

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 769 628**

21 Número de solicitud: 201831282

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

26.12.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.06.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

25.09.2020

Fecha de concesión:

18.11.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.11.2020

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**SANZ HERRANZ, Yolanda;
LÓPEZ ALMELA, Inmaculada;
GÓMEZ DEL PULGAR VILLANUEVA, Eva M^a;
BENÍTEZ-PÁEZ, Alfonso y
ROMANÍ 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: **Bacteria de *Holdemanella* sp. y uso de la misma**

57 Resumen:

Bacteria de *Holdemanella* sp. y uso de la misma.
La presente invención se refiere a la cepa de *Holdemanella biformis* la cepa *H. biformis* CECT 9752 a sus componentes celulares, metabolitos, y moléculas secretadas, y a composiciones que comprenden los productos anteriores, así como al uso de dicha cepa, pero también del género *Holdemanella*, y a la especie *H. biformis* para la prevención de alteraciones de la homeostasis energética y del metabolismo de la glucosa, incluyendo entre otras la intolerancia a glucosa, la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la diabetes.

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).

ES 2 769 628 B2

DESCRIPCIÓN

Bacteria de *Holdemanella* sp. y uso de la misma

- 5 La presente invención se refiere al género *Holdemanella*, a la especie *Holdemanella biformis* y a la cepa *H. biformis* CECT 9752, a sus componentes celulares, metabolitos, y moléculas secretadas, y a composiciones que comprenden los productos anteriores, así como al uso de dicha cepa para la prevención y/o tratamiento de alteraciones de la homeostasis energética y el metabolismo de la glucosa. La presente invención se
- 10 encuadra dentro del campo de la actividad terapéutica de composiciones o preparaciones farmacéuticas, así como dentro del campo de la alimentación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 La obesidad representa actualmente un gran desafío para la salud en todo el mundo debido a su alta prevalencia y comorbilidades relacionadas con alteraciones de la homeostasis energética. Entre éstas se incluyen por ejemplo la dislipemia, el síndrome metabólico, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la esteatosis hepática o hígado graso, la hipertensión, la retinopatía, y alteraciones del comportamiento
- 20 alimentario. Estas patologías y especialmente las que implican alteraciones en el metabolismo de la glucosa, como la diabetes, también se pueden presentar en sujetos no obesos aunque el aumento de masa corporal supone un importante factor de riesgo.

- La obesidad se caracteriza por el aumento de peso y de masa corporal provocado
- 25 principalmente por un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético.

- El sistema neuroendocrino regula el balance energético a través de hormonas intestinales que son claves para el control de la ingesta y el metabolismo en diversos órganos y tejidos. Entre las hormonas intestinales destacan el péptido similar al glucagón 1 (GLP-1)
- 30 y el péptido YY (PYY) secretados por las células L, presentes principalmente en la región distal del intestino. Estas hormonas no solo ejercen efecto directo sobre los órganos distales (hígado, tejido adiposo) para 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-
- 35 cerebro. El GLP-1 es un péptido que suprime el apetito a nivel del hipotálamo e induce

saciedad, regula el metabolismo de glucosa al inducir la secreción de insulina en el páncreas, reduce la síntesis de glucagón y reduce el vaciamiento gástrico. Además, el GLP-1 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, igualmente, actúa induciendo saciedad y regulando el metabolismo de glucosa principalmente a través de la reducción del vaciamiento gástrico, contribuye 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.

10

El hígado es un órgano esencial en la integración de señales endocrinas, neurales y nutricionales para almacenar o movilizar nutrientes en función de la demanda energética. Este papel integrador hace que el hígado sea un órgano esencial en el mantenimiento de la homeostasis energética y la glucemia en concentraciones fisiológicas. Su actividad metabólica está estrechamente controlada por la insulina y otras hormonas metabólicas. En presencia de glucosa, la insulina estimula la glucólisis y lipogénesis, pero suprime la gluconeogénesis, en cambio, durante el ayuno prolongado la gluconeogénesis hepática es la principal fuente de producción de glucosa endógena. El hígado no solo utiliza la glucosa como el principal combustible metabólico, sino que también utiliza los ácidos grasos. Los hepatocitos obtienen los ácidos grasos del torrente sanguíneo, que se liberan del tejido adiposo o se absorben de los alimentos en el tracto gastrointestinal. Los ácidos grasos son translocados al interior de la mitocondria a través de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1) para ser metabolizados mediante la beta-oxidación los ácidos para producir Acetil-CoA. La beta-oxidación mitocondrial no solo proporciona energía para los hepatocitos, sino que también genera cuerpos cetónicos (β -hidroxibutirato, acetoacetato y acetona) que se exportan a la circulación y proporcionan energía para los tejidos extrahepáticos. La conexión del intestino y el hígado, mediante la vena porta, permite el transporte de nutrientes, hormonas y metabolitos de la microbiota intestinal. La regulación del metabolismo hepático también puede estar regulada indirectamente por el tracto intestinal a través del sistema nervioso central (SNC). En respuesta a la ingestión de alimentos, las señales se transmiten a través de las aferencias vagales al núcleo del tracto solitario (NTS) en el cerebro.

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 metabólicas, pero 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

5 en parte debido a que se consumen de forma continuada al utilizarse para tratar patologías crónicas (Paternoster et al., 2018). 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.

