

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 874**

21 Número de solicitud: 201831166

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/741 (2015.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

30.11.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.06.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

27.08.2020

Fecha de concesión:

05.10.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.10.2020

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SANZ HERRANZ, Yolanda;
LÓPEZ ALMELA, Inmaculada;
GÓMEZ DEL PULGAR VILLANUEVA, Eva M^a;
BENITEZ-PÁEZ, Alfonso y
ROMANI PÉREZ, Marina**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

54 Título: **PHASCOLARCTOBACTERIUM FAECIUM PARA SU USO EN LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD Y SUS COMORBILIDADES**

57 Resumen:

Phascolarctobacterium faecium para su uso en la prevención y tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades.

La presente invención se refiere a la cepa *P. faecium* DSM 32890, a sus composiciones y/o a cualquiera de sus combinaciones y a su uso para regular el apetito, y para el tratamiento y/o la prevención del sobrepeso y/o la obesidad, y alteraciones metabólicas e inmunológicas asociadas; en concreto, la hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, la resistencia insulínica, la dislipemia (hipertriglicendemia, hipercolesterolemia), el síndrome metabólico, la diabetes, y la inflamación intestinal y/o de tejidos periféricos.

ES 2 763 874 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Phascolarctobacterium faecium para su uso en la prevención y tratamiento de la obesidad y sus comorbilidades

5

La presente invención se encuadra dentro del campo farmacéutico y alimentario. En concreto, la presente invención se refiere a la cepa con número de depósito DSM 32890, a sus composiciones y/o a cualquiera de sus combinaciones. Particularmente se refiere al uso de la cepa *P. faecium* DSM 32890 para regular el apetito, y para el

10 tratamiento y/o la prevención del sobrepeso y/o la obesidad, y alteraciones metabólicas e inmunológicas asociadas; en concreto, la, hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, la resistencia insulínica, la dislipemia (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia), el síndrome metabólico, la diabetes, esteatosis hepática, enfermedades cardiovasculares, y la inflamación intestinal y/o de tejidos periféricos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La obesidad constituye uno de los mayores problemas de salud pública debido a su alta prevalencia y comorbilidades, que reducen enormemente la calidad de vida y

20 aumentan el riesgo de mortalidad. Entre éstas se incluyen por ejemplo la dislipemia, el síndrome metabólico, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis, la esteatosis hepática o hígado graso y la hipertensión, así como alteraciones del comportamiento alimentario.

25 La obesidad se produce como consecuencia de un desequilibrio prolongado, entre la ingesta y el gasto energético que conlleva aumento del peso y la grasa corporal. El balance energético está regulado por sistemas neuroendocrinos de control a largo y corto plazo. Las hormonas claves en el control a largo plazo son la insulina y la leptina. La insulina es la hormona más importante en la captación de la glucosa y la regulación

30 del buen funcionamiento del tejido adiposo y la acumulación de triglicéridos en el mismo. En el tejido adiposo normal, sensible a la insulina, el almacenamiento de grasa se produce aquí, como respuesta a la insulina y otras hormonas (leptina), mediante la estimulación de la lipoproteín lipasa e inhibición de la lipólisis. Sin embargo, el acúmulo excesivo de ácidos grasos en el tejido adiposo asociado a la obesidad reduce

la sensibilidad a la insulina, lo que promueve el acúmulo de ácidos grasos libres en forma de triglicéridos en otros órganos y tejidos (hígado, músculo, etc.), y causa alteraciones en la producción o sensibilidad a la leptina, y el aumento de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, lo que conlleva a su vez mayor riesgo de desarrollo de enfermedades asociadas (síndrome metabólico, diabetes, enfermedades cardiovasculares, etc.). La leptina es una hormona/adipoquina sintetizada principalmente por el tejido adiposo, en función de las reservas de energía y en respuesta a la insulina. La leptina regula la homeostasis energética, actuando a nivel del sistema nervioso central y periférico, disminuyendo la ingesta de energía y aumentando el gasto energético. No obstante, en sujetos obesos las concentraciones periféricas de leptina son anormalmente elevadas y se produce una resistencia a la misma y falta de funcionalidad. Entre los sistemas de control a corto plazo están las hormonas intestinales que son claves para el control de la ingesta en cada comida y el metabolismo energético en diversos tejidos. Estas hormonas son liberadas por las células enteroendocrinas (EEC) en respuesta a los nutrientes y metabolitos de nutrientes, que llegan al lumen intestinal donde son detectados por receptores específicos (por ejemplo: receptores acoplados a proteínas G). Entre estas hormonas destacan la coleocistoquinina (CCK) secretada por las células I, principalmente localizadas en el intestino proximal, y el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y el péptido YY (PYY) secretados por las células L, presentes principalmente en la región distal del intestino. Una vez liberadas, las hormonas intestinales no sólo ejercen un efecto directo en los órganos distales (hígado, tejido adiposo blanco y marrón) que permite controlar el metabolismo energético, sino que también actúan como mediadoras del control central del metabolismo y del comportamiento alimentario por las vías neural y endocrina a través del eje intestino-cerebro. Entre las hormonas mencionadas destaca el GLP-1 que suprime el apetito a nivel del hipotálamo e induce saciedad, reduciendo así la ingesta de alimentos; mejora el metabolismo de glucosa, al inducir la secreción de insulina en el páncreas y reducir la síntesis de glucagón; aumenta el gasto energético; y contribuye a la reducción del peso corporal, la esteatosis hepática y el riesgo de desarrollar diabetes y patologías cardiovasculares. El PYY es más estable que el GLP1 e, igualmente, actúa induciendo saciedad y contribuyendo así a la reducción de la ingesta y del peso corporal. También reduce el consumo excesivo de alimentos mediante la activación de la proopiomelanocortina (POMC) e inhibición del neuropéptido Y (NPY) en el sistema nervioso central. Sin

embargo, el consumo excesivo de alimentos densos en energía altera la síntesis de hormonas enteroendocrinas y su funcionalidad, lo que da lugar a un aumento de la ingesta y una alteración del metabolismo energético periférico, agravando el fenotipo de obesidad.

5

La obesidad está frecuentemente asociada a un estado de inflamación crónica de bajo grado, implicado en las complicaciones metabólicas, como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y el hígado graso. La inflamación del tejido adiposo blanco se considera un factor causal de estas alteraciones metabólicas y está
10 caracterizado por un aumento general de células pro-inflamatorias del sistema inmunitario como los macrófagos M1 (clásicamente activados) y los linfocitos Th1 productores de $IFN\gamma$, T CD8+ y B. Por el contrario, se observa una reducción de macrófagos M2 anti-inflamatorios, linfocitos Th2, células linfoides innatas de tipo 2 (ILC2s) y, frecuentemente, células T reguladoras (Tregs), que controlarían la
15 inflamación. El tejido adiposo se ha considerado el principal contribuyente a la inflamación y disfunción metabólica durante la obesidad, pero ahora se sabe que este fenómeno afecta a múltiples órganos, incluyendo el cerebro, los músculos, el hígado, el páncreas y el intestino. Las evidencias más recientes sugieren que el sistema inmunológico asociado al intestino y los microorganismos que lo colonizan y
20 predominan, como consecuencia de la exposición a dietas hipercalóricas y poco saludables, contribuyen a la inflamación metabólica asociada a la obesidad y que el intestino puede ser el origen de la inflamación metabólica.

Entre los factores implicados en la obesidad, especialmente los cambios en el estilo de
25 vida que conllevan un aumento de la ingesta de alimentos de alta densidad energética y la reducción de la actividad física y, por tanto, del gasto energético, se consideran los principales causantes de la epidemia de la obesidad. Las estrategias preventivas y terapéuticas basadas en dietas hipocalóricas y aumento de la actividad física representan la primera opción en el manejo de la obesidad y sus complicaciones, pero
30 suelen tener una efectividad limitada a largo plazo. Por ello, se requiere de alternativas coadyuvantes a los cambios en el estilo de vida, que permitan mejorar su eficacia. Por otro lado, las estrategias farmacológicas, incluidas las basadas por ejemplo en agonistas del receptor del GPL-1, presentan efectos secundarios en parte debido a que se consumen de forma continuada al utilizarse para tratar patologías crónicas.

Además, su efectividad es limitada debido a que están basadas en una única diana terapéutica, sin abordar la complejidad de mecanismos que contribuyen a la obesidad y sus complicaciones.

