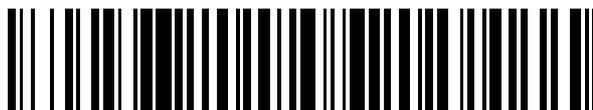


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 872**

51 Int. Cl.:

A23K 1/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2010 E 10708745 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2398338**

54 Título: **Método para aliviar problemas intestinales y cepas bacterianas novedosas para el mismo**

30 Prioridad:

23.02.2009 GB 0903016

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

16.01.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**VAN IMMERSEEL, FILIP;
PASMANS, FRANK;
DUCATELLE, RICHARD;
SAS, BENEDIKT;
EECKHAUT, VENESSA y
HAESBROUCK, FREDDY**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 526 872 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

Método para aliviar problemas intestinales y cepas bacterianas novedosas para el mismo

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a cepas bacterianas productoras de butirato relacionadas con la especie *Butyricoccus pullicaecorum* que van a usarse en la prevención y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal. La presente invención proporciona por tanto métodos y composiciones que superan los problemas asociados con los métodos usados actualmente para administrar ácido butírico en el tratamiento de problemas de salud intestinal en seres humanos y/o animales.

Antecedentes de la invención

10 La enfermedad inflamatoria del intestino (EII) se refiere a dos enfermedades crónicas que provocan inflamación de los intestinos: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Mientras que la colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria del intestino grueso que afecta a la mucosa del intestino que llega a inflamarse y desarrolla úlceras, la enfermedad de Crohn afecta de la manera más común a la última parte del intestino delgado, el íleon terminal, y partes del intestino grueso. Sin embargo, la enfermedad de Crohn no se limita a esas zonas y puede aparecer en cualquier parte del tracto digestivo. La enfermedad de Crohn provoca inflamación que se extiende de manera mucho más profunda en las capas de la pared intestinal de lo que lo hace la colitis ulcerosa. La enfermedad de Crohn generalmente tiende a implicar a toda la pared intestinal, mientras que la colitis ulcerosa afecta sólo al revestimiento del intestino.

20 La investigación médica no ha determinado aún qué provoca la enfermedad inflamatoria del intestino. Sin embargo, se cree que pueden estar implicados varios factores, tales como el entorno, la dieta y posiblemente la genética. El tratamiento farmacológico para EII consiste habitualmente en fármacos antiinflamatorios y agentes inmunosupresores. Sin embargo, la terapia actual para controlar EII no es siempre eficaz, y todavía son necesarias intervenciones quirúrgicas en muchos casos. Hoy en día, aproximadamente del 70 al 80% de los pacientes con enfermedad de Crohn y del 30 al 40% con colitis ulcerosa requieren en última instancia cirugía, indicando la falta de eficacia de los agentes terapéuticos usados actualmente.

25 Con respecto a los problemas de salud intestinal en animales tales como disbiosis, actualmente se usan antibióticos como tratamiento. Además una amplia variedad de aditivos alimenticios se encuentran en el mercado, incluyendo aceites esenciales, preparaciones de ácidos grasos, pre y probióticos, y combinaciones de productos de los que se reivindica que mejoran la salud del tracto gastrointestinal. Sin embargo, su uso es empírico y su eficacia no está probada científicamente.

30 Actualmente, se usa el ácido butírico en el tratamiento de EII, pero el suministro real de ácido butírico en el tracto gastrointestinal es problemático, se han propuesto ya varios mecanismos, incluyendo el uso de comprimidos recubiertos de butirato, enemas de butirato o el uso de la fermentación natural en el tracto gastrointestinal usando fibra de la dieta. Estos enfoques conocidos actualmente muestran inconvenientes significativos. Cuando se usan comprimidos recubiertos de ácido butírico, los problemas se encuentran en la liberación de su contenido en la ubicación pretendida y debido a las diferentes interindividuales en tiempo de tránsito y el pH de la luz del tracto gastrointestinal (Ibekwe *et al.*, 2006; Roda *et al.* 2007) no puede optimizarse la liberación. Además el gusto de los comprimidos es muy desagradable. Por otra parte, el uso de enemas rectales de ácido butírico está dificultado por una baja tasa de cumplimiento y una exposición corta y discontinua de la mucosa del colon al butirato (Breuer *et al.*, 1997). Cuando se usa la fermentación de fibra de la dieta para la producción de butirato, el uso de almidón resistente y oligofructosa se ha asociado con una mayor producción de butirato (Morrison *et al.* 2006). Sin embargo, la estimulación de la producción de butirato depende de la presencia de bacterias que expresan butiril CoA:acetil CoA transferasa y las diferencias regionales en bacterias que utilizan lactato, productoras de butirato (Morrison *et al.* 2006). Por tanto, este enfoque no es uniforme y no puede predecirse el desenlace. Para el tratamiento de disbiosis en animales en este momento, se usa una forma en polvo o la administración de ácido butírico recubierto al pienso. Sin embargo, esto da como resultado problemas similares a lo establecido anteriormente, teniendo adicionalmente un aspecto sensorial negativo que es desfavorable para los animales.

35 Otro enfoque para suministrar ácido butírico en el tracto gastrointestinal es la administración de bacterias productoras de ácido butírico, permitiendo la producción *in situ* de ácido butírico. A este respecto, Sokol *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA, 2008:16731) dan a conocer que la bacteria productora de butirato *Faecalibacterium prausnitzii* o sobrenadantes de cultivo de esta bacteria pueden disminuir la inflamación y necrosis en modelos de EII de roedores. El documento WO 2004/085628 da a conocer además que bacterias que utilizan ácido láctico que también producen ácido butírico, tal como la especie de bacteria *Anaerostipes caccae*, podría usarse en un método para tratar enfermedades asociadas con una alta dosificación de ácido láctico tales como EII.

