100 mg de Panvitan (producido por Takeda Chemical Industries), 0,03 µl de Vitamina K₁ (producida por SIGMA), 3 g de glucosa (producida por Wako Pure Chemical Industries), 3 g de Extracto de Levadura (producido por Difco), 1,5 g de Triptona Peptona (producida por Becton Dickinson and Company), 1,5 g de Tripticasa (producida por Becton Dickinson and Company) y 1 g de clorhidrato de cisteína (producido por Wako Pure Chemical Industries) (pH 7,0) (referido de aquí en adelante como medio A), fue sometido a sustitución con CO₂ y cerrado herméticamente en un recipiente y esterilizado por calor. Posteriormente se inoculó *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1

(FERM BP-10463) en el medio A (40 ml) y se cultivó a 37°C durante 5 horas con agitación. Por centrifugación del medio de cultivo así obtenido utilizando una centrifuga (3000 G, 30 minutos), se obtuvo un precipitado que contenía las células bacterianas. A continuación, se obtuvo una composición de células bacterianas suspendiendo las células bacterianas en una solución de NaCl al 0,8% para obtener una densidad de células bacterianas de 10^{10} UFC/ml.

5 Ejemplo 2. Efecto inhibitor sobre la formación de FCA

10 Utilizando la composición de células bacterianas de la presente invención, se llevó a cabo la evaluación de su capacidad para inhibir la formación de focos de criptas aberrantes (FCA) inducida por DMH (dimetilhidrazina; producida por Aldrich) en ratón. Adicionalmente, se llevó a cabo también el mismo ensayo con *Clostridium butyricum* ya en el mercado como bacteria productora de ácido butírico, y se compararon sus efectos inhibitorios.

Como animales de ensayo se utilizaron ratones Jcl:ICR machos de 4 semanas de edad (CLEA Japan, Inc.). El ensayo se llevó a cabo estableciendo los grupos de ensayo según se muestra en la tabla siguiente, con 10 animales por grupo.

15 La composición de células bacterianas obtenida mediante el método descrito en el Ejemplo 1 fue administrada oralmente a los ratones de manera forzada utilizando un tubo gástrico. Al grupo control, se le administró una porción de 0,1 ml (10^9 UFC) de la solución de NaCl al 0,8%, y la misma porción de la composición de células bacterianas al grupo de administración. La pauta de administración de la composición de células bacterianas y de dimetilhidrazina (DMH; producida por Aldrich) fue según se muestra en la Fig. 1.

20 Los focos de criptas aberrantes (FCA), como lesiones precancerosas de la mucosa del tracto del intestino grueso, fueron medidos el día 31 después del inicio del ensayo. Después de someter a cada ratón a eutanasia, se extrajo una parte del tracto intestinal del ratón, desde el ciego hasta el ano, y se fijó en formalina al 10% (producida por Junsei Chemical) después de cortar para abrir la parte central. Después de esto, se tiñó con azul de metileno (producido por Kanto Chemical, Co., Ltd.) y se contaron los FCA utilizando un microscopio óptico.

Tabla 4. Sección de Ensayo

Grupos	Número de animales	Administración de DMH	Administración de células bacterianas
Sin administración de DMH ni de células bacterianas	10	NaCl 0,8%	NaCl 0,8%
Administración de DMH sin administración de células bacterianas	10	DMH 50 mg/kg de peso corporal	NaCl 0,8%
Administración de DMH y de <i>B. fibrisolvens</i>	10	DMH 50 mg/kg de peso corporal	10^9 UFC, 3 veces/semana
Administración de DMH y de <i>C. butyricum</i>	10	DMH 50 mg/kg de peso corporal	10^9 UFC, 3 veces/semana

25

Cambios del peso corporal y condiciones de los órganos

30 Aunque la ganancia de peso corporal fue reducida por la administración de DMH, la misma fue mejorada por la administración oral de la composición de células bacterianas de la presente invención (Tabla 5). Tal efecto no se encontró con la administración oral de *C. butyricum*. No se encontraron diferencias significativas en la masa del hígado en el momento de la finalización del ensayo (Tabla 6). La masa del hígado por peso corporal se redujo por la administración de DMH y mejoró, hasta un nivel similar al del grupo al que no se había administrado DMH, por la administración de la composición de células bacterianas de la presente invención. La masa del bazo se incrementó por la administración de DMH, y mejoró hasta un cierto grado por la administración de la composición de células bacterianas de la presente invención. Tales efectos no se encontraron con *C. butyricum*.

