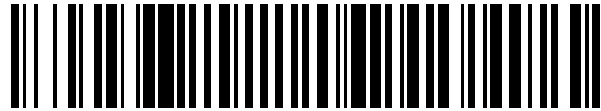


19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 402 183**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)  
**A61K 35/74** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)  
**A61P 1/00** (2006.01)  
**A61P 1/12** (2006.01)  
**A61P 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 08865212 (8)**97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2236598**54 Título: **Microorganismos para mejorar el estado de salud de individuos con trastornos relacionados con la ingesta de gluten**

30 Prioridad:

**24.12.2007 ES 200703427**

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

**29.04.2013**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
 CIENTÍFICAS (100.0%)  
 C/ SERRANO 117  
 28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:

**SANZ HERRANZ, YOLANDA;  
 SANCHEZ SANCHEZ, ESTER;  
 MEDINA, MARCELA SUSANA;  
 DE PALMA, GIADA y  
 NADAL GIMENEZ, INMACULADA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 402 183 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Microorganismos para mejorar el estado de salud de individuos con trastornos relacionados con la ingesta de gluten.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención pertenece al sector de las industrias alimentaria y farmacéutica. Más concretamente, esta invención se enmarca dentro del campo de los probióticos y productos derivados en forma de alimentos funcionales y nuevos alimentos, probióticos, simbióticos, productos nutracéuticos o suplementos alimentarios y formulaciones farmacéuticas con aplicaciones clínicas.

**Estado de la técnica**

La enfermedad celíaca es una enteropatía, afección del intestino, de naturaleza inmune causada por la intolerancia permanente a las proteínas del gluten de los cereales, que padecen los individuos genéticamente predispuestos. El espectro clínico de la enfermedad es amplio e incluye formas típicas, atípicas, silentes y potenciales. Las formas típicas se presentan con mayor frecuencia durante los primeros años de vida (6-24 meses) y cursan principalmente con sintomatología intestinal y alteraciones asociadas (malabsorción, diarrea crónica, pérdida de peso, distensión abdominal, retraso en el crecimiento, etc.). Actualmente es la enfermedad crónica más común, con una prevalencia del 0,7 al 2,0% en la población general y del 15 al 20% en familiares de primer grado. Además, la ingesta de gluten y la enfermedad celíaca están relacionadas con otras afecciones como por ejemplo: el síndrome de Down, la diabetes Mellitus tipo 1, la dermatitis herpetiforme, la miopatía, la esclerosis múltiple, la artritis, el autismo, la esquizofrenia, la depresión, los linfomas, y la ataxia. La relación entre la ingesta de gluten y las alteraciones psiquiátricas, neurológicas y del comportamiento se considera fruto de la generación de péptidos bioactivos, como por ejemplo las exorfinas, que poseen actividad opioide.

Las proteínas del gluten (gliadinas y prolaminas y gluteninas análogas) constituyen el principal factor ambiental desencadenante de la enfermedad celíaca y otros trastornos asociados. Estas proteínas contienen secuencias peptídicas ricas en prolina y glutamina, que las hacen más resistentes a las enzimas digestivas que otras proteínas de la dieta y, por tanto, pueden persistir en el lumen intestinal. En individuos genéticamente predispuestos, estos péptidos son responsables de una reacción anómala que implica tanto al sistema inmunitario innato como al adaptativo y que, globalmente, origina inflamación crónica de la mucosa intestinal, aumento de los linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de las criptas, y un deterioro progresivo de las vellosidades intestinales e incluso su desaparición total. Los péptidos tóxicos generados tras la ingestión del gluten atraviesan el epitelio intestinal y son reconocidos por las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 de las células presentadoras de antígenos, preferentemente tras su desamidación por acción de la transglutaminasa tisular. Así son presentados a los receptores de las células T produciendo su activación. Esto supone la expresión del antígeno CD4, llamado también *helper* (Th), y su diferenciación en subpoblaciones linfocitarias, lo cual afecta a la inmunidad adquirida. La subpoblación Th2 interacciona con las células B que se diferencian en células plasmáticas y producen los anticuerpos antigliadina, antiendomiso y antitransglutaminasa tisular. La subpoblación Th1 es la responsable de un aumento de la secreción de citoquinas proinflamatorias (principalmente IFN- $\gamma$ ) y de la relación IFN- $\gamma$ /IL-10 (Salvati y col. 2005. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut*. 54:46-53). Los péptidos del gluten también pueden desencadenar una respuesta en el epitelio intestinal mediada por la citoquina IL-15, que involucra al sistema inmunitario innato (Green y Jabri 2006. Celiac disease. *Annu Rev Med*. 57:207-21). Las gliadinas ingeridas estimulan la producción de IL-15 en las células epiteliales, lo que favorece la expansión clonal de los linfocitos T CD8 intraepiteliales citotóxicos y la expresión de IFN- $\gamma$  (Jabri y col. 2000. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology*. 118:867-79; Mention y col. 2003. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 125:730-45; Forsberg y col. 2007. Concomitant increase of IL-10 and pro-inflammatory cytokines in intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease. *Int Immunol*. 2007;19, 993-1001). La composición de la microbiota intestinal de los pacientes celíacos también presenta un desequilibrio en relación a la de los controles sanos, caracterizado por un predominio de bacterias proinflamatorias y una disminución en la proporción y la composición de bacterias acidolácticas y bifidobacterias (Sanz y col. 2007. Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 51(3):562-8. Nadal y col. 2007. Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol*. Dic 2007; 56(pt 12):1669-74; Collado y col. 2009. Specific duodenal and faecal bacterial groups are associated with paediatric celiac disease. *J Clin Pathol*. 62:264-269). En el lumen y el epitelio del intestino, la combinación del gluten con un aumento de las bacterias perjudiciales puede actuar como desencadenante o bien favorecer el proceso patológico y las reacciones proinflamatorias en casos de enfermedad celíaca activa, así como en otros trastornos asociados. Asimismo, la presencia o ausencia de determinadas especies bacterianas puede resultar favorable o proteger frente a la toxicidad del gluten.

La enfermedad celiaca presenta una elevada incidencia y gravedad; sin embargo, actualmente no existe ninguna terapia para estos pacientes. La única alternativa es mantener de por vida de una dieta estricta exenta de gluten. Su seguimiento es difícil y los enfermos siguen sufriendo síntomas gastrointestinales, deficiencias nutritivas y mayores riesgos de salud (enfermedades autoinmunes, osteoporosis, infertilidad, cáncer, etc.) y el equilibrio de su ecosistema intestinal no se restablece totalmente. Además, los individuos que presentan enfermedad celiaca refractaria (5-10%) no responden a esta pauta dietética.

Las alternativas terapéuticas o coadyuvantes que actualmente se encuentran en fase de investigación para el tratamiento de la enfermedad celiaca incluyen la administración oral de enzimas proteolíticas obtenidas a partir de plantas o microorganismos para acelerar la digestión gastrointestinal de los péptidos del gluten (Shan y col. 2005. Enzyme treatment of foodstuffs for celiac sprue. 20050249719/A1; Marti y col. 2006. Prolyl endopeptidase mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten. 20060286601/A1; Stepniak y Koning. 2006. Enzymatic gluten detoxification: the proof of the pudding is in the eating! Trends Biotechnol. 24:433-4; Gass y col. 2007. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. Gastroenterology. 133:472-80). Su efectividad se ha demostrado en sistemas modelo utilizando preparaciones de proteínas y péptidos o sus equivalentes recombinantes, pero aún se requiere la realización de estudios que demuestren su efectividad *in vivo* en individuos que ingieran gluten tal y como se presenta en los alimentos. Pese a los posibles beneficios de esta terapia como adyuvante a la dieta exenta de gluten, sus efectos serán altamente dependientes del momento de la ingesta del preparado enzimático y solo permitiría la ingesta ocasional de gluten, reduciendo su umbral de toxicidad. Otras alternativas propuestas incluyen el desarrollo de compuestos inhibidores de la transglutaminasa tisular (Khosla y col. 2006. Transglutaminase inhibitors and methods of use thereof WO2007025247), anticuerpos capaces de capturar los péptidos de las gliadinas (Fox, 2007. Antibody therapy for treatment of diseases associated with gluten intolerance. 20070184049/A1), compuestos que bloqueen los sitios de unión de los péptidos del gluten a las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 (Sollid y col. 2007. Drug therapy for celiac sprue. 20070161572/A1); Peakman y Chicz. 2007. Peptide epitopes recognized by disease promoting CD4+ T lymphocytes. 20070142622/A1), antagonistas de citoquinas proinflamatorias como el IFN- $\gamma$  (Maroun y col. 2007. Interferon antagonists useful for the treatment of interferon related diseases. 20070160609/A1), la administración oral de citoquinas reguladoras recombinantes (Salvati y col. 2005. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. Gut. 2005; 54:46-53), inhibidores de moléculas de adhesión implicadas en las reacciones inflamatorias, y antagonistas de la zonulina responsable de los aumentos en la permeabilidad paracelular (Paterson y Ginski. 2007. Formulations for a tight junction effector US20070196501/A1). Estas estrategias suponen la modificación de moléculas implicadas en múltiples procesos biológicos por lo que su uso podría dar lugar a efectos secundarios no deseados. En el campo agroalimentario se están desarrollando estrategias para evitar la presencia de epitopos tóxicos en los alimentos que ingerimos, mediante la manipulación genética de determinadas variedades de trigo y la utilización de enzimas y bacterias lácticas dotadas de actividad proteolítica durante los procesos de fermentación de cereales que degradan los epitopos tóxicos. De este modo, se pretende introducir mejoras en la dieta de los pacientes celíacos y proporcionarles una mayor variedad de productos, pero sin prevenir ni tratar la enfermedad (Rizzello y col. 2007. Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. Appl Environ Microbiol.73:4499-507).

El uso de cepas pertenecientes al género *Bifidobacterium* como probióticos o preparados farmacéuticos para el tratamiento y prevención de la enfermedad celiaca y los trastornos asociados y es la base de la presente invención. Las ventajas de las bifidobacterias específicamente seleccionadas para este fin son múltiples. Las bifidobacterias tienen una capacidad especial para colonizar el tracto intestinal de los recién nacidos y contribuyen de forma significativa al desarrollo de sus defensas (inmunológicas y de otra naturaleza) y a la tolerancia oral a los antígenos de la dieta. Este grupo bacteriano es uno de los componentes mayoritarios de la microbiota intestinal en los primeros años de vida, especialmente en niños que reciben lactancia materna.

## Descripción de la invención

### Descripción breve de la invención

La presente solicitud describe un procedimiento para seleccionar microorganismos o cepas microbianas capaces de modular la respuesta inmunitaria. Gracias a sus propiedades inmunomoduladoras, estos microorganismos, pertenecientes preferentemente al género *Bifidobacterium*, pueden emplearse para tratar o prevenir enfermedades inmunomediadas como la celiaquía.

La invención según las reivindicaciones aporta una nueva cepa del género *Bifidobacterium* (CECT 7347; denominada en lo sucesivo «cepa de la invención» (IATA-ES1) o el sobrenadante de un cultivo de los microorganismos de la invención o el extracto obtenido a partir de los microorganismos de la invención en forma de preparados destinados a la reducción de riesgos y mejora de la salud y calidad de vida de individuos celíacos y con otros trastornos relacionados con la ingesta de gluten (alergia, autismo, ataxia, diabetes, esclerosis múltiple, etc.).

La cepa de la invención fue aislada a partir de heces de lactantes sanos e identificada por secuenciación del gen del ARNr 16S y del gen *tuf*. Esta cepa posee propiedades inmunomoduladoras capaces de regular las respuestas proinflamatorias de tipo Th1 características de la enfermedad celíaca y enfermedades asociadas (esclerosis múltiple, diabetes, ataxia, etc.), así como las respuestas inmunológicas de tipo Th2 características de las alergias mediadas por IgE a proteínas incluidas en la dieta, que pueden originarse como consecuencia de la ingesta de proteínas de trigo y otros cereales. La cepa de la invención se caracteriza por inducir una baja producción de la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  y de la citoquina proinflamatoria IL-1 y una alta producción de las citoquinas reguladoras IL10 y TGF- $\beta$  en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). El perfil de citoquinas inducido por esta cepa no es una característica común a todas las bifidobacterias y bacterias ácidolácticas intestinales humanas y la hace especialmente idónea para modular la anómala respuesta inmunitaria que originan las proteínas del gluten en individuos predispuestos. Su combinación con otros microorganismos como, por ejemplo, la cepa *B. longum* ATCC15707 puede potenciar la síntesis de la citoquina reguladora IL-10, beneficiosa para controlar el proceso de inflamación característico de estas patologías. Las bacterias no viables (inactivadas por diversos procedimientos como: calor, congelación-descongelación, radiación, etc.) mantienen sus propiedades inmunomoduladoras.