55 Eekhaut *et al.* 2008 describieron recientemente el aislamiento de aislados bacterianos productores de butirato pertenecientes a la especie novedosa *Butyricoccus pullicaecorum*. Esta última especie novedosa tiene como cepa tipo el aislado 25-3¹ que se deposita ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *B. pullicaecorum* LMG24109.

La presente invención se refiere al hallazgo inesperado de que cepas productoras de butirato relacionadas con la especie *B. pullicaecorum* son superiores en su capacidad para prevenir o curar problemas de salud intestinal de seres humanos o animales en comparación con otras especies productoras de butirato tales como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes caccae* o *Anaerostipes butyricus*. Así, la presente invención se refiere al suministro de *B. pullicaecorum* que es mucho más eficaz que métodos de suministro comparables y también supera además todas las desventajas establecidas anteriormente.

La presente invención resuelve por tanto el problema de hallar compuestos y métodos más eficaces y efectivos para tratar problemas de salud intestinal en seres humanos o animales. La presente invención proporciona nuevas composiciones para la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal en seres humanos o animales.

10 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método novedoso e inventivo que supera los problemas asociados con los métodos usados actualmente para administrar ácido butírico en el tratamiento de problemas de salud intestinal en seres humanos y/o animales.

Se ha encontrado que determinadas cepas productoras de butirato según la presente invención pueden usarse como medicamento y, más específicamente, en la prevención y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal que se producen en seres humanos y/o animales. Las cepas productoras de butirato de la presente invención, cuando se administran a seres humanos y/o animales, pueden colonizar el tracto gastrointestinal. Esta colonización proporciona que las cepas productoras de butirato de la presente invención permitan la producción *in situ* de ácido butírico en el tracto gastrointestinal y más específicamente la colonización de y la producción *in situ* de ácido butírico en el colon.

El término "problema de salud intestinal" se refiere a cualquier enfermedad intestinal en seres humanos y/o animales y/pero se refiere específicamente a enfermedad inflamatoria del intestino en seres humanos y disbacteriosis en animales.

Las cepas productoras de butirato para su uso según la presente invención se refieren específicamente a una cepa aislada denominada *Butyricoccus pullicaecorum*, depositada ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *B. pullicaecorum* LMG 24109.

Según la invención, las cepas productoras de ácido butírico para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal de seres humanos y/o animales, son cepas del cluster IV de *Clostridium*.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a cepas productoras de ácido butírico para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal de seres humanos y/o animales, caracterizadas porque dichas cepas productoras de ácido butírico se eligen del grupo que comprende *Butyricoccus pullicaecorum*, depositadas ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *B. pullicaecorum* LMG 24109.

La presente invención también se refiere a una composición probiótica, en la que la composición comprende una cantidad eficaz terapéutica de la cepa bacteriana aislada tal como se definió anteriormente y/o un sobrenadante de cultivo de la misma que tiene un efecto terapéutico y/o un metabolito del mismo que tiene un efecto terapéutico.

Estos y otros aspectos y realizaciones se describen en las siguientes secciones y en las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, según un primer aspecto, a determinadas cepas bacterianas productoras de butirato para su uso como medicamento, y más específicamente, para su uso en la prevención y el tratamiento de trastornos de la salud intestinal en seres humanos y/o animales.

En efecto, la presente invención da a conocer que cepas productoras de butirato relacionadas con la especie *B. pullicaecorum* son superiores en su capacidad para prevenir o curar problemas de salud intestinal de seres humanos o animales en comparación con otras especies productoras de butirato tales como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Anaerostipes caccae* o *Anaerostipes butyricus*. Por ejemplo, la presente invención demuestra que el peso del colon, el índice del colon y el grado de ulceración (que reflejan todos la intensidad de la inflamación de la enfermedad), y/u otros parámetros bien conocidos de gravedad de enfermedad, se reducen significativamente cuando se tratan con *B. pullicaecorum* en comparación con un control positivo o en comparación con los tratamientos con las otras 3 especies bacterianas.

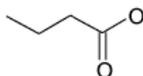
Otro aspecto de la presente invención se refiere a cepas productoras de butirato relacionadas con la especie *B. pullicaecorum* que son al menos comparables, y preferiblemente superiores a *Faecalibacterium prausnitzii* en su capacidad para prevenir o curar problemas de salud intestinal en seres humanos o animales.

El término un "medicamento", también denominado fármaco, medicina o medicación, puede definirse como cualquier sustancia química o composición de sustancias químicas pretendida para su uso en el diagnóstico, la cura, el tratamiento o la prevención médicos de la enfermedad. Dicho medicamento comprende al menos un principio biológicamente activo y posiblemente al menos un excipiente o portador que es la sustancia del comprimido o la

forma de dosificación del medicamento, o el líquido en que está suspendido el principio activo, y posiblemente otros materiales que son farmacéuticamente inertes. El experto conoce portadores, excipientes u otros materiales adecuados. El “medicamento” puede administrarse mediante cualquier método adecuado dentro del conocimiento del experto. La vía de administración preferida es la administración oral. Sin embargo, la dosificación y el modo de administración dependerán del individuo/animal.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “butirato” (siendo “butirato” una sal o un éster del “ácido butírico”) y “ácido butírico” se usan como sinónimos y se refieren a un ácido carboxílico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) con la fórmula estructural (I).