Tabla 5. Cambios en el peso corporal

Grupos	Peso corporal de los ratones (g)				
	3 días	10 días	17 días	24 días	31 días
Sin administración de DMH ni de células bacterianas	27,8±0,2	28,9±0,3	35,9±0,5	38,4±0,5	40,5±0,7 ^a
Administración de DMH sin administración de células bacterianas	27,8±0,3	27,7±0,5	32,8±0,9	35,4±0,7	34,6±1,0 ^b
Administración de DMH y de <i>B. fibrisolvens</i>	27,7±0,4	30,1±0,7	33,2±0,7	36,1±0,8	37,9±0,7 ^c
Administración de DMH y de <i>C. butyricum</i>	27,8±0,2	28,8±0,2	31,5±1,0	35,4±0,6	34,9±0,7 ^b

a – c: Se muestra que existe diferencia significativa entre signos opuestos (p<0,05)

Tabla 6. Peso de órganos

Grupos	Peso de órganos (g)	
	Hígado (proporción respecto al peso corporal, %)	Bazo (proporción respecto al peso corporal, %)
Sin administración de DMH ni de células bacterianas	2,23±0,10 (5,5±0,3) ^a	0,105±0,004 (0,260±0,007) ^a
Administración de DMH sin administración de células bacterianas	2,48±0,09 (7,2±0,2) ^b	0,496±0,014 (1,441±0,053) ^b
Administración de DMH y de <i>B. fibrisolvens</i>	2,26±0,08 (5,8±0,1) ^a	0,301±0,030 (0,771±0,069) ^c
Administración de DMH y de <i>C. butyricum</i>	2,47±0,11 (7,1±0,4) ^b	0,514±0,024 (1,481±0,086) ^b

a – c: Se muestra que existe diferencia significativa entre signos opuestos (p<0,05)

Condiciones del tracto intestinal y FCA

5 La longitud desde el colon hasta el recto fue acortada por la administración de DMH y mejorada hasta cierto grado por la composición de células bacterianas de la presente invención. Además, la masa del ciego y la masa del colon y del recto fueron reducidas por la administración de DMH y mejoradas hasta cierto grado por la composición de células bacterianas de la presente invención. No se encontró diferencia en lo que se refiere al pH del contenido del ciego y del contenido del colon. Adicionalmente, el número de FCA formados fue controlado hasta la mitad aproximadamente por la administración oral de la composición de células bacterianas de la presente invención. Tales efectos tampoco fueron encontrados con *C. butyricum*.

10

Tabla 7. Longitud del colon-recto; peso del ciego y del colon-recto y pH del contenido del ciego y del colon-recto

Grupos	Longitud (cm) del colon-recto	Peso de órganos (g)		pH	
		Ciego	Colon-recto	Contenido del ciego	Contenido del colon-recto
Sin administración de DMH ni de células bacterianas	10,9±0,3 ^a	0,207±0,012 ^a	0,426±0,017 ^a	6,5±0,0	6,7±0,0
Administración de DMH sin administración de células bacterianas	8,4±0,2 ^b	0,111±0,012 ^b	0,264±0,015 ^b	6,5±0,0	6,7±0,0
Administración de DMH y de <i>B. fibrisolvens</i>	9,3±0,4 ^c	0,163±0,018 ^c	0,338±0,024 ^c	6,5±0,0	6,7±0,0
Administración de DMH y de <i>C. butyricum</i>	8,5±0,3 ^b	0,115±0,007 ^b	0,258±0,012 ^b	6,5±0,0	6,7±0,0
a – c: Se muestra que existe diferencia significativa entre signos opuestos (p<0,05)					

Tabla 8. Número de FCA formados

Grupos	Número de FCA formados
Sin administración de DMH ni de células bacterianas	0±0,0 ^a
Administración de DMH sin administración de células bacterianas	14,7±1,2 ^b
Administración de DMH y de <i>B. fibrisolvens</i>	7,4±0,8 ^c
Administración de DMH y de <i>C. butyricum</i>	15,7±1,2 ^b
a – c: Se muestra que existe diferencia significativa entre signos opuestos (p<0,05)	

5 Ejemplo 3. Efecto de inmunoaceleración

Se examinó el grado de aceleración de la inmunidad en un huésped midiendo las células NK, que se considera que atacan en primer lugar a las sustancias foráneas que entran en un organismo tales como patógenos y virus.

10 Se utilizaron como animales de ensayo ratones Jcl:ICR machos de 8 semanas de edad (CLEA Japan, Inc.) y el ensayo se llevó a cabo con 3 animales por grupo.

15 La composición de células bacterianas obtenida mediante el método descrito en el Ejemplo 1, fue administrada a los ratones de manera forzada utilizando un tubo gástrico. Al grupo control se administró una porción de 0,1 ml (10⁹ UFC) de la solución de NaCl al 0,8% y la misma porción de la composición de células bacterianas al grupo de administración. La administración se llevó a cabo continuamente durante 3 días y cada ratón fue sacrificado 1 semana después de la primera administración.