La cepa de la invención es capaz de transportar e hidrolizar los péptidos del gluten responsables de estos trastornos y de reducir así la concentración de los epitopos tóxicos y su poder patogénico. La cepa de la invención posee peptidasas específicas para hidrolizar sustratos que contienen prolina, comunes en las proteínas del gluten. Su combinación con otras cepas de bifidobacterias que poseen peptidasas de distinta especificidad permite que se complemente su acción, con lo que se favorece la degradación de epitopos tóxicos. La combinación de bifidobacterias con otros microorganismos como *Lactococcus lactis* NCD0712, que posee una proteinasa anclada a la pared celular, también potencia los efectos hidrolíticos debidos exclusivamente a la acción de las bifidobacterias.

La cepa de la invención es capaz de modular la respuesta inmunitaria provocada por los péptidos del gluten mediante: (i) la inducción de la síntesis de citoquinas reguladoras (IL-10), (ii) la reducción de la producción de las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-8 e IL-15 derivadas de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa y (iii) la inhibición de la vía proinflamatoria mediada por el factor nuclear  $\kappa$ B (Ejemplo 3, Tabla 3).

La cepa de la invención y los compuestos derivados de esta de acuerdo con las reivindicaciones también son capaces de inhibir bacterias patógenas aisladas de la microbiota intestinal de enfermos celíacos, con potencial proinflamatorio y factores de virulencia que favorecen el restablecimiento del equilibrio intestinal (Ejemplo 4, Tablas 4 y 5). Estas cepas además son capaces de inhibir la respuesta proinflamatoria de las bacterias intestinales de pacientes celíacos activos y de aquellos con una dieta exenta de gluten, con lo que se reduce la síntesis de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) y se activa la de citoquinas reguladoras (IL-10).

La cepa de la invención también posee actividades metabólicas (por ejemplo: fosfatasa, esterasa, lipasa, galactosidasa, glucosidasa y N-acetil-glucosaminidasa) que favorecen la digestión de nutrientes y mejoran el síndrome de malabsorción y desnutrición propio de pacientes celíacos.

La cepa de la presente invención posee capacidad de adhesión a mucina (1-4%) y es estable en condiciones de estrés gastrointestinal (pH ácido y alta concentración de bilis; Ejemplo 5, Tabla 6 y Tabla 7) y en las condiciones de los procesos tecnológicos de conservación y elaboración de alimentos (refrigeración, liofilización, fermentación, etc.). *In vivo*, es capaz de sobrevivir al tránsito intestinal en humanos tras su administración por vía oral. Todas estas propiedades garantizan su persistencia prolongada y efectividad en el intestino y su uso como probióticos y simbióticos (combinaciones de probióticos y prebióticos). También garantizan su uso en forma de alimentos funcionales, alimentos nuevos, suplementos, productos nutraceuticos y fármacos para la reducción de riesgos y la mejora del estado de salud y calidad de vida de los sujetos con enfermedad celíaca, así como el de otros trastornos asociados a la ingesta de gluten.

Así, un primer aspecto de la descripción se refiere a un procedimiento para seleccionar microorganismos o cepas de microorganismos con la capacidad de modular la respuesta inmunitaria ante alergias alimentarias, que comprende: (a) el aislamiento de microorganismos a partir de muestras, preferiblemente heces, de individuos sanos, preferiblemente lactantes, y (b) la selección de los microorganismos de la anterior etapa que sean capaces de modular la respuesta inmunitaria e hidrolizar, inactivar u obstaculizar el mecanismo de acción de al menos un agente causante de alergias a alimentos, preferiblemente la enfermedad celíaca. Preferiblemente, los microorganismos seleccionados en la etapa (a) pertenecen a géneros o especies potencialmente probióticos. En una realización preferida, la respuesta inmunitaria modulada por el microorganismo obtenido en la etapa (a) consiste en las respuestas proinflamatorias de tipo Th1 o Th2. Además, los microorganismos obtenidos en las etapas (a) y (b), de forma alternativa o además de por su capacidad moduladora del sistema inmunitario, se pueden seleccionar por su capacidad para aumentar la viabilidad y/o integridad de las células epiteliales, lo cual mejora la función de barrera intestinal.

Los microorganismos seleccionados mediante el citado procedimiento o que sean capaces de hidrolizar, inactivar u obstaculizar los mecanismos de acción de al menos un agente causante de alergias alimentarias y de modular la respuesta inmunitaria (denominados en lo sucesivo: «microorganismos de la invención») se pueden emplear para el

tratamiento o la prevención de alergias alimentarias. De este modo, un aspecto de la invención se refiere a los microorganismos de acuerdo con las reivindicaciones, para su uso como medicamento o en composiciones alimentarias, preferiblemente, para el tratamiento o prevención de alergias a alimentos.

5 La invención se refiere a una cepa bacteriana con el número de depósito CECT 7347.

La invención también se refiere a una composición (denominada en lo sucesivo: «la composición de la invención») que comprende la cepa de la invención, y además está preferiblemente presente en tal composición en una proporción de entre el 0,1 y el 99,9%, preferiblemente entre el 1% y el 99% y más preferiblemente entre el 10% y el 10  
10 90%. Esta composición además puede comprender otros microorganismos o medios que potencien, entre otras, la capacidad inmunomoduladora del microorganismo o cepa de la invención o su capacidad para hidrolizar, inactivar u obstaculizar los mecanismos de acción de los agentes causantes de las alergias alimentarias.

La invención también se refiere a una composición que se puede obtener a partir de los compuestos bioactivos derivados de los microorganismos de la invención que constituyen el sobrenadante de un cultivo de cualquiera de los microorganismos de la invención (denominado en lo sucesivo: «sobrenadante de la invención»), o los extractos obtenidos a partir del cultivo puro o mixto de cualquiera de los microorganismos de la invención o la cepa de la invención (denominados en lo sucesivo: «extracto de la invención»). Estos compuestos bioactivos derivados de los microorganismos de la invención, denominados en lo sucesivo: «compuestos bioactivos derivados de la invención», se pueden usar para la preparación de alimentos, suplementos, productos nutracéuticos, productos basados en probióticos y simbióticos, alimentos nuevos o medicamentos, y, al igual que sus diferentes usos, también forman parte de la invención. Otro aspecto de la descripción se refiere a un material de soporte para la preparación de productos alimentarios que comprende la composición de la invención o al menos un microorganismo de la invención, preferiblemente, la cepa de la invención. En una realización preferida, el microorganismo de la invención está contenido en el material de soporte en una cantidad de, al menos, aproximadamente  $10^5$  ufc/g de material de soporte, preferiblemente entre  $10^6$  ufc/g y  $10^{12}$  ufc/g y más preferiblemente entre  $10^6$  ufc/g y  $10^{10}$  ufc/g. De acuerdo con lo explicado, cualquier producto alimentario o suplemento que comprenda la composición de la invención también forma parte de la invención.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica o composición alimentaria que comprenda cualquiera de los siguientes compuestos: la composición de la invención, el sobrenadante de la invención, el extracto de la invención, un microorganismo de la invención, la cepa de la invención y, de forma opcional, medios y/o excipientes farmacológicamente aceptables. La cantidad de microorganismos que debe contener la composición farmacéutica o composición alimentaria variará según el tipo de afección a cuyo tratamiento esté destinada. Dicha afección es, preferiblemente, una alergia alimentaria y, más preferiblemente, la enfermedad celíaca. En el caso de la preparación de composiciones alimentarias, y de acuerdo con la presente invención, al menos un microorganismo de la invención o compuesto bioactivo derivado de la invención se incorpora en un material de soporte preferiblemente en una cantidad de entre  $10^5$  ufc/g y  $10^{14}$  ufc/g de material de soporte, más preferiblemente entre aproximadamente  $10^8$  ufc/g y  $10^{13}$  ufc/g y, aún más preferiblemente, entre  $10^7$  ufc/g y  $10^{12}$  ufc/g, en el caso de un microorganismo de la invención, y, en el caso de un compuesto bioactivo derivado de la invención, en una proporción de entre el 0,1 y el 99,9%, preferiblemente entre el 1% y el 99% y, más preferiblemente, entre 10% y 90%. Estas composiciones alimentarias se pueden usar para la preparación de productos nutracéuticos, alimentos funcionales, probióticos, simbióticos, suplementos nutritivos o cualquier otro tipo de producto destinado al tratamiento o prevención preferiblemente de alergias alimentarias y, más preferentemente, de la enfermedad celíaca.

La composición farmacéutica o composición alimentaria de la invención se puede hallar preferiblemente en forma de comprimidos, cápsulas, microcápsulas, polvos, soluciones, pastas, etc.

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición de la invención, el sobrenadante de la invención, extracto de la invención, composición farmacéutica de la invención, o la composición alimentaria de la invención en la que el microorganismo de la invención o la cepa de la invención se combinan con otro microorganismo, un sobrenadante obtenido de su cultivo o las fracciones subcelulares del mismo. Preferiblemente, dicho microorganismo pertenece al género *Lactococcus*, preferiblemente a la especie *Lactococcus lactis* y, más preferiblemente, es la cepa *Lactococcus lactis* NCDO712.

La invención también se refiere a las diferentes formas de presentación de la composición de la invención que se pueden formular como un alimento, producto nutracéutico, preparado farmacéutico, suplemento, probióticos o simbióticos, o alimentos nuevos.

## 60 Definiciones

Lactantes: a lo largo de toda la descripción, este término hará referencia preferiblemente a individuos sanos, preferiblemente menores de dos años, más preferiblemente menores de 1 año y más preferiblemente menores de 6 meses, que hayan sido predominantemente amamantados.

Individuo sano: este término se aplica preferiblemente a personas que no sufran ningún tipo de afección crónica o aguda de acuerdo con los criterios de médicos especialistas. Preferiblemente, dicha afección provoca la inflamación del epitelio intestinal, y más preferiblemente se trata de la celiaquía.

5 Alergias alimentarias: a lo largo de toda la descripción, este término hará referencia preferiblemente a las alergias alimentarias ocasionadas preferiblemente por: leche, huevos, legumbres, frutos secos, crustáceos, pescado, moluscos, sésamo, semillas de girasol, semillas de algodón, semillas de amapola, judías, guisantes, lentejas y, más preferiblemente, por gluten.

10 Respuesta proinflamatoria de tipo Th1: es la respuesta a un estímulo que causa una elevada producción de citoquinas de tipo Th1, y preferiblemente de la citoquina IFN- $\gamma$ , que es preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más preferiblemente al menos 10 veces y aún más preferiblemente al menos 4 veces más alta que la del control.

15 Respuesta proinflamatoria de tipo Th2: es la respuesta a un estímulo que causa una elevada producción de citoquinas de tipo Th2, y preferiblemente de la citoquina IL4, que es al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 15 veces, más preferiblemente al menos 10 veces y aún más preferiblemente al menos 4 veces más alta que la del control.

20 Géneros o especies potencialmente probióticos: preferiblemente a lo largo de toda la descripción, este término hará referencia a las especies y cepas de las siguientes divisiones filogenéticas y géneros de células procariontas: *Archaea*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Deferribacteres*, *Deinococcus*, *Thermus*, *Cyanobacteria*, *Methanobrevibacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Peptostreptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Subdoligranulum*, *Dorea*, *Bulleidia*, *Anaerofustis*, *Gemella*, *Roseburia*, *Catenibacterium*, *Dialister*, *Anaerotruncus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Enterobacteriaceae*, *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Akkermansia*, *Bacillus*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, etc. Así como las especies y cepas de hongos y levaduras: *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium*, entre otras.