10 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 confirmado mediante la transferencia

15 de la microbiota de individuos enfermos o sanos a nuevos sujetos y observando que estos últimos adquirirían 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

20 uso de probióticos, como 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 forma natural en mayor proporción en el intestino humano y relacionadas

25 con un fenotipo delgado, podrían ser alternativas más eficaces. A diferencia de las estrategias farmacológicas, el uso de bacterias intestinales comensales tendría la ventaja de poder actuar a través de diversos mecanismos de acción, regulando tanto las vías del sistema endocrino como las neurales que controlan el balance energético y, a priori, sin causar efectos adversos. En relación a las posibles propiedades beneficiosas del género

30 *Holdemanella* y la especie *Holdemanella bififormis* y sus cepas, no se han identificado documentos precedentes que demuestran sus efectos beneficiosos sobre las alteraciones y patologías objeto de la presente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al género *Holdemanella*, a la especie *Holdemanella biformis* y a la cepa *H. biformis* CECT 9752 así como a sus componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de dicha bacteria, y a las composiciones que comprenden los productos anteriores, así como a su uso para la prevención y/o tratamiento de alteraciones de la homeostasis energética y el metabolismo de la glucosa.

Uno de los efectos beneficiosos de la bacteria objeto de la presente invención, así como de los productos derivados esta, es su capacidad para reducir los mediadores celulares y humorales de la inflamación, asociados a la obesidad y a disfunciones relacionadas con el metabolismo de la glucosa (por ejemplo, pero sin limitarse a, resistencia insulínica, síndrome metabólico y diabetes).

Como puede verse en los ensayos *in vitro* llevados a cabo por los inventores (Ejemplo 2 de la presente descripción), las bacterias que se incluyen en el ámbito de la presente invención inducen 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 (ver 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 (ver Ejemplo 2).

Un aspecto fundamental de la invención es la capacidad del género *Holdemanella*, en particular de la especie *H. biformis* y, especialmente, de la cepa CECT 9752 para regular el sistema enteroendocrino, contribuyendo así a la mejora del metabolismo de la glucosa y la regulación del apetito, lo que a largo plazo puede reducir el peso y grasa corporal.

Entre los resultados más significativos obtenidos en los ensayos *in vivo* (ver Ejemplo 3) cabe destacar la capacidad de las cepas incluidas en el ámbito de la invención para: (i) normalizar los niveles de péptido YY (PYY) y de la incretina GLP-1 en plasma (ver Figura 2a, 2b); (ii) reducir la hiperglucemia basal inducida por la dieta hipercalórica (ver Figura 1a) y (iii) mejorar la tolerancia de glucosa en un test de sobrecarga oral de glucosa (ver Figura 1b), en ratones que desarrollan obesidad y un estado de pre-diabetes al ser

alimentados con dieta de alto contenido energético procedente de grasas saturadas (45%) y azúcares (20%). Además, la bacteria restaura la cascada de señalización de insulina y mejora la captación de glucosa en el hígado, como se deduce del análisis de expresión génica realizado en este órgano (ver Figuras 3 y 4).

5

El efecto beneficioso de estas bacterias sobre el mantenimiento o la restauración de la homeostasis energética y, específicamente, de la homeostasis de glucosa sería aplicable a individuos que sufren hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerancia a glucosa, resistencia a insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, diabetes tipo 1, disfunción pancreática, sobrepeso, obesidad, alteraciones hormonales, tiroiditis, disfunción hepática, esteatosis hepática, dislipemia, hipertrigliceridemia, patologías cardiovasculares, retinopatía y alteraciones del comportamiento alimentario, o a individuos con riesgo de sufrir estas alteraciones.

10

15 Su administración como suplemento alimentario o como fármaco supone un importante progreso en la prevención primaria de alteraciones del metabolismo energético y de la glucosa y patologías asociadas crónicas, cuya prevalencia se ha triplicado en las últimas tres décadas, debido al excesivo consumo de alimentos ricos en grasa y azúcar, siendo además una de las principales causas de muerte en las sociedades occidentales.

20

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a la cepa *H. biformis* CECT 9752 con número de depósito CECT 9752, de aquí en adelante "cepa de la invención" o "cepa CECT 9752" o "cepa G59".

25

H. biformis fue aislado a partir de heces de seres humanos. La cepa fue depositada por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) el 5 de noviembre de 2018 bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, calle Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna, Valencia, España). El número de depósito asignado fue CECT 9752.

30

La clasificación científica de la cepa de la invención es Dominio Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Erysipelotrichia; Orden Clostridiales; Familia Erysipelotrichaceae; Género *Holdemanella*; Species *Holdemanella biformis*. A lo largo del tiempo, la cepa de la invención ha recibido varios nombres, como son "*Pseudobacterium biforme*" (Eggerth 1935) Krasil'nikov 1949, *Eubacterium biforme* (Eggerth 1935) Prevot 1938, y "Bacteroides

35

biformis" Eggerth 1935. En medio de cultivo crece en Chopped Meat Medium (DSMZ Medium 78), 37°C, with 0.1% Tween 80, anaerobic.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una cepa bacteriana derivada de la cepa *H. biformis* CECT 9752, donde se mantienen o mejoran las capacidades descritas a lo largo de la presente invención. El microorganismo derivado puede producirse de forma natural o bien de forma intencionada, por métodos de mutagénesis conocidos en el estado de la técnica cómo por ejemplo, pero sin limitarse, el crecimiento del microorganismo original en presencia de agentes mutagénicos o causantes de estrés, o mediante ingeniería genética dirigida a la modificación de genes específicos. Según una realización preferida, la cepa derivada de la cepa *H. biformis* CECT 9752, es un mutante genéticamente modificado. Los términos cepa mutante o cepa derivada pueden ser utilizados indistintamente.

La cepa *H. biformis* CECT 9752 o cualquier mutante o derivado de la misma puede ser utilizada en cualquier forma que ejerza los efectos descritos, como por ejemplo, según una realización preferida de la presente invención, la cepa *H. biformis* CECT 9752 está en forma de células viables (cultivables o no cultivables), o según otra realización preferida de la invención la cepa está en forma de células no viables (células "muertas" inactivadas por cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, calor, congelación o radiación ultravioleta).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas o cualquiera de sus combinaciones, obtenidos a partir de la cepa de la invención, o a partir de una combinación de microorganismos que comprenda al menos una cepa de la invención.