5 La obesidad y sus comorbilidades (diabetes tipo 2, dislipidemia, enfermedad cardiovascular, hígado graso, síndrome metabólico, etc.) se han asociado a alteraciones en la composición y funciones de la microbiota intestinal en estudios observacionales en humanos, sugiriendo que la microbiota intestinal podría desempeñar una función relevante en estos trastornos. Esta hipótesis se ha
10 confirmado mediante la transferencia de la microbiota de individuos enfermos o sanos a nuevos sujetos y observando que estos últimos adquirían el fenotipo del donante. Estos experimentos confirman que dichas alteraciones de la microbiota, en parte debidas a las dietas hipercalóricas, contribuyen al desarrollo de la obesidad y sus complicaciones metabólicas. Esta evidencia ha dado lugar al desarrollo de estrategias de intervención sobre el ecosistema intestinal, como el uso de probióticos, como
15 alternativa para mejorar el tratamiento y prevención de la obesidad. Los productos inicialmente desarrollados se han basado en cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, debido a su historia de uso seguro en alimentación. En la actualidad se sabe, no obstante, que otras bacterias presentes de
20 forma natural en mayor proporción en el intestino humano y relacionadas con un fenotipo delgado, podrían ser alternativas más eficaces. A diferencia de las estrategias farmacológicas, el uso de bacterias intestinales comensales tendrían la ventaja de poder actuar a través de diversos mecanismos de acción, regulando tanto el sistema endocrino como inmunitario y, a priori, sin causar efectos adversos. En relación a las
25 posibles propiedades beneficiosas del género *Phascolarctobacterium*, un estudio en ratas publicó que tratamientos farmacológicos utilizados para la diabetes (berberina y metformina) modificaban la microbiota y provocaban aumentos en diferentes grupos bacterianos (*Allobaculum*, *Bacteriodes*, *Blautia*, *Butyricoccus*, and *Phascolarctobacterium*); esto llevó a especular que esta modificación global de la
30 microbiota, podría ser parte del modo de acción de los anti-diabéticos, pero no se proporcionó evidencia directa de ello. En un estudio realizado en ratas alimentadas con una dieta-rica en grasa y sometidas o no a ejercicio físico, se observó que la dieta rica en grasas estaba relacionada con una disminución del filo Firmicutes y la baja capacidad para correr con una reducción de *Phascolarctobacterium*; esto llevó a
35 especular que cambios en este grupo microbiano podrían ser en parte responsable de

los efectos positivos del ejercicio físico en el hígado graso, pero no se aportó evidencia directa de ello. En ningún documento precedente se demuestran los efectos beneficiosos de especies o cepas concretas del género *Phascolarctobacterium* sobre las alteraciones y patologías objeto de la presente invención.

5

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la cepa con número de depósito DSM 32890, a sus composiciones y/o a cualquiera de sus combinaciones, y a su uso para regular el apetito, y para el tratamiento y/o la prevención del sobrepeso y/o la obesidad, y alteraciones metabólicas e inmunológicas asociadas; en concreto, la, hiperglucemia, la intolerancia a la glucosa, la resistencia insulínica, la dislipemia (hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia), el síndrome metabólico, la diabetes tipo-2 y gestacional, la esteatosis hepática y las enfermedades cardiovasculares, y así como la inflamación intestinal y/o de tejidos periféricos y las alteraciones de la microbiota intestinal asociadas.

Uno de los principales efectos beneficiosos de la bacteria objeto de la patente, así como de los productos derivados está en es su capacidad para reducir los mediadores celulares y humorales de la inflamación, asociados a la obesidad y que conducen a una disfunción metabólica (por ejemplo, resistencia insulínica, síndrome metabólico y diabetes tipo 2).

Como se describe en los ejemplos, en ensayos *in vitro* (Ejemplo 2) se demostró que la bacteria induce una respuesta antiinflamatoria en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) ya que incrementa la producción de la citocina anti-inflamatoria IL-4 con respecto a la pro-inflamatoria IFN γ y disminuye los niveles de monocitos clásicos (CD14 $^{++}$ CD16 $^{-}$) respecto a los efectos inducidos por el lipopolisacárido LPS, inductor de la inflamación en la obesidad (Tabla 1). Dicho efecto antiinflamatorio puede contribuir a mejorar la resistencia a insulina y la intolerancia a la glucosa causada por el estado pro-inflamatorio de la obesidad en mayor medida que otras bacterias intestinales (Ejemplo 2).

Un aspecto fundamental de la invención es la capacidad de *P. faecium* para reducir la inflamación y proteger la mucosa intestinal, reduciendo el riesgo de inflamación

sistémica asociada a la obesidad y las complicaciones metabólicas *in vivo*. Concretamente, en un modelo de obesidad inducida por la dieta (Ejemplo 3), *P. faecium* reduce la inflamación intestinal asociada a la obesidad, actuando tanto sobre el sistema inmune innato, como del adquirido. Por ejemplo, esta bacteria actúa

5 reduciendo la población de las células linfoides innatas del grupo 1 (Innate Lymphoid Cells, ILC1) en el epitelio, que están aumentadas en los individuos obesos y promueven la inflamación intestinal mediante la producción de IFN γ (Ejemplo 3; Figura 4a). La producción de IFN γ por parte de estas células desencadena la polarización de los macrófagos hacia los de tipo M1 (fenotipo pro-inflamatorio), estrechamente

10 implicados en la inflamación asociada a la obesidad; sin embargo, la bacteria es capaz de revertir el efecto de la dieta aumentando los niveles de macrófagos de tipo M2, induciendo así una respuesta antiinflamatoria (Ejemplo 3; Figura 4b) caracterizada por la normalización de la proporción de células M1/M2 (Ejemplo 3; Figura 4c) en la lámina propia del intestino. Además, *P. faecium* reduce el tono inflamatorio asociado a la

15 obesidad, induciendo una respuesta de tipo Th2 y la producción de células Treg (Ejemplo 3; Figuras 4d y 4e, respectivamente). Esta respuesta se ha demostrado midiendo los niveles de Gata3 como factor de transcripción mediador de una respuesta Th2 y los niveles de células T reguladoras con los marcadores CD25 y FoxP3. El aumento de Gata3 también indica el posible aumento de la población de

20 células ILC2, caracterizadas por producir citocinas de tipo Th2, que ejercen un efecto anti-inflamatorio en el contexto de la obesidad. El factor de transcripción Gata3, además de ser esencial para el desarrollo de las ILC2 a partir de células madre hematopoyéticas (HSC), también es abundante en un subconjunto de ILC3 asociados a la mucosa. El aumento de este último tipo de células (ILC3) en la lámina propia

25 también puede contribuir a aumentar la protección de la mucosa intestinal y la función barrera, que se altera en la obesidad y puede contribuir a la inflamación sistémica. *P. faecium* también reduce los niveles linfocitos intraepiteliales (IEL) y normaliza la relación de IEL naturales/ inducidos (Figura 5), alterados en la obesidad. Los IEL se sitúan entre las células epiteliales del tracto intestinal y, por ello, desempeñan un papel

30 esencial en el control de la integridad del epitelio y la alteración de su fenotipo puede contribuir a las alteraciones de la permeabilidad intestinal y activación del tono inflamatorio característico de la obesidad.

La bacteria objeto de patente también posee capacidad para modular la producción de

35 hormonas gastrointestinales implicadas en el metabolismo de la glucosa y en la

regulación del apetito, como el GLP-1 y PYY. *P. faecium* restaura la expresión de PYY y del precursor de GLP-1 en el intestino delgado, que se encuentra alterada en ratones con obesidad inducida por una dieta hipercalórica. Estas hormonas son responsables directas de la recuperación de la homeostasis de la glucosa, la reducción del peso corporal y la ingesta al facilitar la transmisión de señales de saciedad hacia regiones cerebrales implicadas en el control de ingesta y mejorar el funcionamiento de tejidos periféricos implicados en el metabolismo energético (por ejemplo la secreción de insulina en el páncreas y el gasto energético en el tejido adiposo). Estos efectos reducirían las alteraciones de la ingesta alimentaria y del metabolismo de lípidos y glucosa, frecuentemente asociadas con la obesidad, y que constituyen un factor de riesgo que precede al desarrollo de síndrome metabólico y diabetes tipo 2 y gestacional y patologías cardiovasculares.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a la cepa *P. faecium* con número de depósito DSM 32890, de aquí en adelante “cepa de la invención” o “cepa DSM 32890 o “cepa *P. faecium* DSM 32890.

P. faecium fue aislado a partir de heces de seres humanos. La cepa fue depositada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) el 9 de octubre de 2018 bajo el Tratado de Budapest en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen como Autoridad Internacional de Depósito (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, GERMANY). El número de depósito asignado fue DSM 32890.

La clasificación científica de la cepa de la invención según la base de datos del NCBI es Dominio: Bacteria; Filo: Firmicutes; Clase: Negativicutes; Orden: Acidaminococcales; Familia: Acidaminococcaceae; Género: *Phascolarctobacterium*; Especie: *faecium*.