Fórmula (I)



Más preferiblemente, las cepas bacterianas productoras de butirato de la invención se refieren a cepas bacterianas que producen butirato como el metabolito principal.

Más preferiblemente, las cepas bacterianas productoras de butirato para su uso según la presente invención son *Butyricoccus pullicaecorum*. Se dan a conocer además en el presente documento las cepas bacterianas según la presente invención que muestran una homología de al menos el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de ARNr 16S de *B. pullicaecorum* caracterizada por SEQ ID No 1. Se dan a conocer además en el presente documento las cepas bacterianas según la presente invención que muestran una homología de al menos el 95%, el 96% o el 98% con la secuencia de ARNr 16S de *B. pullicaecorum* caracterizada por SEQ ID No 1. Preferiblemente las cepas bacterianas productoras de butirato pueden producir ácido butírico en condiciones sustancialmente anaerobias.

La cepa bacteriana productora de butirato *Butyricoccus pullicaecorum* pertenece al grupo filogenético de *Clostridium leptum* (= cluster IV de *Clostridium*).

El cluster IV de *Clostridium* contiene aislados de una mezcla de géneros, incluyendo *Clostridium*, *Eubacterium* y *Ruminococcus*. Varias especies son mesófilas y celulolíticas, incluyendo *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *C. cellulosi*. También están presentes cepas no celulolíticas, aunque muchas de éstas degradarán otros polisacáridos. Los miembros del cluster IV son fenotípicamente heterogéneos y presentan un amplio intervalo de contenido de G+C de ADN cromosómico.

En una realización preferida, la cepa productora de butirato proporcionada por la presente invención se refiere a una cepa de *Butyricoccus pullicaecorum* que se ha depositado ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *B. pullicaecorum* LMG24109 el 26 de abril de 2007. Esta cepa de *Butyricoccus pullicaecorum* depositada se caracteriza por una secuencia de ARNr 16S que tiene SEQ ID No 1. La cepa productora de ácido butírico *Butyricoccus pullicaecorum* también se ha depositado ante la Colección de Cultivos, Universidad de Göteborg (CCUG) como *B. pullicaecorum* CCUG 55265. Diferentes aislados de *B. pullicaecorum* y la cepa tipo 25-3^T se han caracterizado bien por Eeckhaut *et al.* 2008 (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: 2799) que se adjunta como referencia por el presente documento.

La secuencia de ARNr 16S de *B. pullicaecorum* (SEQ ID No 1) se proporciona en la tabla 1.

El contenido de GC de *B. pullicaecorum* es de aproximadamente el 54%. Además, las células de *B. pullicaecorum* tienen una forma cocoide. Las características bioquímicas de *B. pullicaecorum* se proporcionan en la tabla 2.

Se ha encontrado que las cepas productoras de butirato según la presente invención pueden usarse en la prevención y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal que se producen en seres humanos y/o animales. Las cepas productoras de butirato novedosas de la presente invención, cuando se administran a seres humanos y/o animales, pueden colonizar el tracto gastrointestinal. Esta colonización proporciona que las cepas productoras de butirato de la presente invención permiten la producción *in situ* de ácido butírico en el tracto gastrointestinal y más específicamente la colonización de y la producción *in situ* de ácido butírico en el colon. Al proporcionar estas cepas productoras de butirato, se superan las desventajas conocidas en la técnica anterior.

Este tipo de procedimiento de suministro es mucho más fácil, en comparación con los métodos conocidos, el ácido butírico se libera en la ubicación pretendida durante un periodo de tiempo prolongado y continuado. Adicionalmente, el procedimiento de la presente invención no depende de la presencia de microorganismos específicos en el tracto gastrointestinal. Además, los inventores han encontrado que se proporciona una producción de butirato significativa *in situ* mediante las bacterias productoras de ácido butírico colonizantes de la presente invención.

La presente invención proporciona por tanto un método que supera los problemas asociados con los métodos usados actualmente para administrar ácido butírico en el tratamiento de problemas de salud intestinal en seres

humanos y/o animales.

Tabla 1

Secuencia de ARNr 16S de <i>Butyricoccus pullicaecorum</i> (SEQ ID No 1)
tagttgatcctggctcaggatgaacgctggcggcgtgcctaacacatgcaagtcgaacggagttgtaggaaatccttcgggat ggaatctccaactagtggcggacgggtgagtaacgcgtgagcaatctgccttcagaggggataacagccggaacggctg ctaataccgcataatgcattgaattcgcatgtttgatgccaaagattttatcgctgaaagatgagctcgcgtctgattagctagtgg cgggtaacggcccaccaaggcgcagatcagtagccggactgagaggttgaacggccacattgggactgaggacacggccc agactcctaccgggaggcagcagtggggaatattgcgcaatgggggcaaccctgacgcagcaacgccgctgattgatgaag gtcttcggattgtaaaaaatcttaacagggagcaaaacaaatgacggtaacctgaagaataagctccggctaactcgtgccagca gcccggtaatacgtagggagcaagcgttatccggattactgggtgtaaagggcgtgtagcgggctgtaagttggaagtga atctcggggcctaaccggaactgcttcaaaactcgcgacttgatgagtgagagggcaggcgggaattcccaagttagcgggtg aaatgcgtagatattgggaggaaacaccagtgccgaaggcggcctgctggacattaactgacgctgaggcgcgaaagcgtggg gagcaaacaggattagatccctgtagtccacgcgtaaacgatggatactaggtgtgggaggtattgacccctcctgcccgg agttaacacaataagatccacctgggagtagcggccgcaaggtgaaactcaaagggaattgacgggggcccgcacaagca gtggagtagtggttaattcgaagcaacgcgcaagaacctaccagcttgacatcccgatgaccgctcyagagatagggtttt cttcggaacatcggtagcagggtgcatggtgtcgtcagctcgtgagatgttggttaagtcccgaacgagcgaacc cttacgggttagtctacgcaagagcactctagccgactgcaaaaacggaggaaggtggggacgactcaaatcat catgcccttatgacttgggtacacacgtactacaatggcagtcatacagaggggaagcaaaaaccgaggtggagcaaatcc ctaaaagctgtcccagttcagattgcaggctgcaactgcctgcatgaagtcggaattgctagtaatcgcggatcagcatgcccgg gtgaatacgtcccggcctgtacacaccgcccgtcacacatgagagccggaataaccggaagctcctagtctaaccgcaag gaggacgcggccgaaggtaggactggaattgggacgaagtcgt