Entre los componentes celulares de la bacteria se podrían incluir los componentes de la pared celular (como por ejemplo, pero sin limitarse, peptidoglicano), los ácidos nucleicos, los componentes de la membrana, u otros como proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sus combinaciones, como lipoproteínas, glicolípidos o glicoproteínas. Los metabolitos incluyen cualquier molécula producida o modificada por la bacteria como consecuencia de su actividad metabólica durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, pero sin limitarse, procesos de elaboración de alimentos o fármacos), durante el almacenamiento del producto o durante el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estos

metabolitos son, pero sin limitarse, los ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos. Las moléculas secretadas incluyen cualquier molécula exportada o liberada al exterior por la bacteria durante su crecimiento, su uso en procesos tecnológicos (por ejemplo, de elaboración de alimentos o fármacos), el almacenamiento del producto o el tránsito gastrointestinal. Ejemplos de estas moléculas son, pero sin limitarse, ácidos orgánicos e inorgánicos, proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas, lípidos, hidratos de carbono, lipoproteínas, glicolípidos, glicoproteínas, vitaminas, sales, metales o ácidos nucleicos.

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 y/o los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cualquiera de sus combinaciones.

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; o al menos por los componentes celulares, metabolitos, moléculas secretadas de la cepa de la invención o cualquiera de sus combinaciones; o por una combinación de los mismos.

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.

En otra realización particular, la composición de la invención además puede comprender al menos otro microorganismo adicional del mismo o diferente género, especie o cepa de la invención y/o sus componentes celulares, metabolitos o moléculas secretadas, o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, pero sin limitarse, el microorganismo adicional que puede formar parte de dicha composición es seleccionado entre al menos uno de los siguientes grupos:

- al menos una cepa de otra especie del género *Holdemanella* o de la especie *H. biformis*;
- al menos una cepa de otra especie del género *Bacteroides* o de la especie *B. uniformis*;

- al menos una cepa de otra especie del género *Phascolarctobacterium* y de la especie *P. faecium*;
- al menos una cepa de otra especie del género *Christensenella* y de la especie *C. minuta*;
- al menos una bacteria láctica o bifidobacteria de origen humano, alimentario o ambiental. La bacteria láctica se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, una bacteria del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Pediococcus* o *Streptococcus*;
- al menos una cepa de otros grupos filogenéticos, géneros o especies de procariotas de origen humano, alimentario o ambiental, como por ejemplo pero sin limitarse a Archaea, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Metanobacteria, Spirochaetes, Fibrobacteres, Deferribacteres, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cyanobacteria*, *Methanobrevibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio* o *Clostridium*;
- al menos una cepa de hongo o levadura, como por ejemplo, pero sin limitarse, perteneciente al género *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* o *Penicillium*.

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

Opcionalmente, en otra realización particular, la composición de la invención puede 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.

5

El término “componente bioactivo” hace referencia a un compuesto con actividad biológica en el ámbito de aplicación de la patente que pueda mejorar o complementar la actividad de la cepa CECT 9752, incluyendo ingredientes o componentes de los alimentos (por ejemplo y sin limitar: ácidos grasos poli-insaturados, ácido linoléico
10 conjugado, prebióticos, fibra, goma Guar, glucomanano, quitosano, picolinato de cobre, calcio, etc.), otros probióticos, plantas, extractos o componentes de plantas y fármacos.

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

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

veterinario. También se considerarán “medicamentos veterinarios” las “premezclas para piensos medicamentosos” elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

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

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

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

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de cualquiera de los componentes de la composición de la presente invención, estabiliza dichos componentes o ayuda a la preparación de la composición farmacéutica en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los 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.

- 10 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 forma 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 composición 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.

5

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

20

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

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 con propiedades saludables, alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal.

35

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

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

- 10 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 son, pero sin limitarse, las vitaminas, los minerales, los productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos como las enzimas y los extractos glandulares. No se
15 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.

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
20 beneficioso sobre la salud.

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.

25

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
30 limitar puede ser la asociación de la fructooligosacáridos o galactooligosacáridos a las bifidobacterias.

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

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la cepa CECT 9752, un componente celular, metabolito, molécula secretada o cualquiera de sus combinaciones obtenida de la cepa de la invención, o la composición de la invención, para su uso como medicamento. El término medicamento ha sido definido previamente, y es aplicable al presente aspecto
5 inventivo.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una bacteria del género *Holdemanella*, o una bacteria derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada, o cualquiera de sus combinaciones, derivado de una bacteria del
10 género *Holdemanella*, o una composición que comprende una bacteria del género *Holdemanella*, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones del metabolismo de la glucosa, incluyendo hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerancia a glucosa, resistencia a insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, diabetes tipo 1, disfunción pancreática, sobrepeso,
15 obesidad, alteraciones hormonales, tiroiditis, disfunción hepática, esteatosis hepática, dislipemia, hipertrigliceridemia, patologías cardiovasculares y retinopatía.

En una realización particular, la bacteria del género *Holdemanella* es la especie *H. biformis*, en particular, la cepa *H. biformis* con número de depósito CECT 9752.

20

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

- (i) inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- 25 (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.

En la presente invención, el término “prevención” se refiere a evitar la aparición de la
30 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.

En la presente invención, se entiende por “enfermedades relacionadas con alteraciones
35 del metabolismo de la glucosa” a todas aquellas enfermedades en las que se pueden

producir de forma primaria o secundaria una incorrecta utilización de la glucosa por las células, órganos o tejidos, incluyendo hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerancia a glucosa, resistencia a insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, diabetes tipo 1, disfunción pancreática, sobrepeso, obesidad, alteraciones
5 hormonales, tiroiditis, disfunción hepática, esteatosis hepática, dislipemia, hipertrigliceridemia, patologías cardiovasculares y retinopatía.