Es una bacteria abundante en el tracto intestinal de humanos sanos, anaerobia Gram-negativa de morfología bacilar, no formadora de esporas e inmóvil; normalmente se trata de bacilos cortos, aunque su tamaño puede variar dependiendo de la fase de crecimiento y alargarse. Las colonias son transparentes y de textura poco consistente. Crece a 37°C en anaerobiosis estricta. La bacteria requiere succinato, como fuente de carbono, para su crecimiento y a partir de este sustrato produce propionato.

La cepa *P. faecium* DSM 32890 puede ser utilizada en cualquier forma que ejerza los efectos descritos. Según una realización preferida de la presente invención, la cepa *P. faecium* DSM 32890 está en forma de células viables (cultivables o no cultivables), o
5 según otra realización preferida de la invención la cepa está en forma de células no viables (células “muertas” inactivadas por cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, calor, congelación o radiación ultravioleta).

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende la cepa de la invención.

La composición, definida de forma general, es un conjunto de componentes que está formado al menos por la cepa de la invención en cualquier concentración.

15 En una realización preferida, la composición de la invención tiene una concentración de la cepa de la invención de entre 10^3 y 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.

20 En otra realización particular, la composición de la invención además puede comprender al menos otro microorganismo adicional diferente a la cepa de la invención. Por ejemplo, pero sin limitarse, el microorganismo adicional que puede formar parte de dicha composición es seleccionado entre al menos uno de los siguientes grupos:

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

30 - al menos una cepa de otra especie del género *Bacteroides* o de la especie *Bacteroides uniformis*;

- al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariontes de origen intestinal, alimentario o ambiental, como por ejemplo pero sin limitarse a *Archaea*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*,
35 *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Metanobacteria*, *Spirochaetes*, Fibrobacteres,

Deferribacteres, Deinococcus, Thermus, Cianobacteria, Methanobrevibacterium, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Coprococcus, Subdoligranulum, Dorea, Bulleidia, Anaerofustis, Gemella, Roseburia, Catenibacterium, Dialister, Anaerotruncus, Staphylococcus, Micrococcus, Propionibacterium, Enterobacteriaceae,
5 *Faecalibacterium, Bacteroides, Parabacteroides, Prevotella, Eubacterium, Akkermansia, Bacillus, Butyrivibrio, Clostridium o Mycobacterium;*

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

10

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

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

El término “componente bioactivo” hace referencia a un compuesto con actividad
25 biológica en el ámbito de aplicación de la patente que pueda mejorar o complementar la actividad de la cepa DSM 32890, incluyendo ingredientes o componentes de los alimentos (por ejemplo y sin limitar: ácidos grasos poli-insaturados, ácido linoléico conjugado, prebióticos, fibra, goma Guar, glucomanano, quitosano, picolinato de cobre, calcio, etc.), otros probióticos, plantas, extractos o componentes de plantas y
30 fármacos.

En una realización particular, la composición de la invención es una composición farmacéutica. La composición farmacéutica es un conjunto de componentes que está formado al menos por la cepa de la invención en cualquier concentración, que tiene al
35 menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un

sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud o reducción del riesgo de enfermedad. Dicha composición farmacéutica puede ser un medicamento.

5 El término medicamento tiene un significado más limitado que el significado de “composición farmacéutica”, tal como se define en la presente invención, ya que el medicamento implica necesariamente un efecto preventivo o terapéutico. El medicamento al que se refiere la presente invención puede ser de uso humano o veterinario. El “medicamento de uso humano” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o
10 prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en seres humanos o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico. El “medicamento de uso veterinario” es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como
15 poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos”
20 elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

Además del requerimiento de la eficacia terapéutica donde dicha composición farmacéutica puede necesitar el uso de otros agentes terapéuticos, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso
25 de una combinación de un compuesto de la invención y un componente bioactivo, donde a dicho componente bioactivo se le atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento. Dicho compuesto de la invención se refiere obviamente a la cepa de la invención.

30 En una realización particular, la composición farmacéutica además comprende, al menos, un vehículo y/o un excipiente, farmacológicamente aceptables.

El “vehículo” o portador, es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor
35 dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición

farmacéutica. Por tanto, el vehículo es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los componentes de la composición farmacéutica de la presente invención hasta un volumen o peso determinado; o bien que aún sin diluir dichos componentes es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma al medicamento. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

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

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

La composición farmacéutica o medicamento se puede presentar bajo cualquier forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente efectiva. Por ejemplo, puede estar en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral,

preferiblemente en una forma adaptada a la administración oral. La composición farmacéutica de la invención se puede formular en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimido, cápsula, polvo, gránulo, ungüento, solución, supositorio, inyección, inhalante, gel, microesfera o aerosol. La forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado. En una realización particular, la composición de la invención se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.

En una realización más particular, la composición de la invención se presenta en una forma adaptada a la administración oral. La forma adaptada a la administración oral se refiere a un estado físico que pueda permitir su administración oral. Dicha forma adaptada a la administración oral se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, gotas, jarabe, tisana, elixir, suspensión, suspensión extemporánea, vial bebible, comprimido, cápsula, granulado, sello, píldora, tableta, pastilla, trocisco o liofilizado.

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

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

especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

Alternativamente a la composición farmacéutica, la composición de la invención también puede ser una composición nutritiva.

5

El término “composición nutritiva” de la presente invención se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición nutritiva puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término “composición nutritiva” de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal.

10
15 En una realización particular, la composición nutritiva es un alimento, un suplemento, un nutracéutico, un probiótico o un simbiótico.

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

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

30
35

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

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

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

15

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de la cepa de la invención, o la composición de la invención, para la fabricación de un medicamento, de una composición nutritiva o de un alimento.

- 20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a la cepa *P. faecium* DSM 32890, o la composición de la invención, para su uso como medicamento. El término medicamento ha sido definido previamente, y es aplicable al presente aspecto inventivo. Tal como se ha explicado en párrafos anteriores, este medicamento puede ser una composición farmacéutica o una composición nutritiva.

25

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con la cepa de la invención, o la composición de la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del sobrepeso y/o la obesidad, o enfermedades asociadas a la misma.

- 30 El término "tratamiento", tal como se entiende en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados por una enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano) que incluye:

- 35 (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
(ii) aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión

de la enfermedad o la condición patológica o su sintomatología;
(iii) estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

5 El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de la enfermedad, es decir, evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un sujeto (preferiblemente mamífero, y más preferiblemente un humano), en particular, cuando dicho sujeto tiene predisposición por la condición patológica.

10 El término "sobrepeso" se refiere a una patología caracterizada porque el sujeto tiene un índice de masa corporal (IMC) igual o superior a 25. El IMC es una medida de asociación entre el peso y la talla de un individuo. El IMC tiene la siguiente fórmula para su cálculo: el peso del sujeto dividido por la estatura del mismo al cuadrado (Kg/m²). El sobrepeso se caracteriza por un IMC de entre ≥ 25 a < 30 . Esta forma de
15 cálculo es solo válido para mayores de 18 años, y como sabe el experto en la materia, no es aplicable a menores si no se aplica un factor de corrección. La determinación de dicho factor de corrección es práctica habitual para el experto en la materia.

20 El término "obesidad" se refiere a una patología caracterizada porque el sujeto tiene un IMC igual o mayor de 30. La obesidad se clasifica en diferentes niveles, considerando que sujetos con $IMC > 40$ padecen de obesidad mórbida. Otros parámetros utilizados para determinar si un individuo padece obesidad central son la circunferencia de cintura absoluta (el sujeto padece obesidad cuando es > 102 cm en hombres [obesidad central] y > 88 cm en mujeres) o el índice cintura-cadera (el sujeto
25 padece obesidad cuando es $> 0,9$ para hombres y $> 0,85$ para mujeres). Una vía alternativa para determinar la obesidad es medir el porcentaje de grasa corporal (el sujeto padece obesidad cuando tiene aproximadamente $> 25\%$ de grasa corporal en un hombre y aproximadamente $> 30\%$ de grasa corporal en la mujer).

30 En la presente invención se entiende por "enfermedades asociadas al sobrepeso y/o la obesidad" a aquellas enfermedades que son consecuencia del sobrepeso o la obesidad padecida por el sujeto. Ejemplos de enfermedades asociadas al sobrepeso y/o a la obesidad incluyen, sin limitar a, enfermedades cardiovasculares (tales como cardiopatías, accidentes cerebrovasculares, etc.), síndrome metabólico, diabetes (en
35 particular, diabetes tipo II), hiperglucemia, resistencia a insulina, cáncer (ejemplos de

cáncer incluyen, sin limitar a, endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon), hipertensión, dislipidemia, hipolipidemia, galactosemia, fenilcetonuria, sitosterolemia, hipertiroidismo e hipotiroidismo.

5 Así, en una realización particular, las enfermedades asociadas al sobrepeso y/o la obesidad se seleccionan de la lista que consiste en enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes, hiperglucemia, resistencia a insulina, cáncer, hipertensión, dislipidemia, hipolipidemia, galactosemia, fenilcetonuria, sitosterolemia, hipertiroidismo e hipotiroidismo.

