

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 978**

51 Int. Cl.:

A61K 31/22	(2006.01)
A61K 31/225	(2006.01)
A23K 20/105	(2006.01)
A23K 20/158	(2006.01)
A23K 50/70	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2016 PCT/SE2016/000012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16159853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2016 E 16773560 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3273797**

54 Título: **Composición que inhibe bacterias patógenas grampositivas**

30 Prioridad:

27.03.2015 SE 1500157

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

26.05.2020

73 Titular/es:

**PERSTORP AB (100.0%)
284 80 Perstorp, SE**

72 Inventor/es:

**VAN IMMERSEEL, FILIP;
VAN DRIESSCHE, KAROLIEN;
DUCATELLE, RICHARD y
SCHWARZER, CONRAD, GERARD**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 762 978 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

Composición que inhibe bacterias patógenas grampositivas

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a una composición de éster de glicerol que comprende el producto de reacción obtenido de la reacción del ácido valérico y el glicerol en una relación molar de entre 1: 0,8 y 1: 1,2, para su uso en la reducción y/o inhibición del crecimiento de bacterias patógenas grampositivas. También se refiere a dicha composición de éster de glicerol para su uso en la prevención y/o alivio de la enteritis necrótica en el tracto gástrico de galloanseraes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La tinción de Gram diferencia a las bacterias por las propiedades químicas y físicas de sus paredes celulares al detectar peptidoglucano, que está presente en una capa gruesa en bacterias grampositivas. En una prueba de tinción de Gram, las bacterias grampositivas retienen el colorante violeta cristalino, mientras que una contratinción (comúnmente safranina o fucsina) agregada después del violeta cristalino da a todas las bacterias gramnegativas un color rojo o rosa.

20 Entre las bacterias grampositivas se encuentran los géneros *Clostridium*, *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*, que son todos patógenos en humanos. El género *Clostridium* contiene alrededor de 100 especies que incluyen bacterias comunes de crecimiento libre, así como importantes patógenos.

25 Una de las especies de *Clostridium*, *Clostridium perfringens*, es un patógeno ubicuo que forma esporas y produce al menos 15 toxinas potentes diferentes que son responsables de enfermedades graves en humanos y animales (Popoff y Bouvet, 2009).

30 *C. perfringens* causa una amplia variedad de síntomas en humanos, desde intoxicación alimentaria hasta gangrena gaseosa, que es necrosis, putrefacción de tejidos y producción de gas. Los gases forman burbujas en el músculo (crepitación) y el olor característico en el tejido en descomposición. Después de una propagación local rápida y destructiva (que puede durar solo unas horas), la propagación sistémica de bacterias y toxinas bacterianas puede causar la muerte. Esto es un problema en traumas mayores y en contextos militares.

35 En general, se acepta que el toxinotipo A de *C. perfringens* es la causa de varias enfermedades diferentes en pollos de consumo, incluida la enteritis clínica necrótica, que se caracteriza por brotes de aumento de la mortalidad. Esta clásica forma clínica aguda de enteritis necrótica ha surgido en pollos de consumo en la Unión Europea tras la prohibición de los promotores de crecimiento antimicrobianos en el pienso animal en 2006 (Van Immerseel y col., 2009). Muchos animales mueren sin signos premonitorios y, en algunos casos, la mortalidad puede aumentar hasta un 50 % (Wijewanta y Senevirtna, 1971).

45 Sin embargo, el *Clostridium perfringens* también puede causar una infección no aparente o una enfermedad subclínica caracterizada por la presencia de pequeñas lesiones ulcerosas en la mucosa del intestino delgado. En general, se acepta que estas lesiones del intestino delgado conducen a una mala digestión y absorción. Además, se pueden encontrar lesiones hepáticas multifocales durante la inspección de la carne en el matadero. Estos focos rojos o blancos se deben a la colonización del hígado por un alto número de *C. perfringens*, lo que resulta en colangiohepatitis multifocal (Kaldhusdahl y Hofshagen, 1992).