Tabla 2

Características bioquímicas

B. pullicaecorum

urea	-
glucosa	+
manitol	-
lactosa	-
sacarosa	+
maltosa	+
salicina	+
xilosa	+
arabinosa	-
gelatina	-
esculina	+
glicerol	-
celobiosa	+
manosa	+
melezitosa	-
sorbitol	-
rafinosa	-
ramnosa	-
trehalosa	+

- 5 Tal como se da a conocer en el presente documento, las cepas productoras de butirato para su uso según la presente invención también se refieren a “cepas relacionadas con *Butyricoccus pullicaecorum*” que tiene una homología de más del 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de ARNr 16S tal como se representa en SEQ ID No 1. Preferiblemente, las cepas que tienen secuencias de ARNr 16S con una homología de más del 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de ARNr 16S de *Butyricoccus pullicaecorum* se aíslan de seres humanos.
- 10 En esta solicitud el término “sustancialmente anaerobio” tiene su significado habitual y se refiere a condiciones en las que existe poca o ninguna cantidad de oxígeno libre disponible. Con respecto a un entorno natural, se refiere a uno en el que existe poca o ninguna cantidad de oxígeno libre. A modo de ejemplo, las condiciones en el tracto gastrointestinal de animales y/o seres humanos pueden considerarse que son sustancialmente anaerobias. También se sabe que algunos procedimientos de fermentación artificial se llevan a cabo en un entorno anaerobio.
- 15 La presente divulgación se refiere además al uso de cepas productoras de ácido butírico para la fabricación de una preparación para la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal, caracterizado porque dichas cepas productoras de ácido butírico se eligen de *Butyricoccus pullicaecorum* depositada ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *B. pullicaecorum* LMG24109 y cepas que muestran una homología de al menos el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de ARNr 16S de *Butyricoccus pullicaecorum* caracterizada por SEQ ID No 1.
- 20

La presente divulgación también se refiere al uso de cepas productoras de ácido butírico para la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal, caracterizado porque dichas cepas productoras de ácido butírico se eligen de *Butyricoccus pullicaecorum* depositada ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *B. pullicaecorum* LMG24109 y cepas que muestran una homología de al menos el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de ARNr 16S de *Butyricoccus pullicaecorum* caracterizada por SEQ ID No 1. Un ejemplo para determinar esta última "homología" se describe, por ejemplo, por Eeckhaut *et al.* 2008 (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: 2799)

Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNr 16S" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 1542 nucleótidos que es un componente de la subunidad ribosómica procariota pequeña (30S). Se sabe que el ARNr 16S actúa como andamio que define las posiciones de las proteínas ribosómicas. La secuencia de ARNr 16S se usa comúnmente para estudios filogenéticos, ya que se sabe que es una secuencia altamente conservada. El análisis comparativo de secuencias de ARNr 16S de miles de organismos ha demostrado la presencia de secuencias distintivas de oligonucleótidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "homología" se refiere a la similitud de secuencia de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, en general, si dos ácidos nucleicos tienen secuencias idénticas, muestran una homología del 100%. Un cambio en la secuencia de nucleótidos de uno de los ácidos nucleicos reduce el porcentaje de homología. En general, el porcentaje de homología cuantifica el grado de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico.

En aún otra realización, la presente invención proporciona que los problemas de salud intestinal aparecen en seres humanos y/o animales en los que los problemas de salud intestinal son enfermedades inflamatorias del intestino tales como preferiblemente enfermedades inflamatorias del intestino tales como colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. En otra realización, los problemas de salud intestinal están asociados con la colonización por microorganismos patógenos del tracto gastrointestinal de seres humanos y/o animales. Preferiblemente los problemas de salud intestinal están provocados por *Clostridium perfringens* o *Clostridium difficile*.

En aún otra realización, la presente invención proporciona que el problema de salud intestinal en animales es disbacteriosis.

Disbacteriosis se refiere a una enteritis bacteriana inespecífica que provoca una inflamación del intestino delgado y/o una alteración de la flora normal del tracto gastrointestinal. Este estado se observa especialmente en pollos de engorde, preferiblemente con un crecimiento rápido, con buena ingesta de alimentos. Hasta ahora, sin embargo, no se encontró que fuese responsable ninguna bacteria individual.