20 Se extrajo el bazo de los ratones sacrificados por dislocación de las vértebras cervicales y a partir del mismo se prepararon células esplénicas. Después de llevar a cabo la lisis de eritrocitos, las células fueron lavadas dos veces y suspendidas en PBBS (un tampón; ver la tabla) a una densidad de 10⁷ células/ml. A 100 µl de la suspensión de linfocitos esplénicos así preparada, se añadió una porción de 10 µl de cada uno de los anticuerpos que están descritos a continuación y se dejó reposar sobre hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se lavó dos veces con PBBS y se utilizó en la medida. Para medir las células se utilizó un FACSCalibur (Becton Dickinson and Company). Para el marcaje de las células se utilizaron un anticuerpo anti-CD3 marcado con FITC (producido por Beckman Coulter, Inc.), un anticuerpo anti-CD19 marcado con PE (producido por Beckman Coulter, Inc.) y un anticuerpo anti-NK1.1 marcado con PE (producido por Beckman Coulter, Inc.).

5 Por la administración oral de la composición de células bacterianas, se redujeron las proporciones de células T y B en los linfocitos y se incrementaron las proporciones de células NK y NKT (T destructoras naturales) (Tabla 10). Cuando se convirtieron en el número de células, no se encontró influencia de la administración oral de la composición de células bacterianas sobre el número de células T y de células B (Tabla 11). Sin embargo, el número de células NK se incrementó 3,5 veces y el número de células NKT se incrementó 3,8 veces. Por consiguiente, la administración oral a los ratones de la composición de células bacterianas acelera su función inmune.

Tabla 9. PBBS (solución de sales equilibrada tamponada con fosfato) (0,1% de BSA añadido)

	NaCl	7,20 g
	KCl	0,32 g
10	Na ₂ HPO ₄	1,15 g
	PH ₂ PO ₄	0,20 g
	CaCl ₂	0,14 g
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,20 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,20 g
15	Glucosa	1,00 g
	BSA	1,00 g
	H ₂ O	Hasta 1 litro

Todos los productos fueron producidos por Kanto Chemical, excepto la BSA (producida por Wako Pure Chemical Industries).

20 Tabla 10. Proporción de linfocitos existentes

Grupos	Células T (%)	Células B (%)	Células NK (%)	Células NKT (%)	Otros (%)
Grupo control	17,2	53,4	4,6	0,8	24,1
Grupo de ensayo	16,5	42,3	14,4	2,5	24,4

Tabla 11. Número de linfocitos

Grupos	Células T	Células B	Células NK	Células NKT	Otros
Grupo control	8,9x10 ⁶	2,8x10 ⁷	2,4x10 ⁶	3,9x10 ⁵	8,0x10 ⁷
Grupo de administración	9,5x10 ⁶	2,5x10 ⁷	8,4x10 ⁶	1,5x10 ⁶	7,1x10 ⁷

Ejemplo 4. Efecto preventivo de la infección por patógenos

25 *Campylobacter* es una bacteria causante del envenenamiento por alimentos, que es tomada oralmente a partir de las heces o de alimento contaminado y que se establece en el tracto intestinal. Por consiguiente, se examinó si *Butyrivibrio fibrisolvens* cepa MDT-1 tenía o no efecto para prevenir la infección.

Se utilizaron como animales de ensayo ratones Jcl:ICR machos de 5 semanas de edad (CLEA Japan, Inc.) y el ensayo se llevó a cabo con 10 animales por grupo.

30 La composición de células bacterianas obtenida mediante el método descrito en el Ejemplo 1 fue administrada oralmente a los ratones de manera forzada utilizando un tubo gástrico. Al grupo control se administró una porción de 0,2 ml (10⁹ UFC/ml) de la solución de NaCl al 0,8% y se administró la misma porción de la composición de células bacterianas al grupo de administración. La administración se llevó a cabo continuamente durante 3 días y comenzó 4 días antes de la infección. Dos días después de ello, se inoculó oralmente la cepa 11580-3 de *Campylobacter coli* (original de aves de corral domésticas) en porciones de 0,2 ml (10⁷ UFC/ml). La composición de células bacterianas fue administrada continuamente durante 4 días, comenzando el día siguiente de la infección, de la misma

35

manera que antes de la infección. Cada animal fue sacrificado el día 5 después de la infección y anatomizado para recoger las heces del ciego. Se diluyeron con NaCl al 0,8% mediante un sistema de diluciones seriadas de 10 veces y se aplicaron a un medio de agar sangre de carnero al 10% para *Campylobacter* (Japan Becton Dickinson and Company). Después de 48 horas de cultivo a 42°C en un incubador anaeróbico, se contó el número de células viables (colonias) para calcular el número de células de *Campylobacter* por 1 g de heces del ciego (log UFC/g).

No se observaron casos mortales ni en el grupo control ni en el grupo administrado con la composición de células bacterianas.