30 Medios: este término se referirá preferiblemente a medios de cultivo, sustratos, prebióticos, fibras, compuestos bioactivos, excipientes, ingredientes, etc. que mejoren cualquier característica de los microorganismos de la invención para su uso, preferiblemente, en la preparación de medicamentos, composiciones nutritivas, composiciones, materiales de soporte, sobrenadantes y alimentos de la invención (por ejemplo, estabilidad, propiedades inmunomoduladoras, capacidades de adhesión, fermentación, hidrólisis o inactivación de agentes alérgenos, etc.).

35 Material de soporte: preferiblemente, el material de soporte es una composición alimentaria seleccionada entre: leche, yogur, queso, leche fermentada, productos alimentarios a base de leche fermentada, cereales fermentados, harinas, zumos, azúcar, pasteles, helados, formulaciones para niños, etc.

40 Medicamento: a lo largo de toda la descripción, este término hará referencia a composiciones o formulaciones farmacéuticas destinadas preferiblemente al tratamiento o prevención de: alergias, alergias alimentarias, trastornos inflamatorios intestinales, infecciones gastrointestinales y la translocación de microorganismos patógenos o sus toxinas, alteración del equilibrio intestinal (disbiosis), crecimiento bacteriano excesivo, alteración de la permeabilidad intestinal, intolerancia alimentaria, enfermedad celíaca, síndrome de malabsorción, etc.

45 Composición alimentaria: a lo largo de toda la descripción, este término hará referencia a alimentos (funcionales, convencionales y nuevos), suplementos dietéticos, formulas con fines alimenticios o productos nutracéuticos destinados preferiblemente al tratamiento o prevención de: alergias, alergias alimentarias, trastornos inflamatorios intestinales, infecciones gastrointestinales y la translocación de microorganismos patógenos o sus toxinas, alteración del equilibrio intestinal (disbiosis), crecimiento bacteriano excesivo, alteración de la permeabilidad intestinal, intolerancia alimentaria, enfermedad celíaca, síndrome de malabsorción, etc.

50 Compuesto bioactivo obtenido a partir de un microorganismo: cualquier compuesto o molécula que forme parte del microorganismo como: parte estructural, componente celular, fracción subcelular, metabolito o molécula secretada; que se puede obtener mediante técnicas físico-químicas o biotecnológicas, incluidas, entre otras: la centrifugación, filtración, liofilización, precipitación, tratamiento con ultrasonidos, ruptura celular por medios mecánicos y químicos, extracción de compuestos a partir de cultivos mediante el uso de enzimas y/o agentes químicos, separación mediante el uso de técnicas cromatográficas, clonación y sobreexpresión de los genes que codifican las moléculas bioactivas que son capaces de desempeñar una función beneficiosa para la salud.

60

### Descripción de los dibujos

**Figura 1.** Análisis del perfil de proteínas de las diferentes digestiones de gliadinas por SDS-PAGE. Panel A: 1) control de gliadinas tras la digestión con pepsina (G-P); 2) control de gliadinas tras la digestión con pepsina y tripsina (G-P-T); 3) G-P incubadas con la cepa de la invención; 4) G-P-T incubadas con la cepa de la invención (*Bifidobacterium* IATA-ES1). Panel B: 1) control G-P; 2) control G-P-T; 3) G-P incubadas con la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCD0712.; 4) G-P-T incubadas con la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCD0712.

**Figura 2.** Cromatograma obtenido de la fracción dializable de la digestión de gliadinas *in vitro*. El pico 2 es el preferiblemente hidrolizado por la cepa de la invención.

**Figura 3.** Alteración de la viabilidad de la célula (medida como actividad endolisosómica) provocada por la fracción de gliadinas soluble y digerida (Gld), en presencia o ausencia de bifidobacterias *in vitro*. Albúmina bovina —BSA— (control negativo); BifA2 (*B. animalis*); Bb (*B. bifidum*) y BL (cepa de la invención —*Bifidobacterium longum* IATA-ES1—). Los resultados se expresan en valores medios y las desviaciones estándar se determinan por cuadruplicado.

**Figura 4.** Producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y expresión del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) en cultivos de células Caco-2 expuestos a la fracción de gliadinas soluble y digerida (Gld), en presencia o ausencia de bifidobacterias *in vitro*. Albúmina bovina —BSA— (control negativo); BifA2 (*B. animalis*); Bb (*B. bifidum*) y BL (cepa de la invención —*B. longum* IATA-ES1—). Los resultados se expresan en valores medios y las desviaciones estándar se determinan por cuadruplicado.

### Descripción detallada de la invención

La presente descripción se refiere a un procedimiento para seleccionar microorganismos o cepas de microorganismos capaces de modular la respuesta inmunitaria en alergias alimentarias, que comprende: (a) aislamiento de microorganismos a partir de muestras procedentes de individuos sanos, preferiblemente lactantes, y (b) selección de aquellos microorganismos de la etapa anterior capaces de modular la respuesta inmunitaria y de hidrolizar, inactivar u obstaculizar el mecanismo de acción de al menos un agente causante de alergias alimentarias, preferiblemente de enfermedad celíaca. Los microorganismos seleccionados en la etapa (a) pertenecen preferiblemente a géneros o especies potencialmente probióticas.

Otro aspecto de la invención se refiere a microorganismos capaces de hidrolizar, inactivar u obstaculizar el mecanismo de acción de al menos un agente causante de alergias alimentarias, y de modular la respuesta inmunitaria. Estos microorganismos se pueden usar preferentemente para el tratamiento o la prevención de alergias alimentarias, trastornos inflamatorios intestinales, desequilibrios en el ecosistema intestinal (disbiosis), crecimiento bacteriano excesivo, síndrome de malabsorción, infecciones gastrointestinales y translocación de microorganismos patógenos o sus toxinas, y alteraciones de la permeabilidad intestinal.

La invención también proporciona microorganismos útiles para la producción de formulaciones que reduzcan los riesgos y mejoren el estado de salud de individuos que padezcan o sean susceptibles de padecer trastornos relacionados con la ingesta de gluten mediante diversos mecanismos de acción, caracterizados por tratarse de microorganismos no modificados genéticamente, aislados y seleccionados a partir de la microbiota intestinal de individuos sanos por sus propiedades antiinflamatorias y reguladoras.

Sus múltiples mecanismos de acción incluyen por ejemplo, y sin que limite el alcance de la invención: (i) la regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa ocasionada por los péptidos tóxicos e inmunogénicos del gluten; (ii) la reducción de la concentración de epitopos tóxicos en el lumen intestinal mediante el transporte e hidrólisis de los péptidos del gluten; (iii) el fortalecimiento de la función de barrera defensiva frente a bacterias u otros agentes proinflamatorios y con factores de virulencia aislados del tracto gastrointestinal de pacientes celíacos, y (iv) la aportación de actividades enzimáticas, sumadas a las peptidasas, que favorecen la digestión y aporte de nutrientes para aliviar los síndromes de malabsorción típicos de estos pacientes. Este microorganismo podría ejercer efectos beneficiosos añadidos a los mencionados, de manera ilustrativa y sin que limite el alcance de la invención, al reducir el estrés oxidativo asociado a la inflamación, regular la permeabilidad intestinal, favorecer la colonización de bacterias beneficiosas Gram-positivas con funciones protectoras, regular la función de células presentadoras de antígenos, inhibir la interacción de los péptidos tóxicos con las células epiteliales e inmunocompetentes del hospedador, interaccionar con las metaloproteasas, regular el ciclo celular y la apoptosis, regular el crecimiento y la diferenciación celular y regular las funciones neuroendocrinas. (De Stefano y col. 2007. Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. *Eur J Pharmacol.* 2;566 (1-3):192-9; Silano y col. 2007. A decapeptide from durum wheat prevents celiac peripheral blood lymphocytes from activation by gliadin peptides. *Pediatr Res.* 61(1):67-71; Gross y col. 2007. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 3(7):918-32).

Los microorganismos de la invención pertenecen preferiblemente al género *Bifidobacterium*. Los microorganismos de este género ofrecen ventajas para la formulación de alimentos, alimentos nuevos, probióticos, simbióticos, suplementos, productos nutraceuticos y formulaciones farmacéuticas para el tratamiento o la prevención de la celiaquía y los trastornos relacionados con dicha enfermedad. Las bifidobacterias presentan una habilidad especial para colonizar el tracto intestinal de los recién nacidos, por lo que contribuyen de forma significativa al desarrollo de sus defensas.

Los microorganismos de la invención pertenecen a la especie *B. longum*. Como ejemplo, y sin que limite el alcance de la invención, la cepa de la invención perteneciente a esta especie se ha aislado a partir de heces de lactantes sanos y se ha identificado por secuenciación del gen del ARNr 16S (Ejemplo 6) y del gen *tuf*. El fragmento secuenciado (1437 bases) se amplificó por PCR utilizando los cebadores 27f y 1401r y para la secuenciación se emplearon además los cebadores 530f y U-968f de acuerdo con los procedimientos descritos por otros autores (Satokari y col. 2001. Appl Environ Microbiol. 67, 504-513; Favier y col. 2002. Appl Environ Microbiol. 68, 219-226). Mediante el alineamiento de la secuencia obtenida con las existentes en las bases de datos (GenBank) se detectó máxima similitud con las secuencias equivalentes de 14 cepas distintas de la especie *B. longum* y, entre ellas, *B. longum* BG3 (número de acceso AY735403.1). Se amplificó y se secuenció parte del gen *tuf* (498 pb) utilizando los cebadores descritos por Ventura y col. (Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(11):6908-22). En este caso también se detectó máxima similitud con las especies *B. longum* y, especialmente, con la secuencia correspondiente a la cepa *B. longum* ATCC 15707 (número de acceso AY372042.1) siguiendo el mismo procedimiento.

De esta manera se evidencia que *B. longum* presenta propiedades idóneas para la regulación del sistema inmunitario de la invención de manera análoga a como lo podrían hacer otras cepas de este género y especie seleccionadas específicamente, y que ejerce los mismos efectos beneficiosos en individuos con trastornos relacionados con la ingesta de gluten.

La invención se refiere a una cepa bacteriana que pertenece a la especie *B. longum* y que ha sido depositada en la Colección española de cultivos tipo (CECT), con sede en Burjassot (Valencia), el día 20 de diciembre de 2007, correspondiéndole el número de depósito CECT 7347. Esta cepa pertenece a la especie *B. longum* de acuerdo con la homología de la secuencia del gen del ARNr 16S con otras actualmente disponibles en las bases de datos (GenBank), como se describe en el ejemplo 6; e, igualmente, de acuerdo con la homología del gen *tuf* con el de otras cepas de esta especie. Esto último constituye un ejemplo de una cepa del género *Bifidobacterium* con unas propiedades que permiten usarla en formulaciones farmacéuticas o medicamentos, alimentos (nuevos o funcionales) o suplementos nutritivos o alimentarios.

La cepa de la invención se puede combinar con otros microorganismos y compuestos bioactivos para mejorar sus propiedades protectoras y metabólicas mediante acciones sinérgicas o complementarias, como el aumento de la síntesis total de citoquinas reguladoras y sus tipos, el aumento de la capacidad inhibitoria frente a bacterias patógenas y de la función de barrera intestinal, y el aumento del aporte de peptidasas y otras enzimas que favorezcan la digestión incrementando su concentración total o aumentando su tipo y especificidad.