En otra realización, la presente invención proporciona que las cepas productoras de ácido butírico para su uso según la presente invención están presentes en una composición que comprende una cantidad eficaz de dichas cepas productoras de ácido butírico. El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de bacterias que es suficientemente grande como para usarse eficazmente para prevenir, tratar o aliviar problemas de salud intestinal en seres humanos o animales.

La presente invención se refiere, en una realización preferida, a una composición y preferiblemente una composición probiótica, en la que la composición comprende una cantidad eficaz terapéutica de las cepas aisladas tal como se definió anteriormente según la presente invención y/o un sobrenadante de cultivo del mismo y/o un metabolito del mismo. Dicho "sobrenadante de cultivo del mismo" se refiere a los metabolitos que se secretan por las bacterias y que pueden usarse como medicamento tal como se reivindica para las propias bacterias. En otras palabras, dicho sobrenadante de cultivo puede usarse como medicamento, preferiblemente para prevenir, tratar o aliviar problemas de salud intestinal, tales como EII o disbacteriosis, de seres humanos o animales. El término "metabolito del mismo" se refiere a cualquier producto intermedio o producto final del metabolismo bacteriano (es decir, metabolitos tanto primarios como secundarios tales como proteínas, péptidos, ácidos grasos, pigmentos, antibióticos y similares...) y por tanto no está restringido a los metabolitos secretados como es el caso para el término "sobrenadante de cultivo" tal como se indicó anteriormente. Todos los metabolitos de la presente invención son metabolitos que pueden usarse como medicamento, preferiblemente para prevenir, tratar o aliviar problemas de salud intestinal, tales como EII o disbacteriosis, de seres humanos o animales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "composición probiótica" se refiere a una composición que comprende probióticos. Los probióticos son complementos de la dieta y microorganismos vivos que contienen levaduras o bacterias beneficiosas. Más específicamente, los probióticos se refieren a microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud al huésped. Las bacterias ácido-lácticas son el tipo más común de microorganismos usados. Las cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son las bacterias probióticas más ampliamente usadas. Los cultivos bacterianos probióticos ayudan a la flora del tracto gastrointestinal que se produce de manera natural en el organismo, para restablecer la misma.

B. pullicaecorum según la presente invención y/o cepas que muestran una homología de al menos el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de ARNr 16S de *B. pullicaecorum* caracterizada por SEQ ID No 1 se usan preferiblemente en una composición probiótica.

- En aún otra realización, la composición probiótica de la presente invención comprende cepas productoras de ácido butírico que van a usarse según la invención tal como se definió anteriormente junto con un portador comestible o una matriz farmacéutica. La invención también se refiere a una composición probiótica que comprende un sobrenadante de cultivo de dicha cepa y/o un metabolito de dichas cepas tal como se definió anteriormente junto con un portador comestible o una matriz farmacéutica. Preferiblemente, dichas cepas productoras de ácido butírico en esta composición probiótica se eligen de *Butyricoccus pullicaecorum*. Se da a conocer además una composición probiótica que comprende cepas que muestran una homología de al menos el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% con la secuencia de ARNr 16S de *Butyricoccus pullicaecorum* caracterizada por SEQ ID No 1.
- Según la presente invención, las cepas productoras de ácido butírico que van a usarse se incorporan en un portador que puede ser un alimento o un producto farmacéutico, tal como por ejemplo leche, yogur, cuajada, queso, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, helados, productos a base de cereales fermentados, polvos a base de leche o preparados para lactantes. El portador puede estar en forma de comprimidos, suspensiones bacterianas líquidas, complementos orales secados, complemento oral húmedo, alimentación seca para sonda o alimentación húmeda para sonda, etc. El portador también puede incluir otros compuestos que se sabe que son beneficiosos para una situación alterada del tracto gastrointestinal, por ejemplo, antioxidantes, tales como vitamina C, vitamina E, selenio o zinc. Dependiendo de la terapia preventiva respectiva, el experto en la técnica elegirá la forma galénica y/o los complementos apropiados, ayudando por tanto a mejorar la salud del individuo.
- En aún otra realización, la composición probiótica de la presente invención comprende además al menos una bacteria ácido-láctica seleccionada preferiblemente de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium breve*.
- Tal como se hace referencia en el presente documento, las bacterias ácido-lácticas comprenden generalmente bacilos o cocos Gram-positivos, con bajo contenido de GC, tolerantes a ácido, generalmente no esporulantes, sustancialmente anaerobios que están asociados por sus características metabólicas y fisiológicas comunes. Estas bacterias producen ácido láctico como el producto final metabólico principal de la fermentación de hidratos de carbono. Los géneros que comprenden las bacterias ácido-lácticas se eligen preferiblemente de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella* y *Lactobacillales*.
- En aún otra realización, la composición de la presente invención comprende adicionalmente sacáridos, preferiblemente oligo- y/o polisacáridos y más preferiblemente inulina y/o fructooligosacáridos.
- La adición de sustratos de sacáridos y/o bacterias ácido-lácticas a la composición supera los problemas asociados con una baja producción de butirato cuando las cepas productoras de ácido butírico colonizan el tracto gastrointestinal. La adición de sustratos de sacáridos tales como inulina y/o fructooligosacáridos y/o la adición de otras bacterias ácido-lácticas proporciona sustratos para las cepas productoras de ácido butírico de la invención.
- En otra realización preferida, la presente invención se refiere a una composición y preferiblemente una composición probiótica de la presente invención para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal de seres humanos y/o animales.
- Las cepas productoras de ácido butírico que van a usarse según la presente invención pueden prepararse mediante un método que comprende las etapas de:
- introducir una disolución de nutrientes en un recipiente de incubadora,
 - producir condiciones anaerobias,
 - esterilizar en autoclave dicho recipiente,
 - introducir un aceptor de electrones,
 - introducir un cultivo bacteriano de una cepa productora de butirato tal como se definió anteriormente,
 - mantener condiciones adecuadas para permitir el crecimiento y la proliferación de las bacterias; y
 - enfriar dicho recipiente y contenido hasta una temperatura que impida el crecimiento adicional de bacterias y sea adecuada para el almacenamiento del cultivo.
- Los aspectos y las realizaciones anteriores están respaldados además por los siguientes ejemplos no limitativos.
- Los presentes ejemplos demuestran cómo se aíslan las cepas productoras de ácido butírico y cómo estas cepas pueden usarse en la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Aislamiento de *Butyricoccus pullicaecorum*