Según se muestra en la Tabla 12, el número de células de *Campylobacter* en las heces del ciego era 8,27 log UFC/g de media (de 7,88 a 8,82 log UFC/g) en el grupo control y 6,96 log UFC/g de media (de 4,79 a 8,69 log UFC/g) en el grupo administrado con la composición de células bacterianas. En comparación con el grupo control, el grupo administrado con la composición de células bacterianas mostró una reducción significativa de 1,31 log UFC/g.

Sobre la base de los resultados anteriores, la infección con *Campylobacter* se redujo cuando se administró la composición de células bacterianas. Esto es, se reveló que puede efectuarse la prevención o la reducción de la infección mediante la toma continua de la composición de células bacterianas.

Tabla 12. Efecto preventivo de la infección por *Campylobacter*

Número de células de <i>C. coli</i> en el ciego (log UFC/g)	
	Media ± S.D.
Grupo Control	8,27 ± 0,30
Grupo Administrado con la Composición de Células Bacterianas	6,96 ± 1,47
Existe diferencia significativa: P<0,05	

Ejemplo 5. Efecto preventivo de la enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) tal como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, es una enfermedad intratable. Por consiguiente, se examinó si *Butyrivibrio fibrisolvens* cepa MDT-1 tenía o no un efecto similar.

Se utilizaron como animales de ensayo ratones Jcl:ICR machos de 4 semanas de edad (CLEA Japan, Inc.) y el ensayo se llevó a cabo con 6 animales por grupo.

La composición de células bacterianas obtenida mediante el método descrito en el Ejemplo 1 fue administrada oralmente a los ratones de manera forzada utilizando un tubo gástrico. Al grupo control se administró una porción de 0,1 ml (10^9 UFC) de la solución de NaCl al 0,8% y la misma porción de la composición de células bacterianas fue administrada al grupo de administración. La administración se llevó a cabo continuamente durante 3 días.

Con el fin de inducir la IBD, se disolvió dextrán sulfato de sodio (DSS; producido por MP Biomedical) en el agua de bebida a una concentración del 3% (p/v) y se dejó que los ratones la tomaran libremente. La administración de DSS se llevó a cabo durante 7 días, empezando el día siguiente de los 3 días de administración continua de la composición de células bacterianas. El octavo día, cada ratón fue sacrificado y anatomizado para medir la longitud y la masa del tracto intestinal.

El cálculo del índice de actividad de la enfermedad (DAI) se llevó a cabo de la siguiente manera. Concretamente, se evaluó la reducción del peso corporal, la forma de las heces (grado de diarrea) y la presencia de sangre oculta en 5 niveles de 0 a 4. En este caso, los síntomas graves fueron evaluados por los valores más elevados. Se utilizó como DAI el valor calculado dividiendo el número total de estos tres puntos de medida entre 3.

El método de medida de la mieloperoxidasa (MPO) se llevó a cabo de la siguiente manera. Esto es, una porción de 6 cm de longitud de la parte terminal del intestino grueso fue suspendida en tampón fosfato 20 mmol/l (pH = 6,0) que contenía 5 ml/l (v/v) de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB; un surfactante) (producido por Wako Pure Chemical Industries) y sometida a desintegración ultrasónica. Después de centrifugar (15.000 rpm, 15 minutos), una porción de 0,1 ml del sobrenadante fue mezclada con 2,9 ml de tampón fosfato 20 mM (pH = 6,0) que contenía guayacol (producido por SIGMA) 20 mM y 5 ml/l de peróxido de hidrógeno (producido por Kanto Chemical Co., Ltd.) y se midió el cambio de la absorbancia a una longitud de onda de 460 nm y se utilizó como actividad MPO.

Según se muestra en la Tabla 6, el peso corporal se redujo por la administración de DSS, pero el grado de reducción se redujo en los ratones que habían sido administrados oralmente con la composición de células bacterianas.

Tabla 13. Cambios en el peso corporal de los ratones por la administración de DSS y *B. fibrisolvans*

Admón. DSS	Admón. <i>B. fibrisolvans</i>	Peso corporal de los ratones (g) (n = 6)							
		Días de administración de DSS							
		Antes de la Admón.	1	2	3	4	5	6	7
-	-	28,1 ^a	29,4 ^a	29,7 ^a	30,0 ^a	31,3 ^a	31,8 ^a	32,5 ^a	33,7 ^a
+	-	28,1 ^a	29,08 ^a	29,3 ^a	29,5 ^a	29,7 ^b	29,5 ^c	28,2 ^c	26,5 ^c
+	+	28,0 ^a	29,0 ^a	29,4 ^a	29,8 ^a	29,9 ^b	30,2 ^b	29,9 ^b	30,2 ^b

a – c: El signo opuesto muestra la presencia de una diferencia significativa (P<0,05, n = 6)

5 Aunque tras la administración de DSS se observó un incremento del bazo, una reducción del hígado y un acortamiento del intestino grueso, el grado de estos cambios se redujo por la administración de la composición de células bacterianas (Tabla 14).