De este modo, otro aspecto de la presente invención comprende la combinación de bifidobacterias con otros microorganismos o compuestos bioactivos, de forma complementaria y/o sinérgica, con lo que se favorecen las respuestas inmunoregulatorias y la degradación de péptidos tóxicos e inmunogénicos del gluten. Como ejemplo de microorganismos, la cepa *B. longum* ATCC 15707 puede reforzar el efecto inmunomodulador de la cepa de la invención, debido a su gran capacidad para inducir la síntesis de IL-10, tal como se demuestra en la tabla 1 (Ejemplo 1); esta acción complementaria además la de la inducción de TGF- $\beta$  producida únicamente por la segunda cepa (Tabla 1, ejemplo 1). Al mismo tiempo, la cepa *Lactococcus lactis* NCD0712 puede complementar e intensificar la degradación de los péptidos del gluten debida a las bifidobacterias y, así, reducir la concentración de epitopos tóxicos del gluten y los daños intestinales y extraintestinales que ocasionan, debido a que posee, además de peptidasas intracelulares, actividad proteolítica extracelular. La intensificación de la actividad proteolítica se demuestra en el ejemplo 2 y en la figura 1, en la que se puede apreciar una desaparición casi total de las bandas de proteína tras la incubación conjunta de los digeridos de gliadinas con suspensiones celulares de la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCD0712 (Figura 1, panel B, carriles 3 y 4). Esta hidrólisis fue superior a la obtenida solo con la cepa de la invención (Figura 1, panel A carriles 3 y 4).

Otro aspecto de la presente memoria se refiere a la utilización de la cepa de la invención, así como de sus equivalentes no viables inactivados por distintos procedimientos (congelación, calor, radiación, etc.), con fines inmunomoduladores.

Los microorganismos no viables de la invención inactivados por distintos procedimientos (congelación, calor, radiación, etc.) siguen pudiéndose utilizar con fines terapéuticos o preventivos y también forman parte de la presente invención. Los efectos inmunomoduladores de las bifidobacterias son ejercidos, al menos en parte, por componentes estructurales (ADN, componentes de la pared celular, etc.). Esto hace posible que las bifidobacterias mantengan



parte de sus propiedades inmunomoduladoras sin que mantengan necesariamente la viabilidad (Lammers y col. 2003. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 38: 165-72). Así, en el ejemplo 3 y en la tabla 3, se muestra que suspensiones celulares de la cepa de la invención, inactivada mediante ciclos de congelación y descongelación, pueden modular la respuesta proinflamatoria desencadenada por las gliadinas cuando se incuban junto con células mononucleares de sangre periférica, con lo cual se reduce la síntesis de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo IFN- $\gamma$ ) y se aumenta la síntesis de citoquinas reguladoras (por ejemplo IL-10).

Además, los compuestos bioactivos derivados del microorganismo de la invención tales como compuestos estructurales, compuestos resultantes del metabolismo, moléculas secretadas por cualquiera de los microorganismos o la cepa de la invención, obtenidos por técnicas muy conocidas, forman parte de la presente invención y también se pueden usar para modular las respuestas inmunitarias. Por ejemplo, técnicas físico-químicas y biotecnológicas entre las que se encuentran: la centrifugación, filtración, liofilización, precipitación, tratamiento con ultrasonidos, ruptura celular mecánica y química, extracción de compuestos a partir de cultivos con enzimas y/o agentes químicos, la separación por técnicas cromatográficas, la clonación de los genes que codifican dichos compuestos y su sobreexpresión.

En el ejemplo 1 y tabla 1 se muestra que los componentes estructurales que forman parte de la envoltura celular de las bifidobacterias son responsables, al menos en parte, de inducir y producir citoquinas reguladoras (IL-10 e TGF- $\beta$ ). En el ejemplo 3 y la tabla 3, en los que se han incubado conjuntamente digeridos de gliadinas y suspensiones de células no viables de la cepa de la invención, se muestra también que los componentes estructurales de estas células son capaces de reducir la respuesta proinflamatoria ocasionada por las gliadinas y de aumentar la síntesis de citoquinas reguladoras (IL-10). Asimismo, componentes estructurales, metabolitos y sustancias secretadas por la cepa de la invención ejercieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas aisladas de individuos celíacos, tal y como se demuestra en el ejemplo 4 y la tabla 4. En dicho ejemplo se ha evaluado el efecto inhibitor de cultivos celulares de esta cepa mediante la técnica de la doble capa en la que tanto las células como los metabolitos y productos secretados se ponen en contacto con el microorganismo patógeno, de modo que los efectos inhibidores pueden deberse a la acción sinérgica de todos estos componentes. Además, se ha evaluado el efecto inhibitor de los metabolitos y compuestos secretados por las bifidobacterias al medio de cultivo utilizando como agente inhibitor los sobrenadantes de cultivo libres de células, previamente liofilizados. Así, se ha demostrado que los compuestos liberados al medio de cultivo ejercen un efecto inhibitor frente a los patógenos potenciales aislados de individuos celíacos (Tabla 5).

En una realización particular de la presente invención, los microorganismos de la invención, la composición de la invención, el sobrenadante de la invención, el extracto de la invención, la composición nutritiva o farmacéutica de la invención, la cepa de la invención, se caracterizan porque son capaces de regular o modular la respuesta inmunitaria innata y adaptativa causada por los péptidos nocivos del gluten u otras alérgenos alimentarios.

La cepa de la invención se ha seleccionado por sus propiedades inmunomoduladoras, capaces de regular las respuestas proinflamatorias de tipo Th1 características de la enfermedad celíaca y enfermedades relacionadas (el síndrome de Down, la diabetes Mellitus tipo 1, la dermatitis herpetiforme, la miopatía, la esclerosis múltiple, la artritis, el autismo, la esquizofrenia, la depresión, los linfomas y la ataxia), así como de las reacciones alérgicas de tipo Th2 que pueden originarse como consecuencia de la ingesta de proteínas de trigo y otros cereales. Las cepas se caracterizan por su capacidad de inducir una baja producción de la citoquina Th1 IFN- $\gamma$  (por ejemplo <100 pm/ml) y de la citoquina proinflamatoria IL-1 (por ejemplo <150 pm/ml) y por inducir una alta producción de las citoquinas reguladoras IL10 (por ejemplo > 800 pm/ml) y TGF- $\beta$  (por ejemplo >50 pmol/m) en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs; Ejemplo 1, Tabla 1). El perfil de citoquinas inducido por estas bifidobacterias no es una característica común a todas las bifidobacterias y bacterias ácidolácticas intestinales humanas (Ejemplo 1, Tabla 1) y la hace especialmente idónea para modular la anómala respuesta inmune que originan las proteínas del trigo en individuos predispuestos y pacientes con enfermedad celíaca activa. La detección de estos efectos inmunomoduladores cuando se usan suspensiones celulares de la cepa seleccionada como estimulantes en estos ensayos (Ejemplo 1 y tabla 1) indica que los componentes estructurales que forman parte de la envoltura celular de estas bifidobacterias son responsables, al menos en parte, de inducir la producción de citoquinas reguladoras (IL-10 e TGF- $\beta$ ) que pueden reducir los efectos tóxicos e inmunogénicos de los péptidos del gluten. Además, en el ejemplo 3 y la tabla 3 se muestra que el uso de suspensiones celulares no viables de la cepa de la invención (inactivadas por ciclos de congelación-descongelación) incubadas junto con digeridos de gliadinas son capaces de reducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo INF- $\gamma$  e IL-15) ocasionada por las gliadinas y de aumentar la síntesis de citoquinas reguladoras (por ejemplo INF IL-10). Por tanto, se demuestra que componentes estructurales de las células de las bifidobacterias pueden regular las respuestas inmunológicas anómalas ocasionadas por el gluten, sin que sea estrictamente necesario mantener la viabilidad de las bacterias.

La cepa de la invención y el compuesto bioactivo derivado de la invención se caracterizan porque son capaces de reforzar la función de barrera defensiva frente a bacterias perjudiciales, por ejemplo bacterias proinflamatorias y bacterias con factores de virulencia, aisladas del tracto gastrointestinal de los pacientes celíacos.

Los microorganismos de la invención son capaces de inhibir bacterias con potencial patogénico y tóxico aisladas del intestino de individuos celíacos (Ejemplo 4, Tablas 4 y 5). Dichos patógenos incluyen, entre otros, cepas de la especie *Escherichia coli* que codifican factores de patogenicidad (por ejemplo fimbrias) y pertenecen a grupos filogenéticos virulentos (por ejemplo el B2), cepas del género *Bacteroides* y de otros géneros productores de metaloproteasas que contribuyen a la lesión tisular, y cepas hemolíticas aisladas de biopsias duodenales. En el ejemplo 4 y la tabla 4 se demuestra el efecto inhibitorio de cultivos celulares totales de esta cepa frente a patógenos aislados de individuos celíacos, mediante el uso de la técnica de la doble capa, de modo que estos efectos pueden ser debidos a componentes estructurales, metabolitos y sustancias secretadas por la cepa de la invención. En la tabla 5, se muestra también el efecto inhibitorio de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de esta cepa que solo contienen los metabolitos y compuestos secretados por las bifidobacterias a este medio. En ambos casos los efectos de inhibición obtenidos con la cepa seleccionada son mayores que los obtenidos con otras cepas utilizadas con fines comparativos. Así, los microorganismos o la cepa de la invención pueden contribuir al restablecimiento del ecosistema intestinal y reducir la carga antigénica de origen microbiano que favorecería el proceso inflamatorio y aumentaría la permeabilidad del epitelio. Asimismo, la cepa seleccionada es capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) estimulada por la microbiota intestinal de individuos celíacos en células mononucleares de sangre periférica. Por ejemplo, concentraciones de IFN- $\gamma$  de 90,8 y de TNF- $\alpha$  de 1966,3 pmol/ml producidas por PBMCs bajo la estimulación con la microbiota de celíacos se pueden reducir a valores de 8,2 pmol/ml y 295,2, respectivamente, en presencia de la cepa de la invención (Ejemplo 7). Esta cepa también es capaz de estimular la síntesis de citoquinas reguladoras (IL-10), reducida al mismo tiempo por la microbiota intestinal de pacientes celíacos. Así, por ejemplo valores de IL-10 de 49,3 pmol/ml inducidos por la microbiota de celíacos pueden verse incrementados hasta valores de 107,5 pmol/ml por medio de la estimulación de la cepa de *Bifidobacterium* IATA-H1. A través de este mecanismo inmunomodulador la cepa seleccionada puede contribuir a restablecer el equilibrio intestinal y evitar la sobreestimulación del sistema inmune provocada por la microbiota perjudicial que, junto a la ocasionada por el gluten, puede generar un círculo vicioso que perpetúe la inflamación.

Además, los microorganismos de la invención se caracterizan por su capacidad de transportar los péptidos del gluten resultantes de la digestión gastrointestinal, con lo cual se reduce la concentración de epitopos nocivos.

Concretamente, la cepa de la invención posee la capacidad de captar péptidos tóxicos derivados de la digestión gastrointestinal de las gliadinas, a partir de productos resultantes de la digestión gástrica por la acción de la pepsina (P), así como de la digestión intestinal por la acción de la tripsina (T) y la pancreatina (X) (Ejemplo 2, Figura 1). La incubación de gliadinas en presencia de bacterias viables de las cepas seleccionadas reduce su concentración y la presencia de epitopos tóxicos determinados por el uso del anticuerpo R5 mediante ELISA sándwich y, por tanto, sus posibles efectos nocivos en el intestino y a nivel extraintestinal. Por ejemplo, la concentración de epitopos tóxicos de una muestra de gliadinas digerida con pepsina, tripsina y pancreatina (como se indica en el Ejemplo 2) de 2349 ppm de gluten determinados por ELISA sándwich se redujo a 169 ppm de gluten tras ser incubado con suspensiones celulares de la cepa de la invención. Asimismo, la incubación de la cepa de la invención con gliadina digerida en condiciones gastrointestinales y dializada, con una membrana con un límite de exclusión menor de 15 kDa, y su posterior análisis mediante HPLC en fase inversa puso de manifiesto la capacidad de estas bifidobacterias para reducir al menos en un 10% la concentración de la fracción #2, que constituía la fracción principal de gliadinas digeridas y la que contiene péptidos inmunogénicos identificados por espectroscopia de masas, propiedad que el resto de las cepas analizadas no presentaban (Ejemplo 2, Figura 2). Se han demostrado los efectos biológicos sobre el epitelio intestinal de esta propiedad de la cepa *B. longum* IATA-ES1 tras la incubación de los diferentes digeridos de gliadinas en cultivos de células Caco-2, tal como se describe en el Ejemplo 8. Este ejemplo demuestra que, de este modo, la cepa de la invención puede aumentar la viabilidad de las células epiteliales, a diferencia del resto de las cepas analizadas (Ejemplo 8, Figura 3). Además, la incubación conjunta de la cepa de la invención con los digeridos de gliadinas redujo el efecto de estas sobre la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y la expresión del factor  $\text{N}\kappa\text{B}$  responsable de la expresión de genes proinflamatorios (Ejemplo 8, Figura 4).