Usando la siguiente estrategia, se aislaron cepas de *Butyricoccus pullicaecorum*:

Se aislaron las cepas del contenido cecal de un pollo de engorde de cuatro semanas de edad. Se sacrificó el pollo y se homogeneizó una muestra de contenido cecal en medio M2GSC anaerobio tal como se describe por Barcenilla *et al.* (2000). Se realizaron diluciones en serie de diez veces de esta suspensión y, a partir de cada dilución, se extendieron 0,3 ml sobre placas de agar que contenían medio M2GSC con agar al 1,5%. Se incubaron las placas a 42°C, que se asemeja a la temperatura corporal de las aves de corral, durante 48 h y se transfirieron colonias individuales a tubos con 10 ml de caldo M2GSC. Se realizaron todas las manipulaciones en una estación de trabajo anaerobia (Ruskinn Technology, Gales del Sur, R.U.). Se analizaron las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta en cultivos durante la noche usando cromatografía gas-líquido (GC14, Shimadzu, 's Hertogenbosch, Países Bajos). Se obtuvieron varios cultivos productores de butirato. El sobrenadante de estos cultivos bacterianos contenía cantidades sustanciales de ácido butírico.

Hasta la fecha se ha realizado (Rep)-PCR con cebadores que hibridan con elementos repetidos usando el cebador (GTG) 5 y tipificación de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) usando el cebador 5'-AGCGGGCCAA-3' tal como se describió previamente tras la extracción de DNA a través de un procedimiento de lisis alcalina. Los aislados proporcionaron huellas genéticas de ADN idénticas o prácticamente idénticas en ambos ensayos, sugiriendo que los aislados se originan a partir de una cepa individual que colonizó el tracto intestinal del pollo del que se tomaron muestras.

Para dilucidar la posición filogenética de los aislados, se determinaron secuencias casi completas de ARNr 16S (correspondientes a las posiciones 8-1541 en el sistema de numeración de *Escherichia coli*) para cada aislado usando los cebadores eubacterianos "universales" fD1 y rD1 (Weisburg *et al.*, 1991). En la tabla 1, se proporciona la secuencia de ARNr 16S. Se secuenciaron los amplicones purificados con cebadores pD, Gamma*, 3 y O* en un analizador genético ABI PRISM 310. Se encontró la coincidencia más exacta con las secuencias deducidas usando el programa FASTA. Se alinearon las secuencias de nucleótidos con secuencias de referencia de ARNr 16S usando el programa CLUSTAL_W y se construyó un árbol filogenético usando el método de vecinos más cercanos (*neighbour-joining*) mediante el paquete PHILIP usando DNADIST para el análisis de distancia.

La tabla 3 enumera los productos de fermentación producidos por las diferentes cepas, aislados del contenido cecal de un pollo de engorde, hechos crecer durante la noche en caldo M2GSC a 42°C. (Las concentraciones (mM) son las medias de tres repeticiones \pm desviación estándar).

Tabla 3

Aislado	Acetato	Propionato	Butirato
11-3	-10,6 \pm 4,3	-0,6 \pm 1,1	13,2 \pm 1,0
25-3	-14,3 \pm 1,7	-1,4 \pm 1,2	18,6 \pm 1,2
44-3	-14,6 \pm 3,5	-1,1 \pm 0,3	15,5 \pm 4,3
49-3	-12,4 \pm 0,70	-0,7 \pm 0,4	18,6 \pm 5,1
54-3	-11,8 \pm 5,9	-0,2 \pm 0,9	13,6 \pm 0,2

Entre sus parientes más cercanos están los miembros de *Eubacterium desmolans*. Todos los aislados comparten secuencias de ARNr 16S prácticamente idénticas (98-99%). En la tabla 1, se proporciona la secuencia de ARNr 16S.

EJEMPLO 2: Efecto de cepas productoras de ácido butírico sobre colitis

El presente ejemplo demuestra los efectos beneficiosos de composiciones que contienen cepas productoras de butirato tales como cepas de *Butyricoccus pullicaecorum*.

Se cultivaron todas las cepas en medio M2GSC, pH 6 a 41°C en condiciones anaerobias. Se centrifugaron los cultivos de 17 h a 4000 rpm, 15 min a 41°C. Se resuspendió el sedimento en HBSS, pH 6 complementado con clorhidrato de L-cisteína 1 mg/ml. Se determinó el número de ufc/ml de ambos cultivos mediante siembra en placa de diluciones de diez veces de la suspensión bacteriana sobre medio M2GSC.