Tabla 14. Pesos del bazo y del hígado y longitud del tracto intestinal de ratones a los que se había administrado DSS o *B. fibrisolvans*

Administración de DSS	Administración de <i>B. fibrisolvans</i>	Peso de órganos (g)		Longitud del tracto intestinal (Colon-recto) (cm)
		Bazo	Hígado	
-	-	0,11 ^a	2,35 ^a	11,2 ^a
+	-	0,24 ^c	1,56 ^c	7,2 ^c
+	+	0,17 ^b	1,99 ^b	8,9 ^b

a-c: El signo opuesto muestra la presencia de una diferencia significativa (P<0,05, n = 6)

10 Además, a partir de los valores del DAI obtenidos mediante la conversión en valores numéricos de la reducción del peso corporal, de la forma de las heces y de la presencia de sangre oculta, se consideró que las condiciones de la enfermedad habían sido aliviadas por la administración de la composición de células bacterianas (Fig. 2). Adicionalmente, la actividad MPO del tejido del tracto intestinal de los ratones a los que se había administrado la composición de células bacterianas se redujo en un 40% aproximadamente respecto a la de los ratones a los que se había administrado DSS solo (Tabla 15). Sobre la base de este resultado, se consideró que el grado de inflamación era bajo debido a la presencia de menos neutrófilos en el tracto intestinal de los ratones a los que se había administrado la composición de células bacterianas.

Tabla 15. Actividad MPO en el tracto intestinal de los ratones a los que se había administrado DSS o *B. fibrisolvans*

Administración de DSS	Administración de <i>B. fibrisolvans</i>	Actividad MPO relativa
-	-	20 ^c
+	-	100 ^a
+	+	43 ^b

a-c: El signo opuesto muestra la presencia de una diferencia significativa (P<0,05, n = 6)

20 Sobre la base del resultado anterior, la administración oral de la composición de células bacterianas aliviaba los síntomas. Concretamente, se reveló que la enfermedad inflamatoria intestinal podía ser prevenida cuando se tomaba de manera continua la composición de células bacterianas.

Ejemplo 6. Actividad antialérgica

El número de células NK (destructoras naturales) del bazo se incrementó por la administración oral a los ratones de *Butyrivibrio fibrisolvans*. Las células NK producen una citoquina, IFN- γ . El IFN- γ tiene la capacidad de inclinar el equilibrio Th1/Th2 de células T cooperadoras hacia Th1. El equilibrio Th1/Th2 es un índice que se ve afectado en la alergia. Por consiguiente, se examinó si *Butyrivibrio fibrisolvans* era también eficaz o no en una enfermedad alérgica midiendo la citoquina.

Butyrivibrio fibrisolvans cepa MDT-1 fue cultivado en 20 ml de medio sintético hasta que alcanzó la metafase de la fase de crecimiento logarítmico. Las células bacterianas fueron lavadas una vez con PBS (un tampón líquido) y recuperadas mediante precipitación por centrifugación, seguido por suspensión en medio RPMI-1640 (producido por KOHJIN BIO) que contenía un 10% de suero bovino (JRH Bioscience), de tal manera que el número de células bacterianas fuera de 4×10^7 células/ml.

Se extrajo el bazo de un ratón y a partir del mismo se prepararon las células esplénicas. Después de llevar a cabo la lisis de eritrocitos, las células fueron lavadas dos veces y suspendidas en medio RPMI-1640 (producido por KOHJIN BIO) que contenía un 10% de suero bovino (JRH Bioscience), a una densidad de 4×10^7 células/ml. A una placa de cultivo, se añadió una porción de 0,5 ml de la suspensión de células esplénicas y a la misma se añadieron además 0,5 ml del líquido o medio bacteriano, seguido por incubación durante 72 horas en un incubador con un 5% de CO₂.

La determinación de la citoquina se llevó a cabo de la siguiente manera. Concretamente, el líquido del cultivo celular fue sometido a precipitación por centrifugación y el sobrenadante resultante fue utilizado como muestra. La determinación de la cantidad de IFN- γ y de IL-4 se llevó a cabo utilizando un kit de ELISA (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones adjuntas al mismo.

Como resultado, la producción de IFN- γ fue incrementada por la adición de *Butyrivibrio fibrisolvans* cepa MDT-1. Por otra parte, la producción de IL-4, que tiene la capacidad de inclinar el equilibrio Th1/Th2 hacia Th2, fue disminuida (Tabla 16). Se considera que el equilibrio Th1/Th2 se inclina hacia el lado de Th1 por la presencia de *Butyrivibrio fibrisolvans* MDT-1. Por consiguiente, la administración oral de *Butyrivibrio fibrisolvans* cepa MDT-1 es también eficaz para enfermedades alérgicas.