50 Todas estas lesiones dan como resultado un aumento de peso reducido y una mayor relación de conversión alimenticia (Kaldhusdahl y col., 2001). La relación de conversión alimenticia se define como la relación entre la entrada de masa de alimentación y la salida de masa corporal. El impacto económico de la enteritis necrótica subclínica se considera mucho más importante que el de la enteritis necrótica clínica. Se ha sugerido que la enteritis necrótica subclínica ocurriría en el 20 % de los pollos de consumo. Esto da como resultado un aumento en la tasa de conversión alimenticia del 10,9 %, con un grave impacto económico.

55 En todo el mundo, la enteritis necrótica es probablemente una de las enfermedades entéricas más extendidas en las aves de corral, con considerables consecuencias para el desempeño de las parvadas afectadas. Puede presentarse como un aumento repentino de la mortalidad o como una enfermedad subclínica insidiosa. El signo de enteritis necrótica es la presencia de lesiones necróticas en la mucosa del intestino delgado. El diagnóstico de enteritis necrótica se realiza en la necropsia.

60 Además de causar problemas de salud graves entre los animales afectados y grandes pérdidas económicas, los patógenos como *Clostridium perfringens* también se pueden propagar de los animales infectados a los humanos. Las personas que manejan estos animales o los consumidores de los animales o productos animales corren el riesgo de infectarse y, como se describió anteriormente, desarrollar enfermedades graves.

65

El problema emergente con resistencia a los antimicrobianos resultó en la prohibición de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea en 2006. Esto requiere nuevos procedimientos alternativos para contrarrestar las bacterias patógenas tanto en humanos como en animales.

5 Es bien sabido en la técnica que diversos ácidos grasos de cadena corta, así como sus respectivos monoésteres de glicerol tienen propiedades antibacterianas. Hay varios beneficios asociados con la distribución de los ácidos grasos de cadena corta como ésteres de glicerol. Los ésteres de glicerol son menos corrosivos que los ácidos libres correspondientes, lo que facilita la manipulación y el transporte de los productos. Algunos de los ácidos grasos de cadena corta como, por ejemplo, el ácido butírico y el ácido valérico, tienen un olor muy desagradable.
10 Los correspondientes ésteres de glicerol de estos ácidos son más o menos inodoros. Además, los ésteres de glicerol se unen a los ácidos grasos de cadena corta, lo que les permite llegar más abajo en el tracto gastrointestinal de un humano o un animal antes de ser adsorbidos en el torrente sanguíneo.

15 Se han publicado muchos estudios sobre el uso de ésteres de glicerol de ácido propiónico y ácido butírico como agentes antibacterianos. Sin embargo, no se ha descrito la acción antibacteriana específica del monovalerato de glicerilo.

20 La presente invención muestra que el monovalerato de glicerol es mucho más efectivo que el monopropionato de glicerilo o el monobutirato de glicerilo para reducir y/o inhibir la bacteria grampositiva *Clostridium perfringens in vitro*. La acción antibacteriana del monovalerato de glicerilo contra *Clostridium perfringens* se confirma en un estudio *in vivo* en pollos de consumo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 La presente invención se refiere a una composición de éster de glicerol que comprende el producto de reacción obtenido de la reacción del ácido valérico y el glicerol en una relación molar de entre 1: 0,8 y 1: 1,2, para su uso en la reducción y/o inhibición del crecimiento de bacterias patógenas grampositivas. En el contexto de la presente invención, debe entenderse que los patógenos causan enfermedades clínicas o subclínicas en una amplia variedad de especies como, por ejemplo, en galloanseraes y/o en humanos. Las bacterias patógenas grampositivas cuyo
30 crecimiento es reducido y/o inhibido por la composición de éster de glicerol de acuerdo con la presente invención pueden, por ejemplo, ser del género *Clostridium*, *Listeria* y/o *Bacillus*. En particular, el crecimiento de la bacteria grampositiva *Clostridium perfringens* se reduce y/o inhibe mediante el uso de dicha composición de éster de glicerol.

35 La presente invención también se refiere a una composición de éster de glicerol que comprende el producto de reacción obtenido a partir de la reacción del ácido valérico y el glicerol en una relación molar de entre 1: 0,8 y 1: 1,2, para su uso en la prevención y/o alivio de la enteritis necrótica en el tracto gástrico de galloanseraes, como pollos o pavos.

40 De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición de éster de glicerol comprende al menos 30 % en peso de monovalerato de glicerilo, menos de 20 % en peso de divalderato de glicerilo y menos de 5 % en peso de trivalerato de glicerilo.