La capacidad de la cepa de la invención para captar los oligopéptidos derivados de la digestión de las gliadinas se reproduce en condiciones intestinales y en presencia de sales biliares. Esta capacidad se potencia mediante la incubación conjunta con *Lactococcus lactis* NCD0712 que, pese a que no llega a colonizar el intestino grueso, puede actuar como coadyuvante en las primeras etapas de la hidrólisis del gluten ingerido, por la acción de su proteasa anclada a la pared y de otras peptidasas (Ejemplo 2, figura 1). La intensificación de la actividad proteolítica por la acción de *Lactococcus lactis* NCD0712 se demuestra en la figura 1, en la que se puede apreciar una desaparición casi total de las bandas de proteína tras la incubación conjunta de los digeridos de gliadinas con suspensiones celulares de la cepa de la invención y *Lactococcus lactis* NCD0712 (Figura 1, panel B, carriles 3 y 4). Esta hidrólisis fue superior a la obtenida solo con la cepa de la invención (Figura 1, panel A carriles 3 y 4). También puede potenciarse la actividad de las bifidobacterias sobre el gluten mediante su incubación junto con proteasas y peptidasas de *Lactococcus lactis* NCD0712 en forma de extractos.

La cepa de la invención puede modular la respuesta inmunitaria anormal ocasionada por la interacción de los péptidos tóxicos del gluten con las células inmunocompetentes del individuo no sólo mediante el metabolismo de los

- péptidos que actúan como antígenos nocivos, sino también mediante mecanismos de inmunoregulación (Ejemplo 3, Tabla 3). Las suspensiones bacterianas viables o inactivadas de las cepas seleccionadas incubadas junto con PBMCs en presencia de digeridos gastrointestinales de gliadinas son capaces de contrarrestar el efecto proinflamatorio de estas proteínas en distintas fases de la digestión, por acción de la pepsina (P) gástrica y de la tripsina (T) y pancreatina (X) intestinales. Esta cepa es capaz de inducir una reducción de la producción de las citoquinas proinflamatorias IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-8 e IL15, responsables de la respuesta inmunitaria adaptativa e innata, así como de aumentar la síntesis de la citoquina reguladora IL-10 (Ejemplo 3, Tabla 3). Estos efectos son debidos, al menos en parte, a la inhibición de las distintas subunidades del factor nuclear (NF)  $\kappa$ B, p50, p65 (RelA), c-Rel y Rel B determinadas mediante un ensayo ELISA (Trans AM NF $\kappa$ B, Active Motive, Bélgica). La inhibición de este factor transcripcional supone la inhibición de la expresión de un gran número de genes proinflamatorios, lo que constituye un punto clave de control de los procesos de inflamación y específicamente del que se produce en la enfermedad celíaca (Jelínková y col. 2004. Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF- $\kappa$ B. FEBS Lett. 571(1-3):81-5).
- Los microorganismos de la invención y los compuestos bioactivos derivados de la invención se caracterizan por ser capaces de hidrolizar los péptidos del gluten mediante su actividad peptidásica, lo cual reduce la concentración de epitopos nocivos. A modo de ejemplo, la cepa de la invención posee peptidasas de amplia especificidad y con especificidad por sustratos que contienen prolina, que son muy abundantes en las gliadinas y limitan su hidrólisis por enzimas convencionales (Ejemplo 2, Tabla 2). Concretamente, esta cepa es una de las que posee mayor actividad iminopeptidásica (>300 U/mg proteína); asimismo, presenta actividad prolil-endopeptidásica (>8 U/mg proteína), X-prolil-dipeptidil-peptidásica (>15 U/mg proteína), prolidásica y prolinásica (>15 U/mg proteína). También posee actividad tripeptidásica (>130 U/mg proteína frente al sustrato Gleu-Gly-Gly) y leucil-aminopeptidásica (>70 U/mg proteína). La actividad de esta cepa frente a sustratos que contienen prolina, como Pro-pNA, es superior a la detectada en otras bacterias lácticas y especialmente el cociente de actividad Pro-pNA/Leu-pNA (Di Cagno y col. 2004. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and started with selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Appl Environ Microbiol. 70:1088-96; De Angelis y col. 2006. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for celiac sprue. Biochim Biophys Acta. 2006 1762(1):80-93), lo que favorece la hidrólisis específica de los péptidos del gluten que poseen un alto contenido en prolina.
- De este modo, la cepa de la invención y los compuestos bioactivos derivados de la invención poseen una actividad metabólica añadida a la de las peptidasas (por ejemplo: fosfatasa, esterasa, lipasa, galactosidasa, glucosidasa y N-acetil-glucosaminidasa) que ayudan a digerir los nutrientes que ingerimos con la dieta, y mejoran el síndrome de malabsorción y desnutrición característico de pacientes celíacos.
- Finalmente, otra forma de realización particular consiste en el uso del microorganismo de la presente invención y los compuestos bioactivos derivados de la invención en combinación con otros microorganismos, en la producción de formulaciones para la reducción de riesgos y la mejora del estado de salud de pacientes aquejados de enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten u otras alergias alimentarias.
- Las formulaciones elaboradas mediante la cepa de la invención pueden producirse a escala industrial y dar lugar a, entre otras y sin que limite el alcance de la invención, diferentes formas de presentación al consumidor: alimentos (funcionales, nuevos y convencionales), suplementos, productos nutracéuticos, composiciones farmacéuticas, probióticos y/o simbióticos o nuevos alimentos.
- La cepa de la invención posee capacidad de adhesión a mucina (1-4%) y es resistente al pH ácido del estómago (2,0; 2,5 y 3,0) y a las altas concentraciones de sales biliares (0,5; 1,0; 2,0; y 3,0%) presentes en el intestino delgado, que constituyen las principales barreras biológicas que limitan la supervivencia de los probióticos a su paso por el tracto gastrointestinal, así como durante los procesos de fermentación de alimentos y su período de almacenamiento (Ejemplo 5, Tabla 6). Por ejemplo, esta cepa mantiene una viabilidad y capacidad de crecimiento del 56-86% tras 90 min de incubación a pH 2,0-2,5. Por lo tanto, esta cepa cuenta con mayores posibilidades de sobrevivir y conservar su funcionalidad que otras cepas aisladas y algunos probióticos que se comercializan actualmente, como se observa en la Tabla 6. Esta cepa además resiste el tránsito gastrointestinal *in vivo*. Tras su administración en forma de leche fermentada durante 4 semanas a dosis de  $10^7$ - $10^8$  ufc/ml en dos tomas diarias, se recupera en heces y su concentración respecto a la inicial (sin ingestión de productos probióticos) aumenta al menos en 1 unidad logarítmica. Las bifidobacterias seleccionadas crecen y se mantienen viables en diversos alimentos y bebidas, constituyendo vehiculos idóneos para su consumo. Por ejemplo, son capaces de fermentar y coagular la leche y se podrían utilizar para la elaboración de leches fermentadas y otros derivados lácteos. También resisten tratamientos tecnológicos de producción y conservación de alimentos, suplementos y formulaciones farmacéuticas, como por ejemplo la liofilización y las temperaturas de refrigeración, lo que garantiza su explotación industrial.

Un aspecto particular de la presente invención comprende el uso de la cepa de la invención o compuestos bioactivos derivados de la invención en la elaboración de formulaciones en forma de alimento.

De esta manera los microorganismos de la invención, pueden formar parte de un alimento formulado para aportar, más allá de su valor nutricional habitual, un efecto beneficioso sobre la reducción de riesgos y la mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten.

5 Otro aspecto particular de la presente invención comprende el uso de la cepa de la invención, o los compuestos bioactivos derivados de la invención, en la elaboración de preparados en forma de productos nutracéuticos — definidos como sustancias naturales bioactivas presentadas en una matriz no alimenticia—, que en este caso ejercerían efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, que verían reducidos sus riesgos y mejorarían su estado de salud.

10 En el caso del uso de los microorganismos, la cepa de la invención o los compuestos bioactivos derivados de la invención para obtener un suplemento dietético o alimentario, incluiría en su composición el microorganismo o sus compuestos bioactivos derivados, con el objeto de complementar la dieta por motivos de salud y, en este caso concreto, con el fin de ejercer efectos beneficiosos sobre los pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo sus riesgos y mejorando su salud.

15 Otro aspecto particular de la presente invención comprende el uso de los microorganismos de la invención, la cepa de la invención o compuestos bioactivos de la invención en la elaboración de preparados farmacéuticos. De esta forma, se utilizaría en la preparación de composiciones biológicamente activas, aptas para su uso como medicamentos, que ejercen un efecto beneficioso sobre la reducción de riesgos y la mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten.

20 En otra forma de realización particular de la invención, se utilizaría la cepa de la invención o compuestos bioactivos de la invención en la preparación de probióticos y/o simbióticos (combinaciones de probióticos y prebióticos), que contendrían estos microorganismos, por ejemplo vivos o liofilizados, en cantidades adecuadas y en condiciones que les permitan ejercer sus efectos beneficiosos o terapéuticos sobre individuos con alergias alimentarias, preferiblemente las relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo de este modo sus riesgos y se mejorando su estado de salud.

25 Un último objeto particular de la presente invención comprende el uso de la cepa de la invención o compuestos bioactivos de la invención en la preparación de nuevos alimentos. Entendiendo como nuevos alimentos cualquier alimento o ingrediente que no se haya usado de forma habitual para consumo humano en la Unión Europea a partir del 15 de mayo de 1997, que ejercerían efectos beneficiosos en pacientes aquejados de enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, lo cual reduciría sus riesgos y mejoraría su estado de salud.

30 **Ejemplos de formas de realización de la invención**

### **Ejemplo 1**

35 **Procedimiento de selección de cepas del género *Bifidobacterium* en función de su capacidad para modular la producción de citoquinas en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)**

#### 1. Preparación de los cultivos y sobrenadantes de las bifidobacterias y otras bacterias lácticas intestinales

45 Las cepas se inocularon en 10 ml de caldo MRS (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) con un contenido de un 0,05% de cisteína (MRS-C) al 1% con un cultivo de 24 h y se incubaron durante 22 h a 37°C en anaerobiosis. (AnaeroGen; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las células se recogieron por centrifugación (6,000 g, 15 min), se lavaron dos veces en PBS (fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 130 mM, pH 7,4), y se resuspendieron en PBS con un contenido de un 20% de glicerol. Se congelaron con nitrógeno líquido alícuotas de estas suspensiones y se conservaron a -80°C. El número de células viables tras el ciclo de congelación-descongelación se determinó mediante recuento en placas de MRSC tras incubar durante 48 h. La viabilidad fue superior al 90% en todos los casos. Cada alícuota se utilizó para un solo ensayo. A fin de evaluar los efectos de bacterias muertas, algunas de las alícuotas se inactivaron por frío (3 ciclos de congelación a -20°C y descongelación) y por calor (30 min a 80°C). Los valores de pH de los sobrenadantes obtenidos se ajustaron a 7,2 con NaOH y se esterilizaron por filtración (tamaño de poro de 0,22-µm, Millipore, Bedford, MA) para eliminar la posible presencia de células viables. Se conservaron alícuotas de los sobrenadantes libres de células a -80°C hasta su uso.

#### 2. Aislamiento y estimulación de PBMCs

60 Las PBMCs se aislaron a partir de sangre periférica de 4 voluntarios sanos (edad media 30 años, intervalo 24-40) en tubos con heparina. El aislamiento de PBMCs se realizó por centrifugación en gradiente de Ficoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las células se lavaron con medio RPMI 1640 (Cambrex, Nueva York, EE.UU.) y se ajustaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 que además contiene un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España), L-glutamina 2 mM, 100 µg/ml de estreptomina y 100 U/ml penicilina (Sigma).