Tabla 16. Cantidades relativas de las citoquinas IFN- γ e IL-4 en células esplénicas de ratón

<i>Butyrivibrio fibrisolvans</i> (UFC)	Cantidades Relativas (%)	
	IFN- γ	IL-4
0	100	100
1×10^7	596	15

Ejemplo 7. Influencia sobre la formación de sarcoma

Con el fin de confirmar si existe o no un efecto inhibitor sobre un cáncer formado en una región distinta del intestino grueso, se examinó la influencia sobre la formación de un fibrosarcoma en ratones inducida por la administración subcutánea de 3-metilcolantreno (3-MC).

El ensayo se llevó a cabo en tres grupos: un grupo en el que no se administró 3-MC ni se administró la composición de células bacterianas (10 animales), un grupo en el que se administró 3-MC pero no se administró la composición de células bacterianas (13 animales) y un grupo en el que se administró 3-MC y se administró la composición de células bacterianas (11 animales). A cada uno de los ratones Jcl:ICR de 4 semanas de edad (CLEA Japan, Inc.), se administró oralmente de manera forzada una porción de 0,1 ml (10^9 UFC) de la composición de células bacterianas obtenida mediante el método descrito en el Ejemplo 1, con una frecuencia de 3 veces por semana. Una semana después de la primera administración, 20 mg de 3-MC (SIGMA) fueron disueltos en 2,0 ml de aceite de oliva y 0,1 ml de los mismos (3-MC, 1 mg) fueron administrados subcutáneamente en el lado derecho del flanco. La misma cantidad de aceite de oliva fue administrada al grupo control. La palpación se llevó a cabo 1 semana después de la administración subcutánea y se consideró tumor un endurecimiento de 3 mm o más de diámetro. La palpación se llevó a cabo durante 15 semanas. Adicionalmente, 3 animales de cada grupo fueron sacrificados 5 semanas después de la administración y se midió la composición de linfocitos (células NK).

Se extrajo el bazo de cada uno de los ratones sacrificados y las células esplénicas fueron suspendidas en PBS al que se había añadido un 0,1% de BSA (BSA/PBS) y lavadas mediante precipitación por centrifugación. Después de eliminar los eritrocitos utilizando una solución hipotónica (14 mmoles/l de NH₄Cl, 17 mmoles/l de Tris, pH 7,6), se llevó a cabo el lavado con BSA/PBS 2 veces. La suspensión celular fue marcada por la adición de un anticuerpo hacia células T marcado con fluorescencia [anticuerpo anti-CD3 marcado con FITC, anticuerpo

anti-CD19 marcado con PE, anticuerpo anti-NK1.1 marcado con PE, anticuerpo anti-CD4 marcado con FITC o anticuerpo anti-CD8 marcado con PE (Beckman Coulter, Hialeah, Florida)]. Se contó el número de linfocitos marcados utilizando citometría de flujo (FACSCalibur, Becton Dickinson).

Efecto sobre la formación de fibrosarcoma inducida por 3-MC

5 Según se muestra en la Fig. 3, no se encontró la formación de tumores en los ratones a los que se
 había administrado subcutáneamente aceite de oliva. En el grupo de ensayo al que se administró 3-MC solo, el tumor
 comenzó a aparecer la 5ª semana después de la administración de 3-MC. La tasa de formación de tumores en este
 punto de tiempo era del 20%. La tasa de formación continuó incrementándose posteriormente, y el tumor se había
 10 formado en todos los ratones en la 9ª semana después de la administración de 3-MC. Por otra parte, la tasa de
 formación de tumores en el grupo al que se había administrado la composición de células bacterianas era del 0% en la
 5ª semana y del 50% en la 9ª semana. Adicionalmente, la tasa de formación era del 75% incluso después de 15
 15 semanas. Sobre la base de este resultado, se confirmó que la administración oral de la composición de células bac-
 terianas tenía el efecto de retrasar o suprimir la formación de tumores inducida por 3-MC en ratones. A este respecto, el
 tratamiento con 3-MC y la administración de la composición de células bacterianas no tuvieron efecto sobre la ganancia
 de peso corporal de los ratones (Fig. 4).

Influencia sobre la composición de linfocitos esplénicos

20 Con el fin de confirmar si las células NK estaban o no implicadas en el retraso o en la supresión de
 la formación de tumores por la composición de células bacterianas, se midió la composición de linfocitos del bazo.
 Como se había considerado que era necesario un cierto periodo de tiempo para mostrar el efecto de la composición de
 células bacterianas, la medida de los linfocitos se llevó a cabo justo antes del inicio de la formación del tumor,
 concretamente 4 semanas después de la administración de 3-MC. No se encontraron diferencias significativas entre los
 grupos de ensayo, en términos del peso corporal, del peso del hígado y del bazo y de la cantidad de pienso ingerida,
 después de 4 semanas (Tabla 17). Sin embargo, la proporción de células NK y la proporción de células NKT
 incrementaron significativamente por la administración de la composición de células bacterianas (Tabla 18).