10

En la presente invención, el término “enfermedades cardiovasculares” o “enfermedad cardiaca” se refiere a aquellas enfermedades que afectan al corazón y vasos sanguíneos incluyendo, sin limitar a, aterosclerosis, aneurisma, angina, accidente cerebro vascular, enfermedad cerebro vasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad de la arteria coronaria, infarto agudo de miocardio y enfermedad vascular periférica.

15

En la presente invención, el término “síndrome metabólico” se refiere a la enfermedad que comprende un grupo de condiciones que ponen al individuo en riesgo de desarrollar una enfermedad cardiaca y diabetes tipo 2. Ejemplos de estas condiciones incluyen, sin limitar a, hipertensión arterial, glucosa alta en la sangre, niveles sanguíneos elevados de triglicéridos, bajos niveles sanguíneos de HDL y exceso de grasa alrededor de la cintura. La inflamación crónica y las alteraciones del metabolismo de lípidos (dislipemia) y glucosa son factores de riesgo de patologías cardiovasculares y, por tanto, su tratamiento y prevención pueden evitar el desarrollo de este otro grupo de patologías

20

25

En la presente invención, se entiende por “diabetes” a aquella enfermedad caracterizada por tener niveles altos de glucosa en sangre debido a que el cuerpo no produce insulina o las células no son capaces de usar la insulina. La insulina es una hormona que ayuda a la glucosa a entrar a las células para darles energía. Con el tiempo, un nivel alto de glucosa en la sangre puede causar problemas serios en el corazón, los ojos, los riñones, los nervios, las encías y los dientes.

30

35 En la presente invención, el término “hiperglucemia” se refiere a cantidad excesiva de

glucosa en la sangre. Métodos para medir la cantidad de glucosa en sangre, así como el valor de glucosa a partir del cual se considera que hay un exceso de glucosa en sangre, son ampliamente conocidos en el estado de la técnica, y su uso es práctica de rutina para el experto en la materia.

5

En la presente invención, se entiende por “resistencia a la insulina” o “resistencia insulínica” a la condición en la cual los tejidos presentan una respuesta disminuida para disponer de la glucosa circulante ante la acción de la insulina; en especial el hígado, el músculo esquelético, el tejido adiposo y el cerebro. Esta alteración, en conjunto con la deficiencia de producción de insulina por el páncreas, puede conducir después de algún tiempo al desarrollo de una diabetes mellitus tipo 2.

En la presente invención, se entiende por “cáncer” a aquella enfermedad en la que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir tejidos cercanos. Dentro del término cáncer se engloban los tumores, siendo éstos una masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o no se destruyen en el momento apropiado, y pudiendo clasificarse en benignos (no invaden el tejido cercano ni se diseminan a otras partes del cuerpo) o malignos (invaden el tejido cercano y se diseminan a otras partes del cuerpo).

20

En la presente invención, se entiende por “hipertensión” a la elevación de los niveles de presión arterial de forma continua o sostenida con respecto a una presión arterial normal (Los niveles de máximos de presión arterial sistólica (máxima) están entre 120-129 mmHg, y las de diastólica (mínima) entre 80 y 84 mmHg).

25

En la presente invención, se entiende por “dislipidemia” a la elevación de las concentraciones plasmáticas de colesterol o de triglicéridos, o la disminución de las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad que contribuyen al desarrollo de aterosclerosis. Se entiende por “hipolipidemia” a una disminución de la concentración plasmática de lipoproteínas, y se define como una concentración de colesterol total (CT) < 120 mg/dL (< 3,1 mmol/L) o de colesterol asociado con la lipoproteína de baja densidad (LDL) < 50 mg/dL (< 1,3 mmol/L).

En la presente invención, se entiende por “galactosemia” a una enfermedad hereditaria caracterizada por que el individuo es incapaz de utilizar azúcar simple galactosa, lo

35

cual provoca una acumulación de éste dentro del organismo, produciendo lesiones en el hígado y el sistema nervioso central.

5 En la presente invención, se entiende por “fenilcetonuria”, también conocida como PKU, a la alteración congénita del metabolismo causada por la carencia de la enzima fenilalanina hidroxilasa, lo que se traduce en la incapacidad de metabolizar el aminoácido tirosina a partir de fenilalanina en el hígado.

10 En la presente invención, se entiende por “sitosterolemia” a una enfermedad rara autosómica recesiva de almacenamiento de esteroides caracterizada por la acumulación de fitoesteroides en sangre y tejidos. Las manifestaciones clínicas incluyen xantomas, artralgia y aterosclerosis prematura. Las manifestaciones hematológicas incluyen anemia hemolítica con estomatocitosis y macrotrombocitopenia. La enfermedad está causada por mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta
15 en los genes ABCG5 (2p21) y ABCG8 (2p21).

En la presente invención, se entiende por “hipertiroidismo” a aquella enfermedad en que la glándula tiroides produce demasiada hormona tiroidea, mientras que por “hipotiroidismo” se entiende aquella enfermedad en que la glándula tiroides no produce
20 la suficiente hormona tiroidea para satisfacer las necesidades del cuerpo.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso no terapéutico de la cepa de la invención, o la composición de la invención, para la regulación del apetito y/o la ingesta de alimento.
25

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

35 **Figura 1. Efecto de la administración de la cepa *P. faecium* ($1 \times 10^{7-8}$ ufc/día) a**

ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas, sobre la ganancia de peso corporal. (a) Peso corporal semanalmente. (b) Ganancia de peso corporal después de 14 semanas de tratamiento. Los datos están expresados en gramos con medias y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test Tukey ($p < 0,05$). CD, dieta control; HFHSD, dieta rica en grasa y azúcares; HFHSD+ *P.faecium*, con dieta rica en grasa y azúcares + *P.faecium*.

Figura 2. Efecto de la administración de la cepa *P. faecium* ($1 \times 10^{7-8}$ ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas, sobre glucemia basal y la tolerancia a la glucosa. (a) Niveles de glucemia en ayuno (mg/dL) a la semana 8 y 10. (b) Test de tolerancia a la glucosa, se midió la glucemia a los 15, 30, 60 y 120 minutos tras haber administrado una sobrecarga oral de glucosa (2 g/Kg). Se muestra el área bajo la curva (Area Under the Curve, AUC) para los resultados del test de tolerancia a la glucosa. Los datos se representan con medias y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test Tukey ($p < 0,05$). CD, dieta control; HFHSD, dieta rica en grasa y azúcares; HFHSD+ *P. faecium*, con dieta rica en grasa y azúcares + *P. faecium*.

Figura 3. Efecto de la administración de la cepa *P. faecium* ($1 \times 10^{7-8}$ ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas sobre la ingesta. (a) Ingesta relativa (kcal/día) por animal en las semanas 3, 6, 9 y 12. (b) Ingesta diaria (kcal) por animal en la semana 12 de tratamiento. (c) Tamaño del tejido adiposo blanco (gramos). Los datos se representan con medias y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test Tukey ($p < 0,05$). CD, dieta control; HFHSD, dieta rica en grasa y azúcares.

Figura 4. Efecto de la administración de la cepa *P. faecium* ($1 \times 10^{7-8}$ ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas sobre la inflamación. (a) Porcentaje de células ILC1 en el epitelio, (b) porcentaje de macrófagos con fenotipo M2 (Antiinflamatorio), (c) ratio de macrófagos M1/M2 (Pro-inflamatorio/ Anti-inflamatorio), (d) Intensidad media de fluorescencia (MFI) del factor de transcripción Gata3 y (e) porcentaje de linfocitos T reguladores (Treg). Los datos se representan

con medias y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test Tukey ($p < 0,05$). CD, dieta control; HFHSD, dieta rica en grasa y azúcares.

- 5 **Figura 5. Efecto de la administración de la cepa *P. faecium* ($1 \times 10^{7-8}$ ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas sobre los linfocitos intraepiteliales.** (a) Porcentaje de linfocitos intraepiteliales inducidos (IEL indicidas) y (b) ratio de linfocitos intraepiteliales naturales e inducidos (IEL nat/ind). Los datos se representan con medias y error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando ANOVA de un factor seguido por el test Tukey (p<0,05). CD, dieta control; HFHSD, dieta rica en grasa y azúcares.