En la presente invención se entiende por “intolerancia a glucosa” a aquella alteración desarrollada como una consecuencia de la falta de producción o resistencia a la insulina,
10 en donde la insulina que produce el páncreas es insuficiente para metabolizar el azúcar de la sangre, lo que hace que el nivel de glucosa se mantenga elevado. Sin embargo, aunque los niveles de glucosa se encuentren por encima de lo normal, no puede clasificarse como diabetes. Este estado se considera como “prediabetes”.

15 En la presente invención se entiende por “resistencia a la insulina” a aquella condición en la cual los tejidos presentan una respuesta disminuida a la acción de la insulina , que dificulta el que dispongan de la glucosa circulante; 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
20 desarrollo de una diabetes mellitus tipo 2. La resistencia a la insulina también conocida como resistencia insulínica o insulinoresistencia.

En la presente invención se entiende por “síndrome metabólico” a la enfermedad que comprende un grupo de condiciones que ponen al individuo en riesgo de desarrollar una
25 enfermedad cardíaca 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.

En la presente invención se entiende por “diabetes tipo 2” a aquella enfermedad
30 caracterizada por tener niveles altos de glucosa en sangre debido a que el páncreas no produce suficiente insulina o las células no son sensibles a la insulina y no son capaces de usarla. 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.
35 La diabetes recibe el nombre de gestacional, cuando aparece en el embarazo.

En una realización particular, la invención se relaciona con una bacteria del género *Holdemanella*, o una bacteria derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada, o cualquiera de sus combinaciones, derivado de una bacteria del género *Holdemanella*, o una composición que comprende una bacteria del género *Holdemanella*, para su uso como coadyuvante en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades citadas en párrafos anteriores.

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

- a mejorar la efectividad o eficiencia de otros medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones del metabolismo de la glucosa, incluyendo hiperglicemia, hiperinsulinemia, intolerancia a glucosa, resistencia a insulina, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, diabetes gestacional, diabetes tipo 1, disfunción pancreática, sobrepeso, obesidad, alteraciones hormonales, tiroiditis, disfunción hepática, esteatosis hepática, dislipemia, hipertrigliceridemia, patologías cardiovasculares y retinopatía, y/o
- A disminuir la frecuencia de administración o potenciar su eficacia mediante la administración de una formulación de la cepa de la invención con mecanismos de acción complementarios.

En una otra particular, el tratamiento de la diabetes 2 está basado en incretinas.

En la presente invención se entiende por “incretinas” a una serie de hormonas que se producen en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos y que la regulan, así como el metabolismo de la glucosa. Uno de sus efectos más importantes es la estimulación de la secreción de insulina por el páncreas y la disminución de los niveles de glucosa en sangre. Las dos incretinas principales son el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1).

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una bacteria del género *Holdemanella*, o una bacteria derivada de ella, un componente celular, metabolito, molécula secretada, o cualquiera de sus combinaciones, derivado de una bacteria del género *Holdemanella*, o una composición que comprende una bacteria del género *Holdemanella*, para la elaboración de un alimento. El término medicamento ha sido definido previamente en la presente descripción y es aplicable al presente aspecto inventivo.

En una realización particular de los usos de la invención, la bacteria es un mutante genéticamente modificado.

En otra realización particular de los usos de la invención, la bacteria está en la forma de
5 células viables o en la forma de células no viables.

En otra realización particular de los usos de la invención, la composición comprende, adicionalmente, al menos un componente bioactivo.

10 En otra realización particular de los usos de la invención, la composición comprende, adicionalmente, al menos un microorganismo distinto de la bacteria del género *Holdemanella*, en particular, *H. biformis*, más en particular, *H. biformis* CECT 9752. En una realización más particular, el microorganismo distinto de la bacteria del género *Holdemanella* es una bacteria humana o una bacteria láctica.

15 En otra realización particular de los usos de la invención, la composición es una composición farmacéutica. En una realización más particular, la composición comprende, adicionalmente, al menos un vehículo y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 En otra realización particular de los usos de la invención, la composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.

En otra realización particular de los usos de la invención, la composición es una
25 composición nutritiva, más en particular, la composición nutritiva es un alimento, un suplemento, un nutracéutico, un probiótico o un simbiótico. En otra realización todavía más particular, 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.

30 En otra realización particular de los usos de la invención, la composición tiene una concentración de la bacteria del género *Holdemanella*, de entre 10^3 y 10^{14} unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo o mililitro de composición final.

En otra realización particular de los usos de la invención, la bacteria del género
35 *Holdemanella* es la especie *H. biformis*, en particular, la cepa *H. biformis* con número de

depósito CECT 9752.

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

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: Efecto de la administración de la cepa *H. biformis* CECT 9752

(1×10^8 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; HFHSD+ *H. biformis*, con dieta rica en grasa + *H. biformis* (1×10^8 ufc/día).

FIG. 2: Efecto de la administración de la cepa *H. biformis* CECT 9752 (1×10^8 ufc/día)

a ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas, sobre los niveles de GLP1 y PYY en plasma. (a) niveles de GLP-1 (Péptido similar al glucagón, "Glucagon Like Peptide") y (b) PYY (Péptido YY) en pg/ml. 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.

FIG. 3: Efecto de la administración de la cepa *H. biformis* CECT 9752 (1×10^8 ufc/día)

a ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas sobre los niveles enzimáticos del metabolismo energético en hígado. Expresión relativa de los genes de: glucoquinasa (Gck), unidad catalítica de glucosa-6 fosfatasa (G6Pc), fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (Pck1), lipoproteinlipasa (LpL), acetil-CoA carboxilasa

(ACC), sintetasa de ácidos grasos (FAS), lipasa sensible a hormona (HSL) y carnitina palmitoiltransferasa (Cpt1a). Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron aplicando el ANOVA de un factor seguido por el test Tukey ($p < 0,05$) (a y b). CD, dieta control; HFHSD, dieta rica en grasa.