25 Tabla 17. Peso corporal, pesos del hígado y del bazo y cantidad ingerida de pienso

3-MC	Composición de células bacterianas	Peso (g)			Cantidad ingerida de pienso (g/ratón/día)
		Corporal	Hígado	Bazo	
No administrado	No administrada	35,1±0,79	2,2±0,1	0,101±0,009	3,3
Administrado	No administrada	36,5±0,67	2,2±0,1	0,109±0,036	3,1
Administrado	Administrada	35,4±0,96	2,2±0,1	0,098±0,025	3,3

Tabla 18. Efecto de la administración de 3-MC y de la composición de células bacterianas sobre la composición de linfocitos esplénicos

3-MC	Composición de células bacterianas	Proporción de linfocitos esplénicos (%)					
		Células T	CD4	CD8	Células B	Células NK	Células NKT
No administrado	No administrada	41,6±5,1	33,0±5,3	7,9±0,5	51,0±4,5	3,1±0,8	0,03±0,0 2
Administrado	No administrada	40,2±5,8	25,7±2,9	7,3±0,6	51,5±4,1	5,0±0,4	0,33±0,2 1
Administrado	Administrada	39,8±5,3	26,9±3,1	7,9±1,3	50,9±3,2	8,0±0,7	0,66±0,1 4

30 Se considera que las células NK tienen una función importante en la etapa inicial de la
 carcinogénesis. Adicionalmente, se ha informado sobre la posibilidad de que la carcinogénesis esté controlada por el
 incremento de la actividad citotóxica de las células NK. Adicionalmente, según se muestra en el Ejemplo 3, se confirmó
 que el equilibrio Th1/Th2 en el bazo se inclinaba hacia el lado Th1 por la administración oral de la composición de
 células bacterianas. Como se sabe que una citoquina de Th1, IFN- α , acelera el crecimiento de las células NK, se

considera que las células NK aumentan y, como resultado, retrasan o suprimen la formación del cáncer.

Sobre la base de los resultados anteriores, se confirmó que un cáncer en una región distinta del intestino grueso puede ser también suprimido por la administración oral de la composición de células bacterianas.

Aplicabilidad Industrial

5

La presente invención proporciona una composición de células bacterianas con actividad anticancerosa, efecto inmunoestimulante, efecto preventivo y de tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, efecto preventivo de la infección por patógenos, efecto preventivo y de tratamiento de enfermedades alérgicas, etcétera.

REIVINDICACIONES

1.- Una cepa de *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 depositada como FERM BP-10463 en el International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology.

5 2.- Una composición de células bacterianas que contiene células bacterianas de la cepa *Butyrivibrio fibrisolvens* MDT-1 de acuerdo con la reivindicación 1.

3.- Una preparación farmacéutica que contiene la composición de células bacterianas de acuerdo con la reivindicación 2 como ingrediente activo.

4.- Un aditivo alimentario que contiene como ingrediente activo la composición de células bacterianas de acuerdo con la reivindicación 2.

10 5.- Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para inhibir el desarrollo del cáncer.

6.- Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para inmunoestimulación.

7.- Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para la prevención y/o el tratamiento de una infección por un patógeno.

15 8.- Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal.

9.- Una preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad alérgica.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido un gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la EPO renuncia a toda responsabilidad a este respecto.

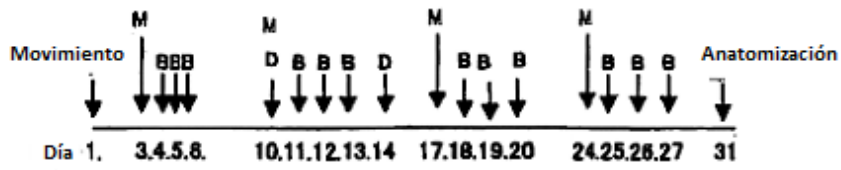
Documentos de patentes citados en la descripción

- 5 · WO 02080947 A1 [0007]
 · JP 2002306125 A [0009]
 · JP 10084909 A [0009]