EJEMPLOS

- 15 **Ejemplo 1. Aislamiento e identificación de la cepa bacteriana *P. faecium* G104 (*P. faecium* DSM 32890)**

Se procedió al aislamiento de diferentes bacterias intestinales a partir de heces procedentes de voluntarios sanos. Se usaron 1,25 gramos de heces y se diluyeron en tampón fosfato 10 mM con cisteína al 0,05% (dilución 1:10) conteniendo una concentración de NaCl de 130 mM (PBS) y se homogeneizaron en un stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, 35 UK). Dicha dilución se inoculó en 37,5 mL de Medio para Bacterias Intestinales (MBI) cuya composición se basa en los medios recomendados en publicaciones previas (Gibson, G.R., et al., Appl. Environ. Microbiol., 54 (1 1): 2750-5, 1988; Lesmes, U et al., J. Agric. Food Chem., 56: 5415-5421, 2008), con algunas modificaciones diseñadas por los inventores:

- Ingredientes principales: agua destilada (1.600 mL), agua de peptona (4 g), NaHCO₃ (4 g), CaCl₂ (0,02 g), pectina (4 g), xilano (4 g), extracto de salvado de trigo (4 g), arabinogalactanos (2 g), goma arábiga (2 g), almidón (10 g), caseína (6 g), inulina (2 g) y NaCl (0,2 g). Autoclavada a 121°C durante 60 minutos y dejada enfriar hasta el día siguiente.
- Solución de mucina: Mucina (8 g) y agua destilada (200 mL). Autoclavada 20 minutos.
- Sales y vitaminas: Agua destilada (100 mL), K₂HPO₄ (0,08 g), KH₂PO₄ (0,08 g), MgSO₄ (0,02 g), hemina (0,01 g) y menadiona (0,002 g)

- Solución de cisteína: L-cisteína-HCl (1 g), agua destilada (100 mL)

Se juntaron la mezcla de sales y vitaminas y la solución de cisteína y se añadió 6M KOH hasta que la solución final se volvió marrón translúcida y se esterilizó por
5 filtración. El MBI final se obtuvo mezclando los ingredientes principales, la solución de mucina, las sales y vitaminas y solución de cisteína completando un volumen de 2 L en condiciones de esterilidad.

Los 50 mL de heces diluidas en medio MBI se fermentaron durante 24 horas en una
10 cámara de anaerobiosis (Whitley DG250 Workstation, Don Whitley Scientific) en agitación manteniendo el pH entre 6,9-7,0. El propio medio MBI fermentado durante 24 horas se filtró (tamaño de poro 0,22 µm) y se usó como suplemento de placas de agar de medio Fastidious Anaerobe Agar (FAA) con 0,5% de sangre desfibrinada, en las cuales se realizó la siembra de diluciones seriadas de las heces fermentadas (0,1 mL
15 de inóculo de cada dilución seriada en cada placa). Este suplemento del medio MBI fermentado contiene sustratos producidos por microbiota intestinal, siendo un medio enriquecido en nutrientes presentes en el ecosistema intestinal que permite una mejor recuperación de bacterias autóctonas en condiciones de laboratorio. Las placas sembradas se incubaron 72 horas a 37°C y en cámara de anaerobiosis.

20 Entre las colonias que crecieron tras las 72 horas en placa se aisló *Phascolactobacterium faecium* DSM 32890. Su identificación se realizó mediante secuenciación del gen del 16S rRNA (1,26 Kb) empleando los cebadores 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 1)) y 1401r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3' (SEQ ID NO: 2)). Las reacciones tras la amplificación del ADN se purificaron con el kit de Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare) y se secuenciaron por la tecnología Sanger en un secuenciador ABI 3730XL (Stabvida-Caparica-Portugal). Mediante comparación de las secuencias
25 obtenidas con la base de datos de NCBI y el algoritmo BLASTn se obtuvo la identificación de la cepa aislada (G104) con la especie *Phascolactobacterium faecium* cepa ACM 3679 (secuencia parcial, ARN ribosomal del 16S) con un porcentaje de identidad del 99%. La nueva cepa *Phascolactobacterium faecium* G104 fue depositada en la en la Colección Alemana de Cultivos Tipo, correspondiéndole el número DSM
30 32890.

35

Secuencia del 16S empleada para identificación de identidad por algoritmo Blastn empleando los oligos 27F y 1401r para su secuenciación fue la siguiente:

>16S G104 secuencia parcial (SEQ ID NO: 3)

5 TCCGACTTCACGCAGGCGGGTTGCAGCCTGCGATCCGAACTGAGATCGGGTTTCTGGGGTTTGC
TCTGCCTCGCGGCTTCGCTTCCCTCTGTTTTCCGACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCAAGACAT
AAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCGCTTCTCCAGGTTGTCCTGGCAGTCTCCCATG
AGTCCCCAACTTTACTTGCTGGTAAACATAGGATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGTTTTCTTGTCCCCGAAGGGAAAT
10 CTCTATCTCTAGAGCGTTCAATCAATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTGAATT
AAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGCC
GTA TCTCCCAGGCGGGTACTTATTGCGTTAACTCCGGCACAGAAGGGTTCGATACCTCCTACA
CCTAGTACCCATCGTTTACGGCCAGGACTACCGGGGTATCTAATCCCGTTTCGCTACCCTGGCTT
TCGCATCTCAGCGTCAGACACAGTCCAGAAAGGCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCCAATATC
15 TACGCATTTACCGCTACACTGGGAATTCCTTCTCCTGCACTCAAGCCTAACAGTTTC
CAGCGCCATACGGGGTTGAGCCCCGCATTTTACGCTCGACTTATTAAGCCGCCTACATGCTCT
TTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTCGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
TAGCCGTGGCTTCCTCGTTTACTACCGTCATTGCAATGCATTGTTACACACTGCACGTTTCGTC
ATAAACAACAGAGCTTTACAGACCGAAATCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTACAGACT
20 TTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCC
CAATGTGGCCGTTTCATCCTCTCAGACCGGCTACTGATCATCGCCTTGGTAGTCCGTTACACTAC
CAACTAGCTAATCAGACGCAGGCCCATCCTTTAGCGATAGCTTACTTGTAGAGGCCATCTTTCT
TCATCCTGCCATGCGGCACGATGATCACATCCGGTATTAGCACTCCTTTCCGAATGTTGTCCCC
GTCTAAAGGGCAGGTTGCCTACGCGTACTCACCCGTTTCGCCACTAAGAATTCTACCGAAATAA

25

El crecimiento específico de esta cepa se optimizó para futuros ensayos utilizando el medio recomendado por la colección de cultivos DSMZ (Medio nº 104b (PY + succinato 8 g/L)).

30

Para 1L de medio, se mezcló peptona triptica 5,0 g, extracto de carne 5,0 g, extracto de levadura 10,0 g, K₂HPO₄ 2,00 g, Tween 80 1,00 mL, solución de sales (ver abajo) 40,0 mL, solución de resazurina 1 mg, L-Cisteína-HCl x H₂O 0,5 g, succinato sódico 8,0 g, agua destilada 950,0 mL, solución de hemina (ver abajo) 10,00 ml y solución de vitamina K1 (ver abajo) 0,20 mL.

35

- Solución de sales: CaCl₂ x 2 H₂O 0,25 g, MgSO₄ x 7 H₂O 0,50 g, K₂HPO₄ 1,00

g, KH_2PO_4 1,00 g, NaHCO_3 10,00 g, NaCl 2,00 g y Agua destilada 1000,00 mL.

- Solución de hemina: Disolver 50 mg de hemina en 1 mL 1 N de NaOH; llevarlo a 100 mL con agua destilada. Conservar refrigerado.
 - Solución de vitamina K1: Disolver 0,1 mL de vitamina K1 en 20 mL de etanol
- 5 95% y esterilizar por filtración. Almacenar refrigerado y protegido de la luz.

Los ingredientes se disolvieron (excepto la cisteína, hemina y vitamina K1) y se autoclavaron durante 20 minutos a 121°C. Se dejó enfriar y la cisteína, vitamina K1 y hemina se adicionaron posteriormente. Se ajustó el pH a 7,2 y se introdujo el medio en

10 cabina de anaerobiosis para garantizar el estado anóxico del mismo previamente a la inoculación de *P. faecium* G104.

EJEMPLO 2. Selección de *P. faecium* en función de su capacidad de modular *in vitro* la inflamación.

15

Se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar comparativamente las propiedades inmunomoduladoras de bacterias de origen intestinal humano y seleccionar la cepa capaz de inducir la mayor respuesta antiinflamatoria en monocitos clásicos y por tanto con potencial interés terapéutico en el tratamiento de la inflamación asociada a la

20 obesidad. Para ello, suspensiones celulares de distintas cepas bacterianas se utilizaron como estímulo en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y se midió el número de monocitos clásicos y los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-4 respecto a la citocina proinflamatoria IFN γ mediante citometría de flujo.

25

Cultivo y estimulación de PBMCs.