5

FIG. 4: Efecto de la administración de la cepa *H. biformis* CECT 9752 (1×10^8 ufc/día) a ratones C57BL/6 (n=10/grupo) obesos durante 14 semanas sobre los niveles de expresión de (a) periferina y (b) el receptor de GLP-1 y de proglucagón (c) en el íleon. 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.

10

EJEMPLOS

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

EJEMPLO 1. Aislamiento e identificación de *Holdemanella biformis*.

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:

20

-Ingredientes principales: agua destilada (1600 mL), agua de peptona (4g), NaHCO_3 (4 g), CaCl_2 (0,02 g), pectina (4 g), xilano (4g), extracto de salvado de trigo (4 g), arabinogalactanos (2g), goma arábica (2g), almidón (10 g), caseína (6g), inulina (2 g), NaCl (0,2 g). Autoclavada a 121°C durante 60 minutos y dejada enfriar hasta el día siguiente.

25

-Solución de mucina: Mucina (8 g), agua destilada (200 mL). Autoclavada 20 minutos.

30

-Sales y vitaminas: Agua destilada (100 mL), K_2HPO_4 (0,08 g), KH_2PO_4 (0,08 g), MgSO_4

35

(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 con la solución de cisteína y se añadió 6M
5 KOH hasta que la solución final se volvió marrón translúcida y se esterilizó por filtración.

El MBI final se obtuvo mezclando los ingredientes principales, la solución de mucrina, las sales y vitaminas y solución de cisteína completando un volumen de 2 L en condiciones de esterilidad.

10

Los 50 mL de heces diluidas en medio MBI preparado por los inventores se fermentaron durante 24 horas en una cámara de anaerobiosis (Whitley DG250 Workstation, Don Whitley Scientific) en agitación manteniendo el pH entre 6,9-7,0.

15 El propio medio MBI fermentado durante 24 horas se filtró (por un tamaño de poro de 0,22µm) 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 de inóculo de cada dilución seriada en cada placa). Este suplemento del medio MBI fermentado contiene sustratos
20 producidos por la 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.

25 Entre las colonias que crecieron tras las 72 horas en placa se aisló *Holdemanella bififormis* CECT 9752. 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
30 Purification Kits (GE Healthcare) y se secuenciaron por la tecnología Sanger en un secuenciador ABI 3730XL (Stabvida-Caparica-Portugal). Mediante comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos de NCBI y el algoritmo BLASTn se obtuvo la identificación de la cepa aislada (G59) con la especie *Holdemanella bififormis* DSM 3989 (secuencia parcial, ARN ribosomal del 16S) con un porcentaje de identidad del 98%.

35

Secuencia del 16S (SEQ ID NO: 3) empleada para identificación de identidad por algoritmo Blastn empleando los oligos 27F y 1401r para su secuenciación:

CTTCATGAAGTCGGGTTGCAGACTTCAATCCGAACTGAGACGTCCTTTATGAGATTCGCT
 TGCCTTCACAGGCTTGCCGCTCTTTGTAGACGCCATTGTAGTACGTGTGTAGCCAGGCC
 5 ATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCT
 GATATGAGTCCTCAACTCAATGTTAGTAACATATCACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC
 TTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCTCCTTGATA
 ACCTCGGATATATCTCTATACCTCTGCAAGGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCG
 TTGCTTCGAATTAAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGAG
 10 TTTACACTTGC GTGCATACTCCCCAGGCGGAGAACTTATTGCGTTAACTGCGGCACTGA
 GTTATTCCCCCAACACCTAGTTCTCATCGTTTACGGCGTGGACTACTAGGGTATCTAATC
 CTATTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCTTCAGTGTGAGAATCCAGACCAGACGGCCGCCTTC
 GCCACCGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTTACCGCTACACATGGAGTTCCGCCGTC
 CTCTTCTGTTCTCTAGCTGATCAGTTTCCAGAGCAAGTACGGGTTGAGCCCATACCTTTT
 15 ACTCCAGACTTGATCTGCCACCTACGCACCCTTTACGCCAATCATTCCGGATAACGCTC
 GCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTGGTAAGATA
 CCATCACTCACTCATCATTCCCTATGAGTGCCGTTTTTCTTTACAACAGAGCTTTACGA
 TCCGAAGACCTTCCTCACTCACGCGGCATTGCTCGTTTCAGGGTTCCCCCATTGACGAAA
 ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTC
 20 CGCCCTCTCAGGCCGGCTATGCATCGTCGCCTTGGTGGGCCGTTACCTCACCAACTAGCT
 AATGCACCGCAGGTCCATCCATGTTTCATGGCCTTAGCCACTTTAATAGCAGTCAAATGCT
 TGTCTGCTACCTATCCGGTTTTAGCATCCGTTTCCAGAAGTTATCCCGGGCACATGGGCA
 GGTTACCTACGTGTTACTCACCCGTTGCGCACTAGATTTAGGAAAGCAAGCTTTCCTTCC
 TCTCGTTC

25

El crecimiento específico de esta cepa se optimizó para futuros ensayos utilizando el recomendado por la colección de cultivos DSMZ. El medio consistió en carne picada (Chopped meat medium (DSMZ Medium 78)) suplementada con 0,1% de tween 80.

30 **EJEMPLO 2. Selección de *H. biformis* en función de su capacidad para modular *in vitro* la inflamación.**

Se realizaron ensayos *in vitro* para evaluar comparativamente las propiedades inmunomoduladoras de la colección de aislados bacterianos y así seleccionar la bacteria capaz de inducir la mayor respuesta antiinflamatoria en monocitos clásicos, y por tanto,
 35 con potencial interés terapéutico en el tratamiento de la inflamación asociada a la obesidad y a la alteración del metabolismo de la glucosa. Para ello, suspensiones

celulares de distintas bacterias se utilizaron como estímulo de 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.