Las PBMCs se incubaron en placas de poliestireno de fondo plano de 24 pocillos (Corning, Madrid, España) en presencia o ausencia de agentes estimulantes a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Como estímulo se utilizaron suspensiones de bacterias vivas y muertas de 1 x 10<sup>6</sup> ucf/ml, y volúmenes de sobrenadantes de 150 µl. Como control positivo, se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1 µg/ml. Como control negativo, se ensayó la producción de citoquinas en PBMCs no estimuladas. Cada tipo de estímulo fue ensayado por duplicado en cada experimento. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron por centrifugación, se fraccionaron y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta la detección de citoquinas.

### 3. Determinación de citoquinas

Las concentraciones de citoquinas (IL-1, IFN-γ, IL-10, y TGF-β) de los sobrenadantes se midieron mediante kits ELISA de Bioscience (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial.

15 TABLA 1. *Propiedades inmunomoduladoras de bifidobacterias y otras bacterias lácticas intestinales. Efecto de bacterias viables sobre la producción de citoquinas por PBMCs*

Estímulo	Producción citoquinas (pm / ml)			
	IL-1	IFN-γ	IL-10	TGF-β
RPMI	ND	9,0±1,0	58,0±3,0	ND
LPS	ND	12,0±0,5	399,0±8,0	ND
<sup>1</sup> ES1	103,0±37,0	10,1±1,0	2459,0±28,0	236,0±119,0
<sup>2</sup> A2	255,0±1,0	13,0±2,0	699,0±396,0	ND
<sup>3</sup> ATCC15707	-	66,1±23,9	4098,4±1551,7	-
<sup>4</sup> BIR-324	ND	11,0±5,0	469,0±15,0	ND
<sup>5</sup> W11	-	160,4±6,8	486,0±236,4	-
<sup>6</sup> BB536	-	143,7±18,3	1390,0±268,8	*
<sup>7</sup> LM1V	233,0±99,0	27,0±15,0	166,0±53,5	ND

ND, no detectada  
 -, no evaluada  
<sup>1</sup>Cepa de la invención *Bifidobacterium* (IATA-ES1), <sup>2</sup>*Bifidobacterium* IATA-A2, <sup>3</sup>*Bifidobacterium longum* ATCC15707, <sup>4</sup>*Bifidobacterium* BIR-324, <sup>5</sup>*Bifidobacterium longum* W11, <sup>6</sup>*Bifidobacterium longum* BB536, <sup>7</sup>*Lactobacillus reuteri* LM1V

### Ejemplo 2

#### Procedimiento de selección de bifidobacterias capaces de hidrolizar y transportar los péptidos del gluten y reducir de ese modo su toxicidad

La capacidad de las cepas para hidrolizar las proteínas y péptidos derivados del gluten se ha medido mediante la cuantificación de la actividad de peptidasas intracelulares de amplio espectro y específicas para hidrolizar secuencias peptídicas que contienen prolina, presentes en los péptidos responsables de las respuestas inmunitarias y tóxicas del gluten. Las células de cultivos bacterianos de 16-18 horas crecidas en MRSC se recogieron por centrifugación (9000 x g durante 10 minutos a 4°C) se lavaron dos veces con tampón Tris 50 mM a pH 7 y se resuspendieron en el mismo tampón concentrado 10 veces respecto al volumen del cultivo inicial. La ruptura de las células se realizó mecánicamente en un Bead-Beater (Biospec Products, EE.UU.) agregando 2 volúmenes de bolitas de vidrio por cada volumen de células y aplicando 2 pulsos de 1,5 minutos. El sobrenadante obtenido tras centrifugar (8000 g, 10 min) para eliminar células y fragmentos insolubles se utilizó como extracto enzimático para los ensayos de actividad. Los sustratos ensayados fueron los siguientes: Leu-paranitroanilida (-pNA) para detectar aminopeptidasas de amplia especificidad, Leu-Leu-Gly para detectar aminopeptidasas y tripeptidasas de amplia especificidad, Suc-Ala-Pro-pNA para detectar prolil-endopeptidasas, Pro-AMC para detectar iminopeptidasas, Gly-Pro-AMC para detectar X-prolil-dipeptidil-peptidasas; Val-Pro para detectar prolidasas y Pro-Gly para detectar prolinasas. En el caso de sustratos derivados de la paranitroanilida, la mezcla de reacción consistió en 200 µl de tampón fosfato 50 mM, a pH 7,2 con un contenido de sustrato 0,5 mM y 50 µl del extracto enzimático. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante un máximo de 30 min. La hidrólisis del sustrato y liberación de la paranitroanilina se monitorizó a 419 nm en un espectrofotómetro (550 Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La hidrólisis de los péptidos se determinó

mediante el ensayo de la L-amino ácido oxidasa (Hejgaard, 1978, Rapad assay to detect peptidases in column effluent fractions using L-amino acid oxidase. Analytical Biochem 90: 835-839). Se incubaron 100 µl del tampón de reacción con una concentración 0,05 mM, con 50 µl del extracto enzimático durante 20 min. Tras este período se añadieron 100 µl del reactivo de la L-amino ácido oxidasa y tras 5 minutos de incubación se midió la absorbancia a 530 nm. La concentración de la proteína se midió por el método de Bradford utilizando el kit comercial de BioRad (Hercules, CA, EE.UU.). Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 µmol de sustrato a 37°C durante 1 minuto. Las actividades se expresaron en U/mg de proteína.

La capacidad de las cepas para transportar e hidrolizar los péptidos derivados de la digestión de las gliadinas se determinó mediante electroforesis. En este caso, las suspensiones celulares se ajustaron a una densidad óptica de 4 a 655 nm, equivalente a 10<sup>9</sup> ucf/ml y se incubaron con tres hidrolizados distintos de gliadinas a una concentración final de 300-600 µg/ml en PBS al que se añadió un 0,2% de glucosa. Los hidrolizados de gliadinas (Sigma, St. Louis, MO) se obtuvieron simulando el proceso de digestión gastrointestinal del siguiente modo: A) 100 g de gliadinas se digirieron en un litro de HCl 0,2 N (pH: 1,8) con 2 g de pepsina purificada a 37° durante 2 h (a este hidrolizado se le denominó G-P). B) La digestión resultante, se digirió con tripsina añadiendo 2 g de tripsina después de ajustar el pH a 8 con NaOH 2N (a este hidrolizado se le denominó G-P+T). C) El doble digerido fue tratado después con 2 g de pancreatina y agitado durante 2 horas a pH 8 (a este hidrolizado se le denominó G-P+T+X). Tras cada etapa de digestión se centrifugó a 10,000 g durante 10 min, y se guardó el sobrenadante para los ensayos siguientes a -20°C. La inactivación de los digeridos se realizó mediante incubación a 100°C durante 30 minutos. Las suspensiones bacterianas se incubaron en presencia de los tres hidrolizados de gliadinas (A, B y C) durante 6 horas, a 37°C, en anaerobiosis. Los cambios en la viabilidad durante las incubaciones se determinaron utilizando el sistema comercial LIVE/DEAD BacLight Kit (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) para microscopía siguiendo las instrucciones del fabricante. El recuento de bacterias vivas (verdes) y muertas (rojas) se efectuó en un microscopio de epifluorescencia BX 51 Olympus (Tokio, Japón). En todos los casos se detectaron mínimas pérdidas de viabilidad (0,0-11,5%) tras la incubación. Tras el período de incubación se centrifugó para eliminar las células y proteínas insolubles y los sobrenadantes se esterilizaron por filtración (tamaño de poro de 0,22-µm, Millipore, Bedford, MA) para eliminar la posible presencia de células viables. La capacidad de las cepas para transportar y utilizar los distintos hidrolizados de gliadinas se determinó evaluando la desaparición de bandas en geles convencionales de poliacrilamida al 15% y en geles Tris-Tricine (geles Ready Gel 10-20% gradiente lineal, 4% gel de apilamiento o *stacking*, Bio-Rad, Barcelona, España) para separación de péptidos. Las proteínas se visualizaron por tinción Coomassie Brilliant Blue R-250. La reducción de epitopos tóxicos resultantes del transporte y digestión de gliadinas por acción de las bacterias seleccionadas se evaluó mediante ensayo ELISA sándwich R5 (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

TABLA 2. Actividad peptidásica de cepas de bifidobacterias y lactobacilos de origen intestinal frente a sustratos sintéticos

Cepas	Actividad específica (U/mg proteína)*						
	Val-Pro	Pro-Gly	Leu-Gly-Gly	Pro-pNA	Leu-pNA	Suc-Ala-Pro-pNA	Gly-Pro-pNA
<sup>1</sup> ES1	18,0±3,5	15,7±3,8	132,3±7,2	480,2±91,7	80,0±8,9	8,5±1,9	17,1±0,0
<sup>2</sup> A2	27,1±14,0	27,1±07,5	326,1±15,9	140,5±6,4	176,5±3,5	18,5±4,8	60,43±11,0
<sup>3</sup> 15707	27,4±2,0	37,9±0,8	-	-	5,1±0,5	0,02±0,6	0,2±0,5
<sup>4</sup> LmV1	9,34±0,7	10,3±0,6	24,6±2,7	7,8±3,7	61,8±3,4	8,0±3,5	15,2±3,2
* Media ± SD -, no evaluada <sup>1</sup> Cepa de la invención (IATA-ES1), <sup>2</sup> <i>Bifidobacterium</i> IATA-A2, <sup>3</sup> <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC15707, <sup>4</sup> <i>Lactobacillus reuteri</i> LM1V.							

**Ejemplo 3**

**Regulación de la respuesta inmunológica provocada por las gliadinas en células inmunocompetentes mediante su incubación conjunta con las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas por sus propiedades inmunomoduladoras**

Se incubaron suspensiones de la cepa seleccionada (10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> UFC/ml), así como otras incluidas con fines comparativos, junto con los distintos hidrolizados de gliadinas (P, P+T y P+T+P), obtenidos tal y como se describe en el ejemplo 3, y PBMCs a una concentración de 10<sup>6</sup> cfc/ml durante 24 h. Como estímulos de control se utilizaron los distintos hidrolizados de gliadinas sin bacterias y LPS de *E. coli* O111:B4. También se detectó la producción basal de citoquinas sin agregar ningún estímulo. El procedimiento de aislamiento de PBMCs, y de estimulación y detección de citoquinas fue el descrito en el ejemplo 1.

TABLA 3. Producción de citoquinas por PBMCs estimuladas simultáneamente por los digeridos intestinales de gliadinas y cultivos de bifidobacterias y otras bacterias lácticas de origen intestinal no viables.

Estímulo	Producción de citoquinas (pm/ml)				
	IL-1	IL-8	IFN- $\gamma$	IL-10	IL-15
RPMI	ND	173 $\pm$ 17	9 $\pm$ 1	58 $\pm$ 3	ND
LPS	ND	2295 $\pm$ 83	12 $\pm$ 0,5	399 $\pm$ 8	175 $\pm$ 17
G-P	61 $\pm$ 2	4570 $\pm$ 484	42 $\pm$ 7	299 $\pm$ 149	34 $\pm$ 1
G-P+T	169 $\pm$ 22	5375 $\pm$ 13	37 $\pm$ 3	136 $\pm$ 16	149 $\pm$ 83
G-P+T+X	75 $\pm$ 1	5264 $\pm$ 122	36 $\pm$ 9	272 $\pm$ 18	25 $\pm$ 7
<sup>1</sup> ES1/G-P	123 $\pm$ 8	4921 $\pm$ 129	11 $\pm$ 1	1192 $\pm$ 752	10 $\pm$ 7
ES1/G-P+T	48 $\pm$ 4	4928 $\pm$ 288	8,2 $\pm$ 5	935 $\pm$ 426	27 $\pm$ 10
ES1/G-P+T+X	ND	5151 $\pm$ 146	2 $\pm$ 0,5	1054 $\pm$ 477	ND
<sup>2</sup> A2/G-P	109 $\pm$ 215	4480 $\pm$ 23	6,9 $\pm$ 2	395 $\pm$ 216	29 $\pm$ 8
A2/G-P+T	129 $\pm$ 4	2848 $\pm$ 45	43 $\pm$ 22	1002 $\pm$ 615	46 $\pm$ 13
A2/G-P+T+X	129 $\pm$ 1	5099 $\pm$ 30	29 $\pm$ 4	1314 $\pm$ 724	134 $\pm$ 57
<sup>3</sup> LM1V/G-P	ND	5152 $\pm$ 119	62 $\pm$ 31	721 $\pm$ 16	33 $\pm$ 4
LM1 V/G-P+T	ND	5015 $\pm$ 75	11 $\pm$ 5	458 $\pm$ 218	26 $\pm$ 4
LM1 V/G-P+T+X	ND	5189 $\pm$ 98	-82 $\pm$ 35	457 $\pm$ 257	6 $\pm$ 1
ND, no detectada <sup>1</sup> Cepa de la invención (IATA-ES1), <sup>2</sup> <i>Bifidobacterium</i> IATA-A2, <sup>3</sup> <i>Lactobacillus reuteri</i> LM1V					

## 5 Ejemplo 4

### Capacidad de las bifidobacterias seleccionadas para inhibir el crecimiento de aislados de la microbiota intestinal de pacientes celíacos con potencial patogénico

10 La actividad antimicrobiana de las cepas del género *Bifidobacterium* seleccionadas previamente en función de sus propiedades inmunomoduladoras por el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 se determinó mediante dos métodos: (i) por la técnica de la doble capa y (ii) por la técnica de difusión en agar.