A partir de sangre total de voluntarios sanos, se aislaron Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) utilizando un gradiente de Ficoll (Ficoll Paque-Plus 17-1440-02, Bioscience). Después de tratarlas con una solución para lisar los eritrocitos

30 (Lysis Buffer for Red Blood Cells, RBC, Miltenyi Biotec., España) se resuspendieron en medio RPMi 1640 (Gibco, Barcelona, España) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España), estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma), penicilina (100 U/mL, Sigma) y L-glutamina (Sigma). Para realizar los experimentos, las PBMCs se incubaron a una concentración de 10^6 por mL en placas de poliestireno de fondo

plano de 24 pocillos (Corning, Madrid, España) a 37° C, al 5% de CO₂. Como estímulo se utilizaron suspensiones de bacterias vivas a una concentración de 10⁷ ucf/mL. Como control positivo se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de Salmonella enterica serotipo Typhimurium (Sigma Chemical Co, Madrid, Spain) a una concentración de 1
 5 µg/mL y como control negativo se utilizó muestras de PBMCs no tratadas. El tiempo de estimulación fue de 24 horas a 37° C, al 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, las células se recogieron y se centrifugaron separando el pellet celular del sobrenadante. Cada tipo de estímulo fue ensayado por triplicado en 3 experimentos independientes. Los sobrenadantes de los cultivos se fraccionaron y se almacenaron
 10 en alícuotas a -80°C.

Caracterización de las propiedades inmunomoduladoras de las cepas bacterianas sobre las PBMCs mediante citometría de flujo.

15 Las PBMCs estimuladas se analizaron mediante citometría de flujo a fin de determinar los niveles de monocitos clásicos pro-inflamatorios, utilizando los marcadores CD14 y CD16. Además, se evaluaron los niveles de la citocina proinflamatoria IFN γ y los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-4 en los monocitos. Para ello, las células fueron permeabilizadas y fijadas (Fixation/Permeabilization Solution Kit, BD-Bioscience)
 20 y resuspendidas con la solución FACS (PBS1X + BSA 0,2%). Los niveles de los marcadores se midieron utilizando BD LSRFortessa.

La evaluación comparativa de las distintas cepas bacterianas permitió concluir que la cepa de la invención *Phascolarctobacterium faecium* DSM 32890 fue la que indujo los
 25 efectos inmunomoduladores más significativos, mostrando una mayor producción de la citocina antiinflamatoria IL-4 con respecto a la proinflamatoria IFN γ (mayor IL-4/IFN γ) y reducción de los monocitos clásicos (CD14⁺⁺ CD16⁻) con respecto a las células no tratadas y tratadas con LPS, que es un inductor de la inflamación asociada a la obesidad y sus complicaciones (Tabla 1).

30

Tabla 1: Caracterización *in vitro* de las propiedades inmunomoduladoras de bacterias intestinales humanas sobre PBMCs.

Cepas bacterianas	Monocitos Clásicos	IL-4/IFN γ
Sin tratar	0,71(0,02)b	1,74(0,24)d

LPS	1,00(0,05)a	0,80(0,05)e
<i>Alistipes indistinctus</i>	0,69(0,03)b	3,73(0,26)b
<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	0,48(0,04)c	4,79(0,08)a
<i>Bacteroides dorei</i>	0,70(0,06)b	3,55(0,20)b
<i>Eubacterium cylindroides</i>	0,75(0,04)b	1,61(0,10)d
<i>Eubacterium limosum</i>	0,93(0,03)a	1,39(0,07)d

Los resultados están expresados como la media y su error estándar de los niveles relativos de monocitos clásicos y la razón IL-4/IFN γ medidos por citometría de flujo. Las diferencias significativas (P<0,05) entre grupos se establecieron mediante ANOVA de un factor seguido por el test post-hoc Tukey. Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos experimentales (p<0,05).

EJEMPLO 3. Efectos de *P. faecium* en un modelo animal de obesidad

10 Desarrollo del modelo animal de obesidad y toma de muestras.

Ratones C57BL / 6 machos adultos (6-8 semanas, Charles River, Les Oncins, France), mantenidos en condiciones controladas de temperatura (23°C), humedad relativa (40-50%) y ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, fueron alimentados con dieta hipercalórica rica en grasa (45% Kcal) y azúcar (sacarosa);17% Kcal) (HFHSD; D12451, Research diet, Brogaarden, Dinamarca) o bien con una dieta control (CD, 10% Kcal procedentes de grasa, sin sacarosa; D12450K, Research diet, Brogaarden, Dinamarca) durante 14 semanas. Diariamente, los ratones alimentados con la dieta HFHSD recibieron una dosis oral de la cepa bacteriana objeto de la invención [(1x10⁷-1x10⁸) unidades formadoras de colonias (UFC)] disuelta en 10% de leche desnatada. El vehículo (10% de leche desnatada) se administró de igual forma tanto al grupo control de fenotipo obeso (HFHSD) como al de fenotipo delgado (CD) (n = 10 ratones por grupo). Transcurridas las 14 semanas, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical para la obtención de muestras, incluyendo sangre, intestino, hígado, cerebro, tejido adiposo blanco inguinal y epididimal, tejido adiposo marrón, contenido fecal y heces.

25

Caracterización del fenotipo metabólico

El peso corporal se monitorizó semanalmente. A partir de sangre de la vena safena se determinó la glucemia basal en ayunas (semana 8 y 10) mediante tiras reactivas de glucosa (Contour XT Bayer, Barcelona, España) así como la tolerancia oral a glucosa

mediante un test oral de glucosa (OGTT, semana 10) en el que se midió la glucemia a los 15, 30, 60 y 120 minutos tras haber administrado una sobrecarga oral de glucosa (2 g/Kg) a ratones sometidos a 4 horas de ayuno.

- 5 La bacteria objeto de intervención redujo la ganancia de peso en el modelo de obesidad inducido por dieta (Figura 1a y 1b), así como la adiposidad en ratones obesos después de 14 semanas de tratamiento (Figura 3c). Además, esta bacteria mejoró, tanto la glucemia basal (Figura 2a), como la tolerancia oral a la glucosa (Figura 2b).

10

Efectos en la ingesta

- La ingesta registrada semanalmente en las diferentes jaulas (5 animales por jaula) nos permitió hacer una estimación de la ingesta de alimentos en kilocalorías de cada uno de los animales por día (Figura 3a) Las diferencias observadas se confirmaron evaluando la ingesta individual durante 24 horas en la semana 12 de experimento. El resultado observado fue una reducción de la cantidad de kilocalorías consumidas por parte del grupo de animales a los que se les había administrado la bacteria, en comparación con el grupo obeso (Figura 3b). La regulación del apetito parece ser uno de los mecanismos por los que la bacteria objeto de estudio reduce el peso y la grasa corporal.
- 15
- 20

Efectos sobre la inflamación

- Los efectos de *P. faecium* sobre la inflamación intestinal se analizaron mediante citometría de flujo. Para ello el intestino se sometió a etapas de digestión junto con un tratamiento mecánico, que permitió separar el epitelio de la lámina propia. El tejido limpio y troceado se incubó en agitación durante 30min a 37°C con la primera solución de pre-digestión (5 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 µg/ml streptomycin y 100 U/ml penicillin en HBSS [Hank's Balanced Salt Solution]). Este proceso se repitió dos veces filtrando el tejido con filtros de 100µm obteniendo así las células del epitelio intestinal. Para obtener las células de la lámina propia el tejido restante se trató con la solución de digestión (0.5 mg/mL Colagenasa D, 50 U/mL DNasa I, 3mg /mL Dispasa II, 100 µg/ml streptomycin y 100 U/ml penicillin en HBSS) en agitación durante 30 min a 37°C. El proceso se repitió dos veces y se filtró utilizando filtros de 70µm.
- 25
- 30

- 35 Las suspensiones celulares obtenidas se trataron con anticuerpos de diferentes

marcadores extracelulares e intracelulares. En concreto, en el epitelio se determinaron las células linfoides innatas de tipo 1 (usando los marcadores Linaje, T-bet e IFN γ). En la lámina propia se determinó la población de macrófagos M1(F4/80, CD80 e Inos) M2 (F4/80, CD80 e Inos) y de Treg (CD3, CD4, CD8, CD25 y Foxp3). Las células se diluyeron en solución FACS (PBS 1X con 0.2% BSA) y se analizaron en un citómetro de flujo BD LSRFortessa (Becton Dickinson, NJ, USA).

En particular se analizaron los niveles de las células linfoides innatas (ILC) en el epitelio (Innate Lymphoid Cells). Estas células se encargan de proteger las barreras epiteliales frente a patógenos y mantener la homeostasis tisular. No obstante, las ILC de grupo 1 (ILC1), pueden promover la inflamación en el tejido mediante la producción de IFN γ y están incrementadas en los ratones obesos. La bacteria evaluada fue capaz de reducir la proporción de ILC1, reduciendo así la inflamación desencadenada por estas células (Figura 4a).

La cepa bacteriana también redujo la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 (pro-inflamatorio) que puede ser inducido por el aumento de la producción de IFN γ . Por el contrario, aumentó los niveles de M2, induciendo una respuesta antiinflamatoria (Figura 4b) normalizando la razón M1/M2 (Figura 4c).