45 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la composición de éster de glicerol comprende al menos 40 % en peso de monovalerato de glicerilo, menos de 15 % en peso de divalderato de glicerilo y menos de 2 % en peso de trivalerato de glicerilo.

50 El ácido valérico libre tiene un olor desagradable, lo que causa problemas de manejo. Estos problemas pueden evitarse distribuyendo el ácido valérico en forma de ésteres de glicerol. De acuerdo con una realización de la presente invención, la cantidad de ácido valérico libre en la composición de éster de glicerol es inferior al 0,5 % en peso, preferentemente inferior al 0,1 % en peso. Mantener baja la cantidad de ácido valérico libre también asegura que el pH en la composición de éster de glicerol se mantenga a un nivel en el que el éster de glicerol no se hidrolice en glicerol y ácido libre, manteniéndose así el producto estable.

55 De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición de éster de glicerol se adsorbe en un portador inerte, tal como un portador de sílice. Esto permite que la composición se distribuya como un producto seco. Dicho portador de sílice comprende preferentemente partículas de sílice porosas con un tamaño medio de partícula de 20 a 70 µm. De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición de éster de glicerol se adsorbe en partículas de sílice en una relación en peso de 50 a 80 % de éster de glicerol y de 20 a 50
60 % de partículas de sílice. La distribución de la composición de éster de glicerol adsorbida en un portador de sílice contribuye a mantener baja la cantidad de agua en la composición y, por lo tanto, inhibe la hidrolización del éster de glicerol en glicerol y ácido libre. El producto se mantiene más estable y se minimizan los problemas de olor asociados con el ácido valérico libre.

65 La composición de éster de glicerol de acuerdo con la presente invención se puede agregar a cualquier alimento comercialmente disponible para galloanseraes. La composición de éster de glicerol puede incorporarse

directamente en piensos disponibles comercialmente o alimentarse de forma complementaria a los piensos disponibles comercialmente. La composición de éster de glicerol de acuerdo con la presente invención también se puede agregar al agua potable.

- 5 De acuerdo con una realización de la presente invención, la cantidad de composición de éster de glicerol alimentada a los galloanseraes es de 0,01 a 1,0 % en peso y preferentemente de 0,05 a 0,7 % en peso de la ración de alimentación diaria de los galloanseraes.

REALIZACIONES EJEMPLARES

10 Ejemplo 1: Experimento *in vitro* sobre el efecto antimicrobiano de algunos ácidos grasos de cadena corta y sus respectivos monoglicéridos sobre *Clostridia perfringens*.

15 Se determinaron los valores de CMI (concentración mínima inhibitoria) en relación con *Clostridia perfringens* para el ácido valérico, el ácido propiónico y el ácido butírico, así como para los monoésteres de glicerol correspondientes de estos ácidos. Los resultados se pueden ver en la Tabla 1 a continuación.

Clostridia perfringens	CMI (mmol)
Ácido valérico	15
Ácido propiónico	62
Ácido butírico	62
Monovalerato de glicerilo	15
Monopropionato de glicerilo	250
Monobutirato de glicerilo	125

Tabla 1.

20 Se puede ver en la Tabla 1 que el ácido valérico es más efectivo contra *Clostridium perfringens* que el ácido propiónico o el ácido butírico. Es una observación muy interesante el hecho de que la baja concentración inhibitoria de ácido valérico necesaria contra *Clostridium perfringens* se retiene también cuando se usa el monoéster de ácido valérico. En el caso del ácido propiónico, la CMI es cuatro veces mayor para el monoéster en comparación con el ácido libre. Con el ácido butírico, la CMI se duplica para el monoéster en comparación con el ácido libre. Esto hace que el monovalerato de glicerilo sea una excelente alternativa para reducir y/o inhibir bacterias grampositivas como *Clostridium perfringens*.

25 Ejemplo 2: Experimento *in vivo*: Uso de monovalerato de glicerilo para controlar la enteritis necrótica inducida por *Clostridium perfringens* en pollo de consumo

30 Se investigó el efecto del monovalerato de glicerilo sobre la enteritis necrótica inducida por *Clostridia perfringens* en pollos de consumo.