Los dos primeros dos aislados bacterianos que se investigaron fueron: *Butyricoccus pullicaecorum* de la presente invención y *Anaerostipes butyraticus*, pertenecientes al cluster IV y XIVa de *Clostridium*, respectivamente. Se ha depositado la cepa de *Anaerostipes butyraticus* ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *A. butyraticus* LMG24724 el 3 de septiembre de 2008. Se sometieron a prueba estas dos cepas junto con *Faecalibacterium prausnitzii* y *Anaerostipes caccae*, aisladas de heces humanas y pertenecientes al cluster IV y XIVa de *Clostridium*, para determinar su capacidad para disminuir la inflamación y ulceración en un modelo de colitis inducida por TNBS en ratas. Se indujo colitis el día 7 mediante administración intrarrectal de 10 mg de TNBS en 400 μ l de etanol al

50%. Las ratas de los grupos 1 a 4 (n = 10) recibieron diariamente (desde el día 1 hasta el día 8), mediante sonda intragástrica, 10^9 ufc de *F. prausnitzii*, *B. pullicaecorum*, *A. caccae* y *A. butyraticus*, respectivamente. El grupo 5 era el grupo control negativo, mientras que el grupo 6 era el grupo control positivo tratado con TNBS no inoculado. Cuarenta y ocho horas tras la instilación de TNBS, se realizó la necropsia de las ratas. Se extirpó el colon, se cortó longitudinalmente y se enjuagó cuidadosamente para retirar residuos fecales. Se determinaron el peso y la longitud del colon así como la extensión de la lesión. Se usaron estos datos para calcular el índice del colon (razón de peso del colon frente a peso corporal, mg/g), el peso del colon (razón de peso del colon frente a longitud del colon, mg/cm) y la ulceración (razón de extensión del daño frente a longitud del colon, %), parámetros que reflejan la intensidad de la inflamación colónica. Se analizaron los parámetros usando el procedimiento GLM (Statistical Analysis Systems Institute, 1990) considerando un diseño aleatorizado completo con la cepa inoculada como variable explicativa principal. Se compararon las medias usando una prueba de la t protegida de Fisher, y las diferencias se consideraron significativas a $P < 0,05$ (tabla 4: Parámetros que reflejan la intensidad de la inflamación del colon expresados por las medias. Las medidas dentro de las filas sin superíndice común difieren significativamente ($P < 0,05$)). Se puntuaron las lesiones macroscópica y microscópicamente. Se tomaron muestras del tejido inflamado para la cuantificación de los niveles de $TNF\alpha$ e IL-12. La secreción de $TNF\alpha$ e IL-12 fue significativamente menor en el grupo que recibió la cepa de *B. pullicaecorum* en comparación con el grupo control con colitis. También queda claro a partir de la tabla que todos los parámetros fueron significativamente diferentes en el grupo que recibió *B. pullicaecorum* en comparación con el grupo control positivo.

Por tanto, queda claro que las cepas productoras de butirato relacionadas con *B. pullicaecorum* de la presente invención tienen un efecto beneficioso sobre la inflamación de la mucosa observada en colitis ulcerosa. Esta bacteria productora de butirato debe considerarse como el probiótico de siguiente generación con un modo de acción que está relacionado con la producción de ácido butírico.

Tabla 4

Parámetro	A. <i>butyraticus</i>	B. <i>pullicaecorum</i>	A. <i>caccae</i>	F. <i>prausnitzii</i>	Negativo	Positivo
Índice del colon (mg/g)	8,33 ^a	6,25 ^b	7,94 ^a	8,03 ^a	5,37 ^b	8,73 ^a
Peso del colon (mg/cm)	161,5 ^a	128,6 ^b	163,0 ^a	174,7 ^a	103,7 ^b	173,1 ^a
Ulceración (%)	12,3 ^a	3,19 ^b	9,85 ^a	11,2 ^a	0,00 ^b	15,2 ^a
Puntuación macroscópica	4,80 ^{ab}	1,80 ^c	4,40 ^b	4,70 ^{ab}	0,00 ^c	6,40 ^a
Puntuación histológica	14,1 ^{ab}	8,20 ^c	13,3 ^{ab}	12,0 ^b	0,80 ^d	15,2 ^a

EJEMPLO 3: Efecto de cepas productoras de ácido butírico sobre colitis inducida por DSS

Se obtienen treinta y cinco ratas Wistar macho de 4 semanas de CER Janvier (Francia) y se aclimatan a las condiciones del estudio durante un periodo de 14 días. Se dividen aleatoriamente los animales en 4 grupos experimentales y se alojan hasta cinco ratas por jaula. Todas tienen libre acceso a pienso en gránulos para ratas y agua a voluntad. En los grupos 1 y 2, se les administra a las ratas diariamente durante 14 días mediante sonda intragástrica, 0,5 ml con 10^8 - 10^9 ufc/ml de *Faecalibacterium prausnitzii* o *Butyricoccus pullicaecorum*. Se cultivan estas cepas en medio M2GSC, pH 6,8 a 38°C en condiciones anaerobias. Se centrifugan los cultivos de 20 h a 4000 rpm, 15 min a 38°C. Se resuspende el sedimento en HBSS, pH 6,8 complementado con clorhidrato de L-cisteína 1 mg/ml. Se determina el número de ufc/ml de ambos cultivos mediante siembra en placa de diluciones de diez veces de la suspensión bacteriana sobre medio M2GSC. Los grupos 3 y 4 son los grupos control y reciben diariamente HBSS, pH 6,8 complementado con clorhidrato de L-cisteína 1 mg/ml.