Además *P. faecium* atenuó los efectos de la obesidad induciendo una respuesta de tipo Th2/Treg (Figura 4d y 4e). Esta respuesta se evaluó midiendo los niveles de Gata3 como factor de transcripción mediador de una respuesta Th2 y los niveles de células T reguladoras con los marcadores CD25 y FoxP3. El aumento de Gata3 también podría indicar un aumento en la proporción de las células ILC2 y un desarrollo de las ILC3. Las ILC2, se caracterizan por producir citocinas de tipo Th2, con efecto anti-inflamatorio en el contexto de la obesidad. El factor de transcripción Gata3 también se ha descrito en un subconjunto de ILC3 asociados a la mucosa intestinal que podrían contribuir a su protección.

Por último, *P. faecium* fue capaz de revertir el aumento en la proporción de linfocitos intraepiteliales (IEL) inducidos por la dieta hipercalórica, y de normalizar la razón de IEL naturales/ inducidas (Figura 5), lo que también contribuiría a restablecer la homeostasis inmunológica y la barrera intestinal evitando inflamación sistémica.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Phascolarctobacterium faecium* con número de depósito DSM 32890.
5
2. Cepa según la reivindicación 1, donde dicha cepa esta en forma de células viables o en forma de células no viables.
3. Composición que comprende una cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
10
4. Composición según reivindicación 3, que además comprende al menos un componente bioactivo.
5. Composición según la reivindicación 3 o 4, que además comprende al menos un microorganismo distinto de la cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
15
6. Composición según la reivindicación 5, en donde el microorganismo es una bacteria intestinal o una bacteria láctica.
20
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicha composición es una composición farmacéutica.
8. Composición según la reivindicación 7, en donde la composición comprende, adicionalmente, al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
25
9. Composición según la reivindicación 6 o 7, en donde dicha composición se presenta en una forma adaptada para su administración oral, sublingual, nasal, intracatecal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.
30
10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde dicha composición es una composición nutritiva.
- 35
11. Composición según reivindicación 10, donde dicha composición nutritiva es un alimento, un suplemento, un nutracéutico, un probiótico o un simbiótico.

- 5
12. Composición según reivindicación 11, donde dicho alimento se selecciona de la lista que consiste en un producto lácteo, un producto vegetal, un producto cárnico, un aperitivo, chocolate, bebida o alimento infantil.
- 10
13. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, donde dicha composición tiene una concentración de la cepa de entre 10^3 y 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.
- 15
14. Cepa según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o la composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, para su uso como medicamento.
- 15
15. Cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del sobrepeso y/o la obesidad, o enfermedades asociadas a la misma.
- 20
16. La cepa o la composición según reivindicación 15, en donde las enfermedades asociadas al sobrepeso y/o la obesidad se seleccionan de la lista que consiste en enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes, hiperglucemia, resistencia a insulina, cáncer, hipertensión, dislipidemia, hipolipidemia, galactosemia, fenilcetonuria, sitosterolemia, hipertiroidismo e hipotiroidismo.
- 25
17. Uso no-terapéutico de una cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para la regulación del apetito.
- 30