15 La actividad antibacteriana de cada cepa se evaluó globalmente mediante la técnica de la doble capa utilizando como microorganismos indicadores bacterias aisladas de la flora intestinal de pacientes celíacos y con potencial patogénico. Las bifidobacterias se crecieron en placas de MRS-C en líneas de unos 2 cm y se incubaron en condiciones óptimas durante 16 h y su desarrollo posterior se inhibió con cloroformo. El microorganismo indicador se inoculó a una concentración de  $10^4$ - $10^5$  ucf/ml en 10 ml de agar semisólido adecuado, se vertió sobre la capa de agar del microorganismo protector y se incubó a 37°C en anaerobiosis. Tras 24 h se midieron los halos de inhibición 20 alrededor de las líneas del cultivo de las bifidobacterias.

A fin de evaluar la actividad antibacteriana debida a la secreción de compuestos de naturaleza proteica se utilizó la técnica de difusión en agar. Se inocularon 10 ml de caldo MRS-C al 1% con un cultivo de 24 h de cada bifidobacteria y se incubaron durante 16 h a 37°C. Los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación (12.000 g, 15 min, 4°C) y se concentraron por liofilización. Los liofilos se resuspendieron en 1 ml de tampón fosfato 50 mM a pH 6,5, se neutralizaron con NaOH hasta alcanzar un pH de 6,5 para eliminar los efectos de los ácidos orgánicos generados por fermentación, y se esterilizaron por filtración. Estas muestras constituyeron los extractos crudos en los que se determinó la posible actividad de proteínas antibacterianas producidas por las bifidobacterias. El microorganismo 25 indicador se inoculó a una concentración de  $10^4$ - $10^5$  células/ml en 10 ml de agar semisólido adecuado y se vertió sobre una capa sólida de agar del mismo medio. Tras solidificarse, se perforaron pocillos de 5 mm, a los que se añadieron 40  $\mu$ l del extracto libre de células y extractos neutralizados de cada bifidobacteria. Se dejó difundir 4 h a 4°C y, posteriormente, se incubó en las condiciones óptimas para el microorganismo indicador o patógeno. Tras la incubación se midieron los halos de inhibición alrededor del pocillo. 30

TABLA 4. Inhibición de bacterias potencialmente patógenas aisladas de pacientes celíacos por cultivos de las bifidobacterias

Cepas	Inhibición (cm) por las cepas de <i>Bifidobacterium</i>	
	IATA-A2	IATA-ES1
<i>Bacteroides</i> CAQ4	0,4	1,4
<i>Bacteroides vulgatus</i>	0,5	1,3
<i>Clostridium difficile</i>	0,9	1,6
<i>E. coli</i> CBE9	1,1	1,9
BC-BP1	0,5	1,2
BC-BO1	0,7	1,0
BC-BU1	2,3	2,0
BC-BU3	1,0	1,3

5 TABLA 5. Inhibición de bacterias potencialmente patógenas aisladas de pacientes celíacos por sobrenadantes de cultivos de las bifidobacterias

Cepa indicadora	Inhibición (cm) por <i>Bifidobacterium</i> spp.	
	IATA-A2	IATA-ES1
Bac CAQ4	0,40	0,45
Ent CBE9	0,95	1,15

10 **Ejemplo 5****Evaluación de la resistencia de bifidobacterias a condiciones de estrés gastrointestinal**

15 La resistencia de las bifidobacterias aisladas a las condiciones ácidas de los jugos gástricos, que constituyen la primera barrera biológica que limita la viabilidad de los probióticos tras su ingestión, se confirmó para cada una de las cepas estudiadas. Para ello se prepararon suspensiones de células de cada cepa ( $10^8$  células/ml) en PBS, con un contenido de 3 g/l de pepsina (Sigma, St. Louis, MO) y ajustada a pH 2 con HCl y se incubaron a 37°C durante un total de 120 min. A distintos tiempos (0, 90 y 120 min), incluido el tiempo medio de vaciado gástrico (90 min), se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad mediante recuentos en placas de agar MRS-C. Posteriormente se estudió la tolerancia de las cepas resistentes al pH ácido a otras condiciones de estrés, como la bilis, el NaCl y las altas temperaturas. Para conocer la tolerancia de las cepas objeto de estudio a la bilis, se evaluó su capacidad para crecer en MRS-C, al cual se añadieron diversas concentraciones (0,5- 1,5%) de Ox-gall (Sigma, St. Louis, MO). Se cargaron alícuotas de 200 µl de cada medio, inoculadas al 1% con cultivos de 24 h, en placas multipocillo y se incubaron a 37°C. El crecimiento se monitorizó mediante medidas de absorbancia a 655 nm en un espectrofotómetro 25 550 Microplate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA).



TABLA 6. Efecto de las condiciones gástricas sobre la capacidad de crecimiento y viabilidad de las cepas de *Bifidobacterium*

Viabilidad*				Capacidad de crecimiento †						
pH				pH						
pH				3		2,5		2		
Cepas	3	2,5	2	Control	Log ufc/ml	(%)	Log ufc/ml	(%)	Log ufc/ml	(%)
IATA-ES1	99,4±4,2	86,2±13,0	57,9±2,3	9,3±0,0	9,3±0,0	99,7	8,1±0,0	86,7	5,2±0,0	56,1
BIR 324	89,4±2,3	73,1±1,0	61,6±1,7	9,1±0,0	8,8±0,0	96,9	8,8±0,2	96,8	5,79±0,1	63,6
Bion 3	98,4±1,9	78,4±1,7	11,6±3,7	9,0±0,0	7,3±0,0	81,2	4,8±0,1	52,8	-	-
NCIMB 8809	1,8±0,5	-	-	8,1±0,0	-	-	-	-	-	-

\*Viabilidad expresada como el porcentaje de la viabilidad detectada con el sistema LIVE/DEAD BacLight Kit (Molecular Probes) en suspensiones celulares en PBS a pH 7,2, que se consideró del 100%.  
†Capacidad de crecimiento expresada como el Log ufc/ml determinados por recuento en placas de agar MRSC y expresado como porcentaje del recuento de la suspensión de células en PBS, que se consideró del 100%.  
\*, †Desviación estándar de los resultados obtenidos en tres ensayos independientes, nd, no determinado  
-, no detectado

5

TABLA 7. Tolerancia de las cepas de *Bifidobacterium* a la presencia de sales biliares

Cepas	Capacidad de crecimiento relativa* (%)				
	Concentración de oxgall (%)				
	Control	0,5	1,0	2,0	3,0
IATA-ES1	100	88,22±0,70	82,65±1,60	69,95±0,33	67,28±1,31
A2	100	73,03±0,98	64,12±1,79	60,96±0,59	38,21±1,44
BIR 324	100	62,68±3,55	43,99±1,64	38,29±0,32	37,06±0,48
NCIMB 8809	100	45,07±8,20	23,88±7,56	3,94±1,05	0,70±1,00
Bion 3	100	30,17±3,2	23,30±0,0	-	-

\*Datos expresados como el porcentaje de la velocidad de crecimiento ( $h^{-1}$ ) obtenida en ausencia de bilis, que se consideró del 100%. Desviación estándar de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

## Ejemplo 6

10

## Aislamiento e identificación de la bifidobacteria seleccionada

15

20

25

30

Se procedió al aislamiento de cepas del género *Bifidobacterium* a partir de heces de lactantes sanos que no hubieran ingerido alimentos que contuvieran bifidobacterias durante al menos el mes anterior al análisis y que no hubieran sido sometidos a tratamientos con antibióticos. Las muestras se mantuvieron a 4°C y se analizaron sin que transcurrieran más de dos horas desde su recogida. Se diluyeron dos gramos de cada una de ellas en tampón fosfato 10 mM con un contenido de NaCl con una concentración de 130 mM (PBS) y se homogeneizaron en un digestor Lab-Blender 400 (Seward Medical, Londres, Reino Unido), durante 3 min y después se diluyeron en agua de peptona. Se inocularon alícuotas de 0,1 ml de diversas diluciones decimales en MRS agar (de Man Rogosa and Sharpe; Scharlau, Barcelona) con un contenido de un 0,05% de cisteína (Sigma, St. Louis, MO; MRS-C), y 80 µg/ml de mupirocina. Tras una incubación de 48 h a 37°C en condiciones de anaerobiosis (AnaeroGen, Oxoid, Reino Unido), se seleccionaron colonias aisladas y su identidad se confirmó mediante un estudio de su morfología bajo tinción de Gram. La identidad de los aislados se confirmó mediante PCR específica de género, de acuerdo con la metodología descrita por Kaufman y col. (1997, Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1268-1273), utilizando los cebadores (LM26 y LM3) que amplifican un fragmento de 1,35 kb del gen del ARN ribosómico 16S. Además, se secuenció el gen del ARN 16S a partir de ADN total. El fragmento secuenciado se amplificó utilizando los cebadores 27f y 1401r y se purificó utilizando el sistema comercial GFX™PCR (Amershan, Bioscience, Reino Unido). Para la secuenciación se emplearon además los cebadores 530f y U-968f, de acuerdo con los procedimientos descritos por otros autores (Jonson, 1994. Similarity analysis of rRNAs. En *Methods for General and Molecular Bacteriology*; Gerhard, P.; Murray, R. G.E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R., Eds. American Society for Microbiology, Washington, DC. Pp

683-700; Satokari y col. 2001. Bifidobacterial Diversity in Human Feces Detected by Genus-Specific PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504-513; Favier y col. 2002. Molecular Monitoring of Succession of Bacterial Communities in Human Neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 219-22). La secuenciación se realizó utilizando un secuenciador automático de ADN ABI 3700 (Applied Biosystem, Foster City, CA). La búsqueda de secuencias más próximamente relacionadas se realizó en la base de datos GenBank utilizando el algoritmo BLAST (Altschul y col. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol Biol.* 215, 403-410).

### Ejemplo 7

#### 10 **Evaluación de la capacidad de cepas del género *Bifidobacterium* para regular las respuestas proinflamatorias ocasionadas por la microbiota intestinal alterada de individuos celíacos con enfermedad activa y tras el tratamiento con una dieta exenta de gluten.**

##### 15 1. Preparación de los cultivos de bifidobacterias intestinales y muestras fecales para su evaluación

Las cepas del género *Bifidobacterium* se inocularon en 10 ml de caldo MRS (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) que contiene aproximadamente 0,05% de cisteína (MRS-C) al 1% con un cultivo de 24 h y se incubaron durante 22 h a 37°C en anaerobiosis. (AnaeroGen; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las células se recogieron por centrifugación (6,000 g, 15 min), se lavaron dos veces en PBS (fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 130 mM, pH 7,4), y se resuspendieron en PBS con un contenido de un 20% de glicerol. Se congelaron con nitrógeno líquido alícuotas de estas suspensiones y se conservaron a -80°C. El número de células viables tras el ciclo de congelación-descongelación se determinó mediante recuento en placas de MRSC tras incubación durante 48 h. La viabilidad fue superior al 90% en todos los casos. Cada alícuota se utilizó para un solo ensayo.