5

- 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 (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 μ g/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 CO $_2$. Como estímulo se utilizaron suspensiones de bacterias vivas a una concentración de 10^7 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 μ g/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 CO $_2$. 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 en alícuotas a -80°C.

25 -Caracterización de las propiedades inmunomoduladoras de las cepas bacterianas aisladas sobre las PBMCs mediante citometría de flujo

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) y resuspendidas con la solución FACS (PBS1X + BSA 0.2%). Los niveles de los marcadores se midieron utilizando BD LSRFortessa.

De la colección de bacterias aisladas, la cepa de la invención *Holdemanella biformis* CECT 9752 fue la que indujo los efectos inmunomoduladores más significativos, induciendo 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 pro-inflamatorios (CD14++ CD16-) con respecto a las células no tratadas y tratadas con LPS (Tabla 1). Esta cepa se seleccionó para evaluar su capacidad para prevenir alteraciones del metabolismo de la glucosa en un modelo animal de obesidad (Ejemplo 3).

Tabla 1: Caracterización *in vitro* de las propiedades inmunomoduladoras de los aislados bacterianos sobre PBMCs. Los resultados están expresados como la media y su error estándar (entre paréntesis) de los niveles relativos de monocitos clásicos y la razón de 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 de Tukey. Distintas letras indican diferencias significativas entre grupos experimentales.

Cepas bacterianas	Monocitos Clásicos	IL-4/IFN γ
Sin tratar	0,70(0,02)b	1,74(0,24)c
LPS	1,00(0,05)a	0,80(0,05)d
<i>Flavonifractor plautii</i> A33	0,63(0,06)c	2,67(0,20)b
<i>Ezakiella peruensis</i> C260	0,59(0,06)c	2,91(0,27)b
<i>Holdemanella biformis</i> G59	0,43(0,02)d	5,45(0,09)a
<i>Alistipes shahii</i> DTA14	0,67(0,05)c	2,51(0,14)b
<i>Eubacterium cylindroides</i> G20	0,75(0,04)b	1,61(0,10)c
<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i> H28	0,87(0,04)b	1,48(0,06)c

15

EJEMPLO 3. Caracterización de los efectos de *H. biformis* en la regulación del metabolismo energético y de la glucosa en un modelo animal de obesidad

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 (HFHSD; D12451, Research diet, Brogaarden, Dinamarca) rica en grasa (45% Kcal) y sacarosa (17% Kcal) o bien con una dieta control con contenido estándar de grasa y sin sacarosa (CD, 10% Kcal procedentes de grasa; D12450K, Research diet, Brogaarden,

20

Dinamarca) durante 14 semanas. Diariamente, los ratones alimentados con la dieta HFHSD recibieron una dosis oral de la cepa bacteriana objeto de la invención (1×10^8 unidades formadoras de colonias [UFC]) suspendida en 10% de leche desnatada. El vehículo o placebo (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 biológicas (sangre, intestino, hígado, etc.)

Caracterización del fenotipo metabólico

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) y 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 (2g/Kg) a ratones sometidos a 4 horas de ayuno. También se midieron los niveles plasmáticos de insulina y hormonas gastrointestinales como el péptido similar al glucagón (glucagon-like peptide-1 [GLP-1]) y péptido YY (PYY) mediante multiplex (Mouse Metabolic Magnetic Beads Panel, Merck Chemicals and Life Science, Madrid, España).

La bacteria objeto de invención fue capaz de mejorar tanto la glucemia basal (Figura 1a) como la tolerancia oral a la glucosa (Figura 1b). De acuerdo con estos resultados, la bacteria también incrementó los niveles de las hormonas gastrointestinales GLP-1 y PYY que controlan los niveles postprandiales de glucosa en sangre al estimular la secreción de insulina y reducen la ingesta.

25

Análisis del metabolismo energético en hígado

Teniendo en cuenta la importancia del hígado en el mantenimiento de la glucemia, también se examinó el metabolismo energético en este tejido. Para ello, mediante qPCR se analizaron los niveles de mRNA de las enzimas limitantes del metabolismo glucídico y lipídico como son: la quinasa que facilita el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno en condiciones anabólicas (glucogenogénesis; GcK, glucoquinasa); la unidad catabólica de la glucosa-6 fosfatasa (G6Pc) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (PcK1), ambas implicadas en la gluconeogénesis; la lipasa que modula la homeostasis de triglicéridos (TG) en plasma (lipoproteinlipasa, LpL); la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la sintetasa de ácidos grasos (FAS), ambas enzimas implicadas en la lipogénesis, la lipasa

35

sensible a hormona (HSL) que hidroliza los TG (lipólisis) y la carnitina palmitoiltransferasa, enzima limitante de la β -oxidación de ácidos grasos. El RNA total se aisló usando reactivo TRIsure de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bioline, Luckenwalde). La transcripción reversa se realizó con 2 μ g de ARN total usando

5 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (California, USA). El cDNA (ng de cDNA detallados en la Tabla 2) se amplificó mediante qPCR con LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Mannheim, Alemania) y cebadores directo (F) e inverso (R) (secuencias mostradas en la Tabla 2) en el equipo Roche Light Cycler 480 (Roche, Boulogne-Billancourt, Francia). La expresión relativa del mRNA se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para analizar la expresión de los genes por qPCR. Glucoquinasa (Gck), unidad catalítica de glucosa-6 fosfatasa (G6Pc), fosfoenolpiruvato carboxilasa 1 (Pck1), lipoproteinlipasa (LpL), Acetil-CoA carboxilasa (ACC), Sintetasa de ácidos grasos (FAS), Lipasa sensible a hormona (HSL), Carnitina palmitoiltransferasa (CPT1a), Receptor del péptido similar al glucagón (GLP-1R), y Péptido YY (PYY). F= forward; R= reverse.