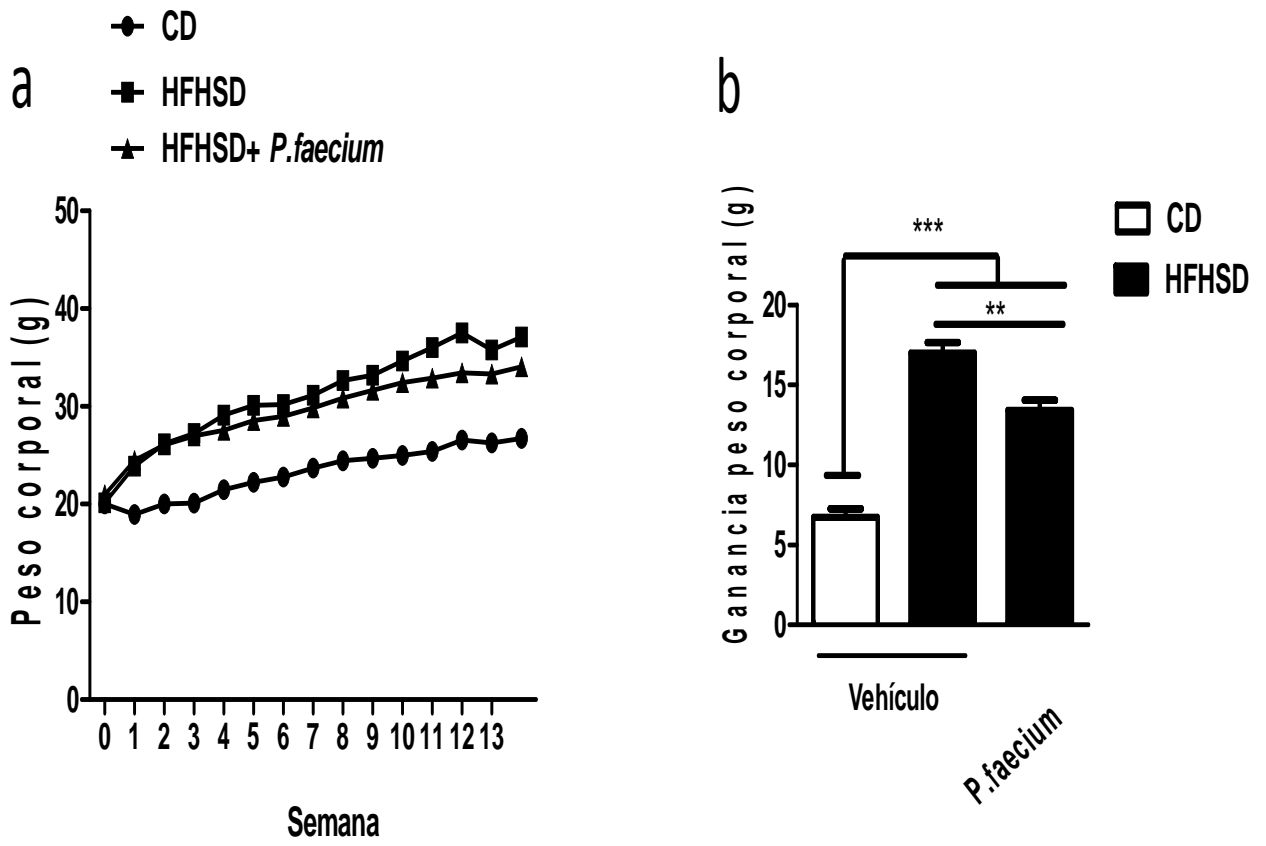


FIG 1

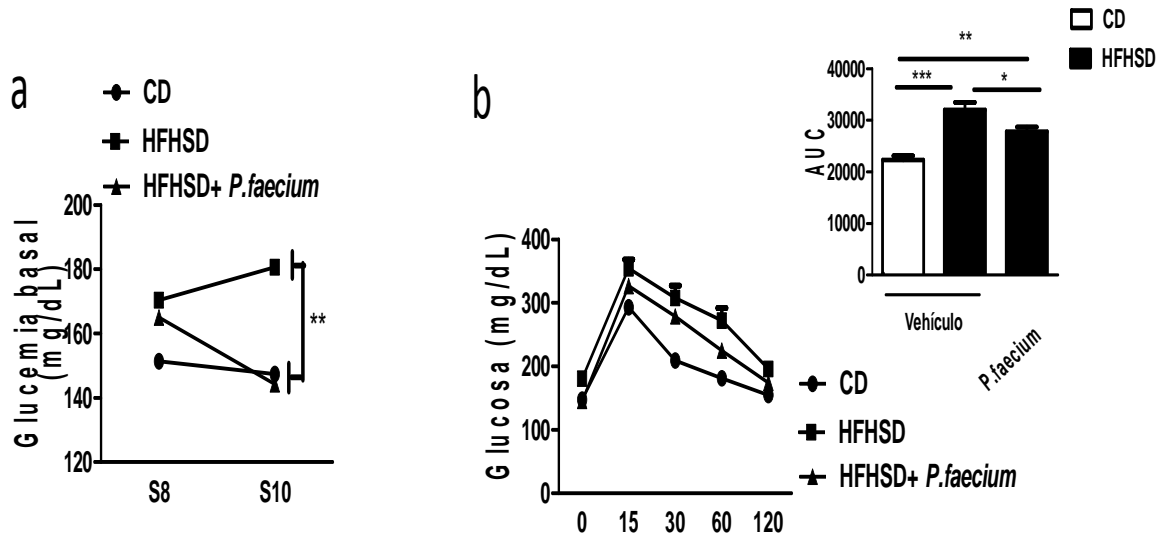


FIG 2

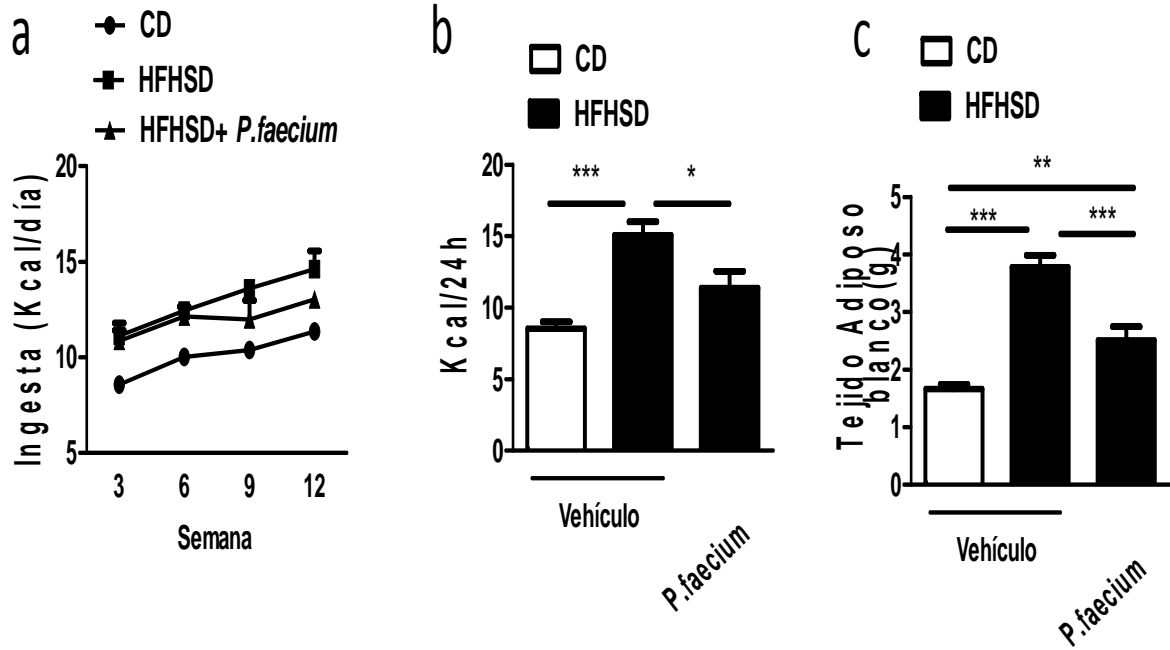


FIG 3

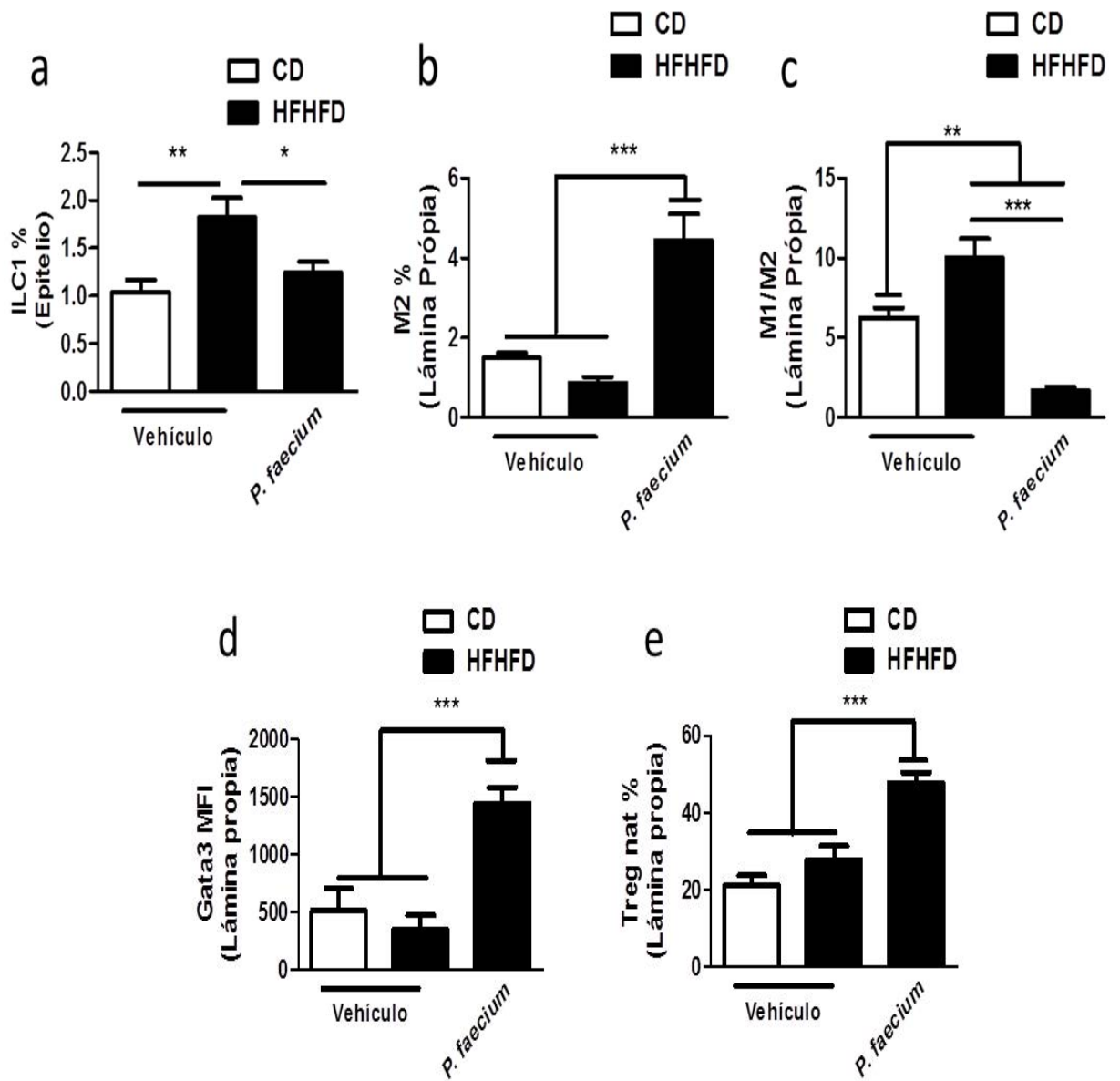


FIG 4

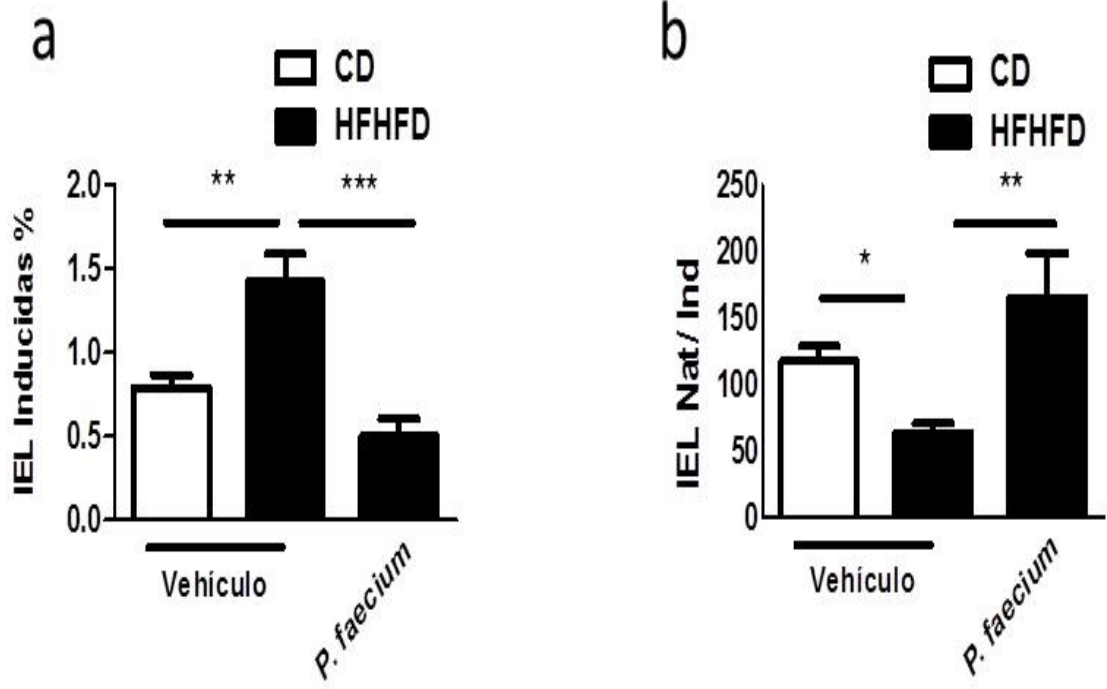


FIG 5