Una semana después de comenzar el experimento, se sustituye el agua potable normal por agua que contiene DSS al 4%. El grupo 4, el grupo sin colitis, recibe agua sin DSS.

Se registra diariamente el peso corporal de los animales, la presencia de sangre visible en las heces y la consistencia de las deposiciones. Se usan estos parámetros para calcular un índice de actividad de enfermedad (DAI) diario promedio para cada animal. Se sacrifican todas las ratas el día 7 tras comenzar el tratamiento con DSS. Se extrae el colon desde el ano hasta la unión cecocolónica, se corta longitudinalmente y se limpia ligeramente con agua para retirar los residuos fecales. Después de eso, se pesa el colon y se mide su longitud. Se toman muestras del colon para la cuantificación de la mieloperoxidasa y la tinción histológica. Se congelan el contenido luminal y raspados de la mucosa a -20°C para el análisis de la microbiota.

Los resultados de este experimento demuestran que las cepas productoras de butirato relacionadas con *B. pullicaecorum* de la presente invención tienen un efecto beneficioso sobre la inflamación de la mucosa.

Lista de secuencias

<110> Universiteit Gent

<120> Método para aliviar problemas intestinales y cepas bacterianas novedosas para el mismo

<130> UG-028-PCT

5 <150> GB 0903016.4

<151> 2009-02-23

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

10 <211> 1482

<212> ADN

<213> *Butyricoccus pullicaecorum*

<400> 1

```

tagtttgatc ctggctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taacacatgc aagtcgaacg      60
gagttgtttg aggaaatcct tcgggatgga atcttccaac ttagtggcgg acgggtgagt      120
aacgcgtgag caatctgcct ttcagagggg gataacagcc ggaaacggct gctaataccg      180
cataatgcat tgaattcgca tgtttttgat gccaaagatt ttatcgctga aagatgagct      240
cgcgtctgat tagctagttg gcggggtaac ggcccaccaa ggcgacgatc agtagccgga      300
ctgagagggt gaacggccac attgggactg aggacacggc ccgactcct accgggaggc      360
agcagtgggg aatattgcdc aatgggggca accctgacgc agcaacgccg cgtgattgat      420
gaaggctctc ggattgtaaa aatctttaat cagggacgaa acaaatgacg gtacctgaag      480
aataagctcc ggctaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtagggag caagcgttat      540
ccggatttac tgggtgtaaa gggcgtgtag gcgggcttgt aagttggaag tgaaatctcg      600
gggcttaacc ccgaaactgc tttcaaaact gcgagtcttg agtgatggag aggcaggcgg      660
aattcccagt gtagcgggta aatgcgtaga tattgggagg aacaccagtg gcgaaggcgg      720
cctgctggac attaactgac gctgaggcgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata      780
ccctggtagt ccacgccgta aacgatggat actagggtgtg ggaggattg accccttccg      840
tgccggagtt aacacaataa gtatcccacc tggggagtac ggccgcaagg ttgaaactca      900
aaggaattga cgggggcccc cacaagcagt ggagtatgtg gtttaattcg aagcaacgcg      960
caagaacctt accaagtctt gacatcccga tgaccgctcy agagataggg cttttcttcg     1020
gaacatcggg gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta     1080

```

ES 2 526 872 T3

agtccccgcaa cgagcgcaac ccttacgggt tagttgctac gcaagagcac tctagccgga	1140
ctgccggttga caaaacggag gaaggtgggg acgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac	1200
ttgggctaca cacgtactac aatggcagtc atacagaggg aagcaaaacc gcgaggtgga	1260
gcaaatccct aaaagctgtc ccagttcaga ttgcaggctg caactcgcct gcatgaagtc	1320
ggaattgcta gtaatcgcgg atcagcatgc cgcggtgaat acgttcccgg gccttgata	1380
caccgcccgt cacaccatga gagccggtaa taccgaagt ccgtagtcta accgcaagga	1440
ggacgcggcc gaaggtagga ctggtaattg ggacgaagtc gt	1482

REIVINDICACIONES

1. Cepa productora de ácido butírico para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal de seres humanos y/o animales, caracterizada porque la cepa productora de ácido butírico es *Butyricoccus pullicaecorum* depositada ante la colección bacteriana BCCM/LMG pública como *B. pullicaecorum* LMG24109, en la que los problemas de salud intestinal en seres humanos y/o animales son enfermedades inflamatorias del intestino elegidas de colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn, o en la que los problemas de salud intestinal están asociados con colonización por *Clostridium perfringens* o *Clostridium difficile* del tracto gastrointestinal de seres humanos y/o animales.
5
2. Composición probiótica para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de problemas de salud intestinal de seres humanos y/o animales, en la que los problemas de salud intestinal en seres humanos y/o animales son enfermedades inflamatorias del intestino elegidas de colitis ulcerosa y/o enfermedad de Crohn, o en la que los problemas de salud intestinal están asociados con colonización por *Clostridium perfringens* o *Clostridium difficile* del tracto gastrointestinal de seres humanos y/o animales, en la que dicha composición comprende una cantidad eficaz terapéutica de una cepa productora de ácido butírico según se ha definido en la reivindicación 1.
10
15
3. Composición probiótica para su uso según la reivindicación 2, en la que dicha composición comprende además al menos una bacteria ácido-láctica seleccionada preferiblemente de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium breve*.
20
4. Composición probiótica para su uso según la reivindicación 2 ó 3, en la que dicha composición comprende además inulina y/o fructooligosacáridos.