Gen		Sec 5'-3'
G6Pc	F	TTACCAAGACTCCCAGGACTG (SEQ ID NO: 4)
	R	GAGCTGTTGCTGTAGTAGTCG (SEQ ID NO: 5)
Gck	F	ATGTGAGGTCGGCATGATTGT (SEQ ID NO: 6)
	R	CCTTCCACCAGCTCCACATT (SEQ ID NO: 7)
PCK1	F	AGCCTTTGGTCAACAACTGG (SEQ ID NO: 8)
	R	TGCCTTCGGGGTTAGTTATG (SEQ ID NO: 9)
LpL	F	TGAAAGCCGGAGAGACTCAG (SEQ ID NO: 10)
	R	AGTGTCAGCCAGACTTCTTCAG (SEQ ID NO: 11)
ACC	F	TAATGGGCTGCTTCTGTGACTC (SEQ ID NO: 12)
	R	CTCAATATCGCCATCAGTCTTG (SEQ ID NO: 13)
FAS	F	GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT (SEQ ID NO: 14)
	R	TGGGTAATCCATAGAGCCCAG (SEQ ID NO: 15)
HSL	F	ATGCCACTCACCTCTGATCC (SEQ ID NO: 16)
	R	CTGTCCTGTCCTTCCCGTAG (SEQ ID NO: 17)
CPT1a	F	TTTGAATCGGCTCCTAATGG (SEQ ID NO: 18)

	R	CCCAAGTATCCACAGGGTCA (SEQ ID NO: 19)
GLP-1R	F	GGCGTCAACTTTCTTATCTTC (SEQ ID NO: 20)
	R	CAAAGATGACTTCATGTGTCC (SEQ ID NO: 21)
<i>periferina</i>	F	ATCTCAGTGCCGGTTCATTC (SEQ ID NO: 22)
	R	GGGCCAAGCTTAGGAATAGG (SEQ ID NO: 23)
<i>proglucagón</i>	F	CAAACCAAGATCACTGACAAGAAAT (SEQ ID NO: 24)
	R	GGGTTACACAATGCTAGAGGGA (SEQ ID NO: 25)
PYY	F	CTTCACAGACGACAGCGACA (SEQ ID NO: 26)
	R	GGGAAATGAACACACACAGCC (SEQ ID NO: 27)

El estudio de expresión de estas enzimas en el hígado reveló efectos significativos en el metabolismo energético de los ratones obesos, en particular se observó una reducción de la expresión de LpL y ACC y un aumento de los niveles de mRNA de CPT1a (Figura 3).

- 5 La bacteria previno la sobreexpresión hepática de CPT1a en ratones obesos alcanzando los niveles de ratones control alimentados con la dieta control, sin embargo, no produjo efectos significativos en la expresión de LpL y ACC. Este resultado junto con la expresión disminuida de ACC, sugiere que los ratones obesos a los que se les administra la bacteria podrían presentar niveles reducidos de malonil-CoA, un metabolito derivado del
- 10 metabolismo de glucosa que inhibe CPT1a, aumentando por tanto la oxidación de ácidos grasos. La mejora de la captación de glucosa por tejidos periféricos inducida por la bacteria (Figuras 2a y b) se encuentra asociada a la normalización de la oxidación de ácidos grasos. La bacteria, además, tiende a disminuir, aunque no de forma significativa, los niveles de mRNA de G6Pc, enzima limitante de la producción de glucosa.

15

Identificación de señales intestinales mediadoras de los efectos de la bacteria en la tolerancia a glucosa

- Se analizaron los niveles de expresión del marcador neuronal periferina en el intestino, que podría indicar que la bacteria actúa por un mecanismo intestino-cerebro-hígado a
- 20 través de la estimulación de aferencias vagales y de GLP-1R (localizado en las fibras aferentes vagales) en el íleon. Aunque los ratones obesos no mostraron cambios significativos en la expresión de periferina o GLP-1R en el íleon con respecto al grupo control (Figura 4a y 4b, respectivamente), la bacteria incrementó hasta 8 veces la expresión de periferina y dos veces la de GLP-1R, lo que sugiere que el aumento de
- 25 GLP-1 inducido por la bacteria podría estar estimulando el eje intestino-cerebro-hígado en el que la estimulación de las inervaciones intestinales conducirían la señal nerviosa

hasta el cerebro para ser integradas en el hipotálamo, el cual modularía la homeostasis energética a través de fibras eferentes.

Además, los ratones obesos presentaron niveles reducidos de la expresión de proglucagón en el colon comparado con los ratones control (Figura 4c), mientras que la
5 bacteria de la invención fue capaz de prevenir esta reducción y normalizar los niveles de mRNA.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Holdemanella biformis* con número de depósito CECT 9752.
- 5 2. Cepa según 2 la reivindicación 1, en donde dicha cepa está en la forma de células viables o en la forma de células no viables.
3. Una composición que comprende una cepa según la reivindicación 1 o 2.
- 10 4. Composición según la reivindicación 3, en donde la composición comprende, adicionalmente, al menos un componente bioactivo.
5. Composición según la reivindicación 3 o 4, en donde la composición comprende, adicionalmente, al menos un microorganismo distinto de la cepa según la la reivindicación
- 15 1 o 2.
6. Composición según la reivindicación 5, en donde el microorganismo es una bacteria humana 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 una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en donde dicha composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral, sublingual, nasal, bronquial, linfática, rectal, transdérmica, inhalada o parenteral.
- 30 10. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicha composición es una composición nutritiva.
11. Composición según la reivindicación 10, en donde la composición nutritiva es un un alimento, un suplemento, un nutraceutico, un probiótico o un simbiótico.