35 Cepas bacterianas y vacunas

La cepa de provocación utilizada en los ensayos *in vivo*, *C. perfringens*, se aisló del intestino de un pollo de consumo con lesiones necróticas de una parvada con problemas de aumento de peso. La cepa se clasificó como una cepa de tipo A (netB positiva, beta-2 y enterotoxina negativa).

40 Para la inoculación, la cepa se cultivó durante 12 (un día) o 6 h en caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra).

45 Se utilizó en este estudio una dosis diez veces mayor de la vacuna anticoccidial Paracox® - 5 (Schering-Plough Animal Health, Bruselas, Bélgica), que contiene ovoquistes vivos y atenuados de *Eimeria (E.) acervulina*, *E. maxima* (dos líneas), *E. mitis* y *E. tenella*.

La vacuna Nobilis Gumboro D 78 (Schering-Plough Animal Health, Bruselas, Bélgica) se administró en el agua potable.

50 Animales y explotación

55 En este experimento, 132 pollos de consumo Ross 308 de un día de edad de sexo mixto, de un criadero comercial, se dividieron en jaulas de 2 m², 33 aves por grupo de tratamiento. Antes del ensayo, todas las salas se descontaminaron con Metatectyl® (Clim'oMedic) y con un desinfectante anticoccidial comercial (Bi-OO-cyst®; Biolink Ltd, York, Reino Unido). Las aves recibieron agua potable y alimento a voluntad. Se aplicó un programa de

luz y oscuridad de 23 h/1 h.

Diseño de estudio experimental:

5 Los primeros 7 días, los pollos fueron alimentados con una dieta inicial y desde el día 8 hasta el 15, una dieta de engorde. Tanto la dieta inicial como la dieta de engorde fueron una dieta basada en trigo/centeno (43 %/7,5 %), con harina de soja como fuente de proteínas. Desde el día 17 en adelante, se utilizó la misma dieta con la excepción de que la harina de pescado (30 %) se utilizó como fuente de proteínas. La alimentación fue proporcionada por el Instituto de Investigación Agrícola y Pesquera (ILVO). Los productos probados se mezclaron en el pienso. La vacuna Gumboro se administró en el agua potable el día 16 en todos los grupos. Todos los grupos se expusieron por vía oral tres veces al día (8:00 h; 14:00 h, 20:00 h) con aproximadamente $5 \cdot 10^8$ ufc de cepa de *C. perfringens* 56 en los días 17, 18, 19 y 20. En el día 18, todas las aves fueron inoculadas por vía oral con una dosis diez veces mayor de Paracox-5™. En el día 21, todos los animales fueron sacrificados por inyección intravenosa de pentobarbital sódico.

Modelo:

	d16	d17	d18	d19	d20	d21
Gumboro	x					
Pienso + harina de pescado		x	x	x	x	x
Inoculación de <i>C. perfringens</i> (8-14-20)		x	x	x	x	
Paracox® x 10			x			
Puntuación						x

Tabla 2. Calendario para el estudio in vivo.

Productos probados:

- Grupo 1: control negativo (sin exposición con *C. perfringens*)
- Grupo 2: control positivo
- Grupo 3: monovalerato de glicerilo en la concentración más baja (adsorbido sobre un portador de sílice)
- Grupo 4: monovalerato de glicerilo a la concentración más alta (adsorbido sobre un portador de sílice)

Se agregó monovalerato de glicerilo al pienso en dos series de concentración diferentes que se muestran en la Tabla 3 a continuación:

	Monovalerato de glicerilo, sobre portador de sílice de baja concentración	Monovalerato de glicerilo, sobre portador de sílice de alta concentración
Semana 1	2,5	5
Semana 2	2	2,5
Semana 3	1,5	2

Tabla 3. Concentraciones de productos agregados al pienso (kg/ton)

Las lesiones intestinales en el intestino delgado (duodeno a íleon) se calificaron con anonimato de la siguiente manera:

- 0: sin lesiones graves
- 1: mucosa intestinal congestionada
- 2: necrosis focal pequeña o ulceración (1-5 focos)
- 3: necrosis focal o ulceración (5-16 focos)
- 4: necrosis focal o ulceración (16 o más focos)