Literatura distinta de patentes citada en la descripción

- 10 · **Kawai, Y. y col.** The circular bacteriocins gassericin A and circulacin A. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, 2004, vol. 5 (5), 393-8 [0009]
 · **Cherbut, C. y col.**, Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *American Journal of Physiology*, 1998, vol. 275, G1415-G1422 [0009]
 · **Cummings, J.H.** Short-chain fatty acids in the human colon. *Gut*, 1981, vol. 22, 763-779 [0009]
 15 · **Hague, A y col.** Butyrate acts as a survival factor for colonic epithelial cells: further fuel for the in vivo versus in vitro debate. *Gastroenterology*, 1997, vol. 112, 1036-1040 [0009]
 · **Kanauchi, O. y col.** Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr. Pharm. Des.*, 2003, vol. 9 (4), 333-346 [0009]
 20 · **Nakanishi, S. y col.** Effects of high amylose maize starch and *Clostridium butyricum* on metabolism in colonic microbiota and formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Microbiol. Immunol.*, 2003, vol. 47 (12), 951-958 [0009]
 · **Shane, B.S. y col.** Cellulolytic bacteria occurring in the rumen of sheep contained to low-protein teff hay. *J. Gen. Microbiol.*, 1969, vol. 55, 445-457 [0016]

Fig. 1



D: Administración de DMH

B: Administración de las células bacterianas

M: Medida

Fig.2

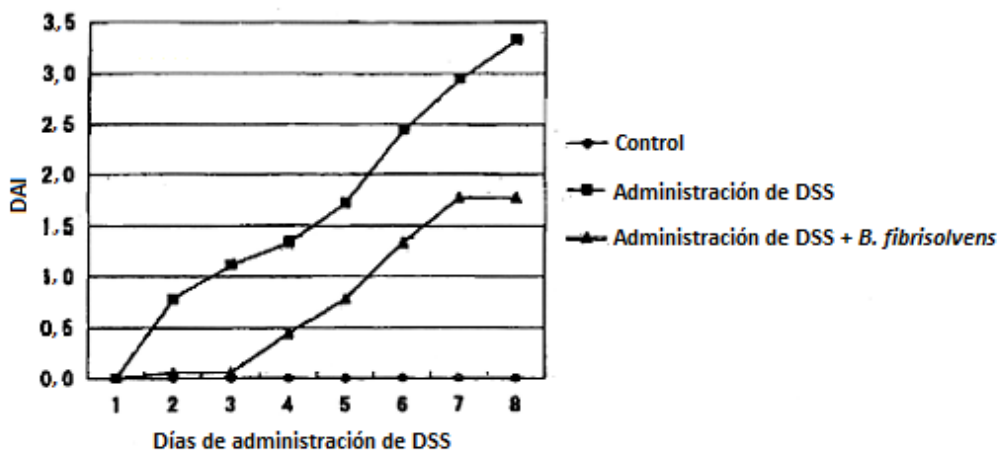


Fig.3

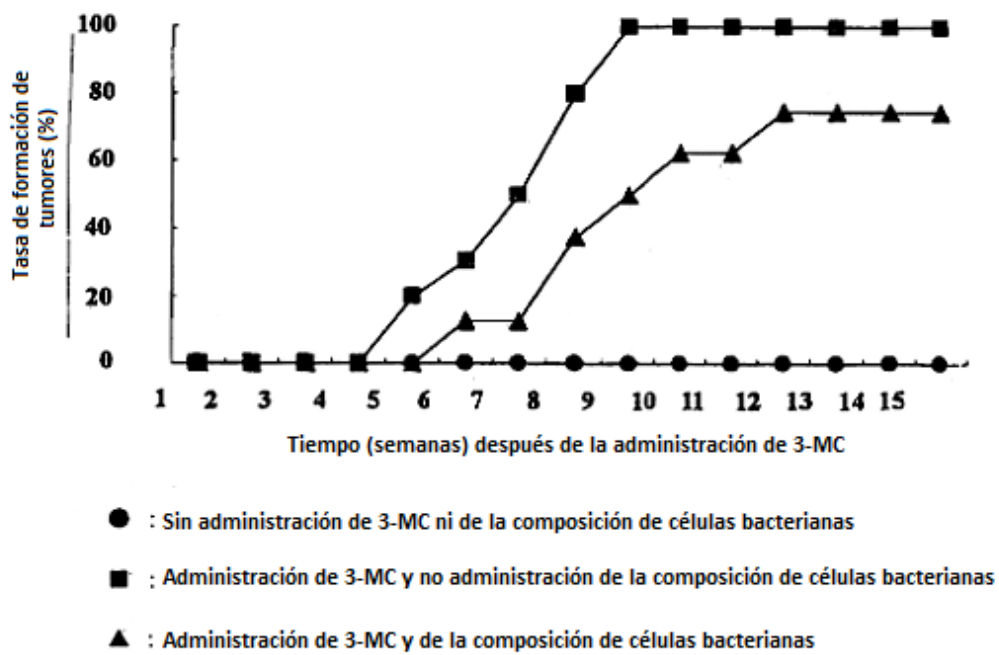


Fig. 4