12. Composición según la reivindicación 11, en 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.
- 5 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.
- 10 14. Cepa según la reivindicación 1 o 2, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, para su uso como medicamento.
- 15 15. Una cepa según la reivindicación 1 o 2 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con alteraciones del metabolismo de la glucosa seleccionadas entre la intolerancia a glucosa, la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2, diabetes gestacional, diabetes tipo 1, disfunción pancreática, sobrepeso, obesidad, alteraciones hormonales, tiroiditis, disfunción hepática, esteatosis hepática, dislipemia, hipertrigliceridemia, patologías cardiovasculares y retinopatía.
- 20 16. La cepa, o la composición, para su uso según la reivindicación 15 como coadyuvante.
17. Uso de la cepa según la reivindicación 1 o 2 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13, para la elaboración de un alimento.

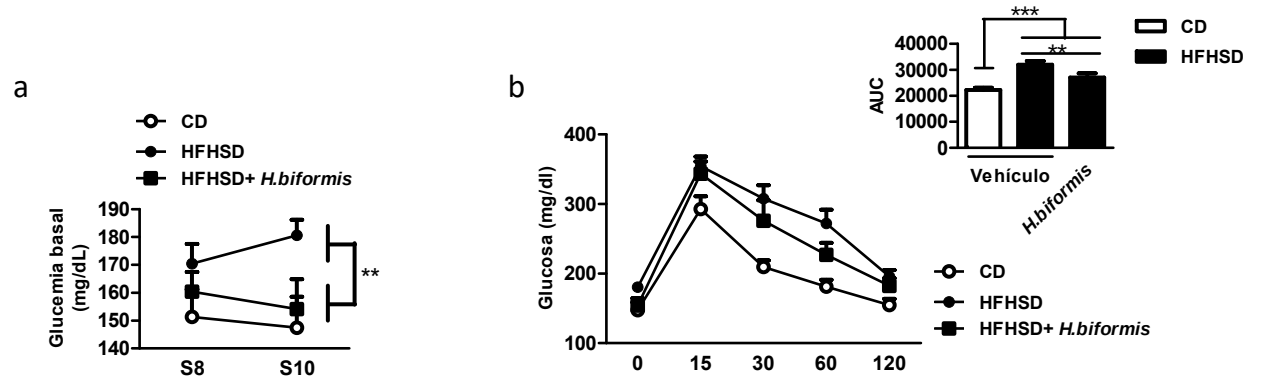


FIG. 1

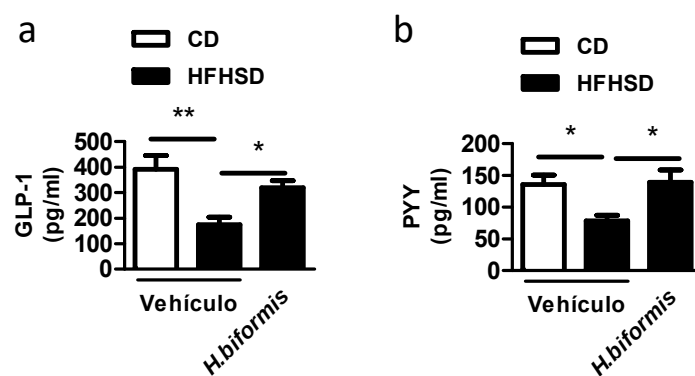


FIG. 2

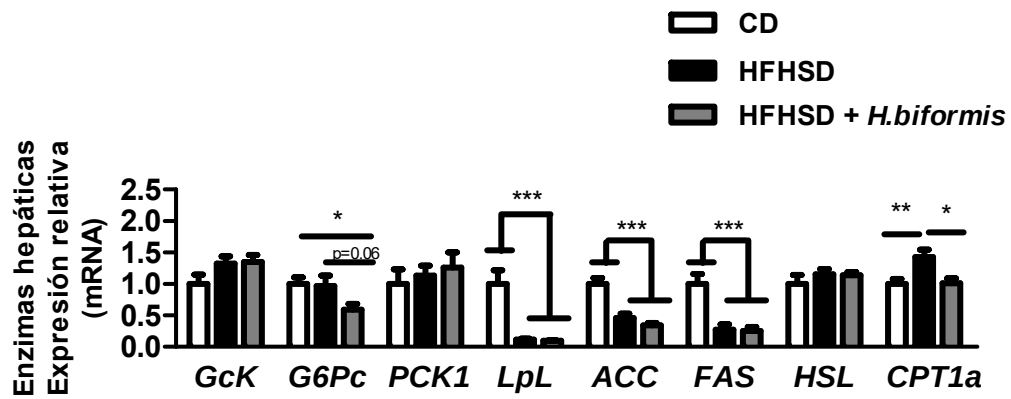


FIG. 3

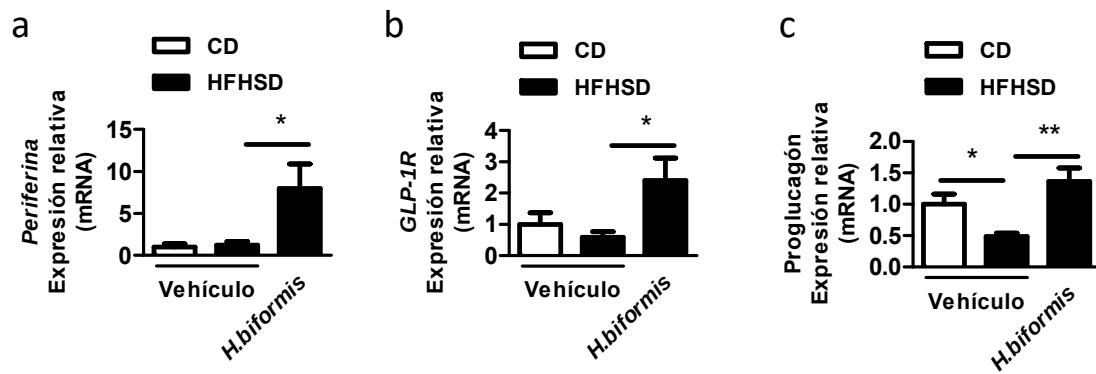


FIG. 4