5: parches de necrosis de 2 a 3 cm de largo

6: necrosis difusa típica de casos de campo

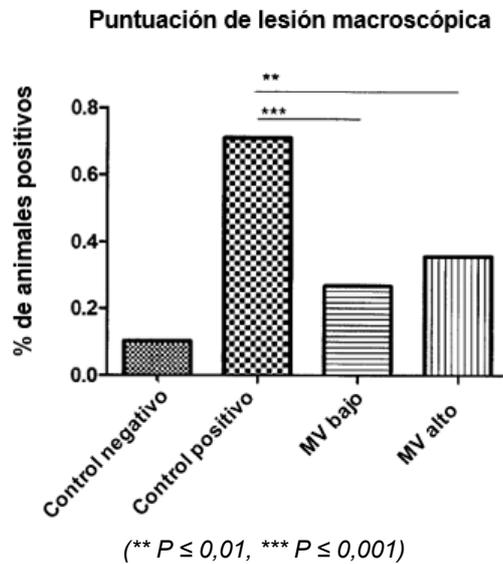
5 Las puntuaciones de lesiones de 2 o más se clasificaron como positivas para enteritis necrótica

Análisis estadístico

10 El software GraphPad Prism, Inc se utilizó para determinar si había diferencias significativas entre los grupos. La significación estadística se determinó a un valor de $P < 0,05$.

Resultados

15 La figura 1 a continuación muestra los porcentajes de aves en cada grupo con puntuación de lesión macroscópica ≥ 2 .



20 *Figura 1. Porcentaje de pollos positivos (con puntuación de lesión macroscópica ≥ 2).*

25 El monovalerato de glicerilo en la concentración más baja dio los mejores resultados con el 27 % de los animales del grupo diagnosticados como positivos para enteritis necrótica. Esta es una mejora significativa en comparación con el grupo de control positivo (no se agregó monovalerato de glicerilo al pienso), donde el 71 % de los animales fueron diagnosticados como positivos para enteritis necrótica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de éster de glicerol que comprende el producto de reacción obtenido de la reacción de ácido valérico y glicerol en una relación molar de entre 1: 0,8 y 1: 1,2, para su uso en la reducción y/o inhibición del crecimiento de bacterias patógenas grampositivas.
2. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas bacterias patógenas grampositivas comprenden bacterias del género *Clostridia*.
- 10 3. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichas bacterias patógenas grampositivas comprenden bacterias de la especie *Clostridium perfringens*.
- 15 4. Una composición de éster de glicerol que comprende el producto de reacción obtenido de la reacción de ácido valérico y glicerol en una relación molar de entre 1: 0,8 y 1: 1,2, para su uso en la prevención y/o alivio de la enteritis necrótica en el tracto gástrico de galloanseraes.
- 20 5. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que la enteritis necrótica es causada por *Clostridium perfringens*.
6. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en la que dichos galloanseraes son galliformes, como el pollo, el pavo, el urogallo o el faisán.
- 25 7. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en la que dichos galloanseraes son anseriformes, como los patos, los gansos o los cisnes.
8. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos 30 % en peso de monoaléster de glicerilo, menos de 20 % en peso de dialéster de glicerilo y menos de 5 % en peso de trialéster de glicerilo.
- 30 9. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos 40 % en peso de monoaléster de glicerilo, menos de 15 % en peso de dialéster de glicerilo y menos de 2 % en peso de trialéster de glicerilo.
- 35 10. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la cantidad de ácido valérico libre en dicha composición de éster de glicerol está por debajo del 0,5 % en peso.
- 40 11. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la cantidad de ácido valérico libre en dicha composición de éster de glicerol está por debajo del 0,1 % en peso.
- 45 12. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en la que dicha composición de éster de glicerol se alimenta a dichos galloanseraes en una cantidad entre 0,01 y 1,0 % en peso de la ración de alimentación diaria de los galloanseraes.
- 50 13. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en la que dicha composición de éster de glicerol se alimenta a dichos galloanseraes en una cantidad entre 0,05 y 0,7 % en peso de la ración de alimentación diaria de los galloanseraes.
14. Una composición de éster de glicerol para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que dicha composición de éster de glicerol se adsorbe sobre un portador, tal como un portador de sílice, permitiendo así que dicha composición de éster de glicerol se distribuya como un producto seco.