25 Se diluyeron 1/10 en tampón de fosfato heces de celíacos con la enfermedad activa (en el momento del diagnóstico) y tratados con dieta exenta de gluten durante al menos 2 años, se homogenizaron en un digestor durante 3-5 minutos y se congelaron a -20°C para su uso como estímulo en células mononucleares de sangre periférica. También se recogieron muestras de heces de individuos sanos y se utilizaron como controles.

##### 30 2. Aislamiento y estimulación de PBMCs

Las PBMCs se aislaron a partir de sangre periférica de 4 voluntarios sanos (edad media 30 años, intervalo 24-40) en tubos con heparina. El aislamiento de PBMCs se realizó por centrifugación en gradiente de Ficoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las células se lavaron con medio RPMI 1640 (Cambrex, Nueva York, EE.UU.) y se ajustaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 que además contenía un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España), L-glutamina 2 mM, 100 µg/ml de estreptomina y 100 U/ml penicilina (Sigma). Las PBMCs se incubaron en placas de poliestireno de fondo plano de 24 pocillos (Corning, Madrid, España) en presencia o ausencia de agentes estimulantes a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Como estímulo, se usaron extractos de las heces de individuos sanos, celíacos con la enfermedad activa y celíacos con la enfermedad no activa, en presencia o ausencia de 30 µl de suspensiones de células bacterianas vivas de  $1 \times 10^6$  ucf/ml. Como control positivo, se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1 µg/ml. Como control negativo, se ensayó la producción de citoquinas en PBMCs no estimuladas. Cada tipo de estímulo fue ensayado por duplicado en cada experimento. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron por centrifugación, se fraccionaron y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta la detección de citoquinas.

##### 45 3. Determinación de citoquinas

Las concentraciones de citoquinas (IFN-γ, IL-10, y TGF-β) de los sobrenadantes se midieron mediante kits ELISA de Bioscience (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Los marcadores de las distintas poblaciones de linfocitos y de la activación se detectaron con anticuerpos anti CD4, CD8 y CD86 marcados con FITC (eBioscience, San Diego, CA) y citometría de flujo (citómetro de flujo EPICS® XL-MCL; Beckman Coulter, Florida). Se determinó la implicación de la vía de transducción de señales, mediada por el factor nuclear (NF) κB en la respuesta inmunitaria, mediante la adición de un inhibidor (lactacistina).

##### 55 Resultados

Las heces de pacientes celíacos, que presentaban alteraciones en la composición de la microbiota, indujeron una producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-α e IFN-γ) superior a la de los individuos sanos y una producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 inferior a la de los individuos sanos en PBMCs. También aumentaron la síntesis de la molécula de superficie CD86, fundamental para la activación de células T, más que la heces de control. La incubación conjunta con bifidobacterias regula el perfil de citoquinas proinflamatorias inducido por la microbiota fecal de pacientes celíacos, con la reducción de la síntesis de TNF-α e IFN-γ y el aumento de la de IL-10. La inhibición de la síntesis de citoquinas en presencia de lactacistina indica que el NF κB está involucrado en los efectos inmunomoduladores ejercidos por las bifidobacterias.

**Ejemplo 8****5 Caracterización de las fracciones de gliadinas generadas en el proceso de digestión *in vitro* y caracterización de la reducción de péptidos derivados de la digestión gastrointestinal de gliadinas por bifidobacterias y sus efectos biológicos**1. Digestión gastrointestinal de gliadinas

10 Se usó una preparación comercial de gliadinas (Sigma, G3375) que contiene cuatro de las isoformas,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ -gliadinas, de estas proteínas cuya secuencia completa de aminoácidos se encuentra disponible.

15 La solución de diferentes alícuotas (150 mg) del extracto comercial de gliadinas se llevó a cabo en una solución salina isotónica (NaCl 140 mM, KCl 5mM) a pH 3, calentando la mezcla hasta 55°C durante 30 minutos en un baño con agitación. Las muestras se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal simulada con pepsina (Sigma, P7000) (800-2500 U/mg proteína) y pancreatina porcina (P1750) (actividad, 4 x USP), y extracto de bilis (B3883).

20 La digestión gástrica (pepsina en HCl 0,1M / pH 3 / 1 h con agitación) se llevó a cabo en tubos de centrifugado (50 ml). A continuación, la etapa intestinal (pancreatina-bilis en NaHCO<sub>3</sub> 0,1M / pH 6,9-7 / 2 h con agitación) se llevó a cabo en el compartimento superior (de aporte o *giver*) (1,5 ml) de un sistema de doble cámara preparado con una membrana de diálisis (Spectra/Por 2.1, Spectrum Medical, Gardena, CA) con un tamaño de poro de 15 KDa. En el compartimento inferior (de recepción o *receiver*) se colocó una solución salina (1 ml). Una vez concluido el proceso de digestión, se cuantificó el contenido total de proteínas en el sobrenadante (4000 rpm / 5 min / 4°C) de los digeridos gastrointestinales y en el dializado mediante un kit comercial (Sigma, TP0200) basado en el método de Lowry.

2. Análisis cromatográfico de las fracciones de gliadinas por el procedimiento de digestión *in vitro*.

30 Para analizar las gliadinas, se adoptó un procedimiento cromatográfico en fase inversa. La separación se llevó a cabo en una columna BioBasic C18 (5  $\mu$ m 4,6x250 mm) utilizando un equipo Hewlett Packard 1050 HPLC. Las fases móviles consistieron en (A) acetonitrilo (ACN, calidad HPLC) acuoso al 15% (v/v) con ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v), y (B) ACN acuoso al 80% (v/v) con TFA 0,1% (v/v). El gradiente de elución utilizado fue el siguiente: 0-5 min, gradiente lineal hasta un 5% del solvente B; 5-12 min, gradiente lineal hasta un 20% del solvente B. La columna se lavó con un 100% del solvente B durante 5 minutos, y se reequilibró en las condiciones iniciales durante 3 minutos. Las muestras se filtraron a través de una membrana de nailon (13 mm, 0,22  $\mu$ m Millex GN, Millipore). Se analizaron tres alícuotas independientes de cada tratamiento (100  $\mu$ l). Se llevó a cabo un seguimiento de la absorción en la región ultravioleta a 210 nm.

3. Identificación de las secuencias peptídicas de gliadinas con cromatografía de fase inversa junto con electroespray-MsMs (RP-HPLC-ESI-MS/MS)

45 La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna BioBasic C18 (5  $\mu$ m 4,6x250 mm) utilizando un equipo Agilent HPLC system junto con un espectrómetro de masas con una trampa de iones cuádruple (Esquire-LC-Ms(n), Bruker Daltonics, Billerica, MA). El gradiente de elución cromatográfica empleado fue el descrito en la sección anterior. En el análisis se utilizó nitrógeno como nebulizador y gas de secado, y helio como gas para la colisión molecular a una presión aproximada de  $5 \times 10^{-3}$  bares. El voltaje capilar de colisión se mantuvo a 4 kV. Se realizó un seguimiento de los espectros de masas en el intervalo de masa/carga de 500-5000. El procedimiento muestra el análisis de masa media (Ms) de 15 espectros, y el análisis de masa secuencial Ms(n) de 5 espectros. El límite de la corriente iónica para llevar a cabo el análisis de masa secuencial se estableció en 5000, y los iones precursores se aislaron en un intervalo m/z de 4,0 fragmentado con una rampa de voltaje de 0,39 a 2,6V. Los datos espectrales m/z se procesaron y transformaron mediante el software de análisis proporcionado por la casa comercial (Data Analysis versión 3, Bruker Daltonics). Las secuencias peptídicas de los espectros Ms(n) se establecieron con un software de análisis (BioTools versión 2.1, Bruker Daltonics).

4. Efectos de la incubación conjunta de los digeridos gastrointestinales de gliadinas con bifidobacterias

60 Los digeridos gastrointestinales de gliadinas obtenidos en el apartado 1 se incubaron conjuntamente en presencia y ausencia de bifidobacterias intestinales, como la cepa de la invención, situadas en la parte apical (de aporte) de un cultivo en soportes Transwell de células Caco-2, adoptadas como modelo de epitelio intestinal. A fin de estimar la disminución del efecto tóxico de las gliadinas en presencia de la cepa de la invención (IATA-ES1), se midió la síntesis de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  y se midió el NF  $\kappa$ B mediante procedimientos ELISA en el cultivo de células Caco-2 de la cámara inferior (de recepción) en presencia y ausencia de las bifidobacterias (figuras 3 y 4).

## Resultados

Análisis por RP-HPLC de la fracción de proteína inferior a 15 KDa derivada de la diálisis de los digeridos gastrointestinales de gliadinas. La separación cromatográfica (figura 2) revela la presencia de las cinco fracciones peptídicas, de las que la principal es la fracción #2. Los estudios acerca de la dializabilidad de los péptidos derivados de las gliadinas en presencia de diferentes cepas bacterianas (la cepa de la invención (IATA-ES1) y *Bifidobacterium* A2, aisladas en nuestro laboratorio demostraron la capacidad proteolítica de estas bacterias sobre las gliadinas y, concretamente, sobre la fracción #2. La cepa que causó la disminución más importante de la fracción #2 fue la cepa de la invención (IATA-ES1), que redujo más del 10% de la fracción en condiciones de estudio.

## Ejemplo 9

### **Evaluación de la capacidad de las cepas del género *Bifidobacterium* para regular la maduración inducida por gliadinas y el fenotipo proinflamatorio en células dendríticas involucradas en la presentación de antígenos**

#### 1. Preparación de los cultivos de bifidobacterias intestinales y muestras de heces para su evaluación

Las cepas del género *Bifidobacterium* se inocularon en 10 ml de caldo MRS (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, España) que contenía un 0,05% de cisteína (MRS-C) al 1% con un cultivo de 24 h y se incubaron durante 22 h a 37°C en anaerobiosis. (AnaeroGen; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Las células se recogieron por centrifugación (6,000 g, 15 min), se lavaron dos veces en PBS (fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 130 mM, pH 7,4), y se resuspendieron en PBS con un contenido de un 20% de glicerol. Se congelaron con nitrógeno líquido alícuotas de estas suspensiones y se conservaron a -80°C. El número de células viables tras el ciclo de congelación-descongelación se determinó mediante recuento en placas de MRSC agar tras incubación durante 48 h. La viabilidad fue superior al 90% en todos los casos. Cada alícuota se utilizó para un solo ensayo. Antes de usar las células como estímulo, fueron lavadas por centrifugación y resuspendidas en PSB.

#### 2. Aislamiento y estimulación de células dendríticas (CD) obtenidas a partir de sangre periférica

Las PBMCs se aislaron a partir de sangre periférica de 4 voluntarios sanos (edad media 30 años, intervalo 24-40) en tubos con heparina. El aislamiento de las PBMCs se realizó por centrifugación en gradiente de Ficoll (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las células se lavaron con medio RPMI 1640 (Cambrex, Nueva York, EE.UU.) y se ajustaron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI 1640 que además contenía un 10% de suero fetal bovino (Gibco, Barcelona, España), L-glutamina 2 mM, 100 µg/ml de estreptomycin y 100 U/ml penicilina (Sigma). Las PBMCs se incubaron en placas de poliestireno de fondo plano de 24 pocillos (Corning, Madrid, España) en presencia o ausencia de agentes estimulantes a 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 h. Como estímulo se utilizó gliadina (0,1 mg/ml) e IFN-γ (150 UI) en presencia o ausencia de bifidobacterias y otras bacterias intestinales. Como control positivo, se usó lipopolisacárido (LPS) purificado de *E. coli* O111:B4 (Sigma, St. Louis, MO) a una concentración de 1 µg/ml. Como control negativo, se ensayó la producción de citoquinas en PBMCs no estimuladas. Cada tipo de estímulo fue ensayado por duplicado en cada experimento. Los sobrenadantes de los cultivos se recogieron por centrifugación, se fraccionaron y se almacenaron en alícuotas a -20°C hasta la detección de citoquinas.

#### 3. Determinación de citoquinas y marcadores de activación celular

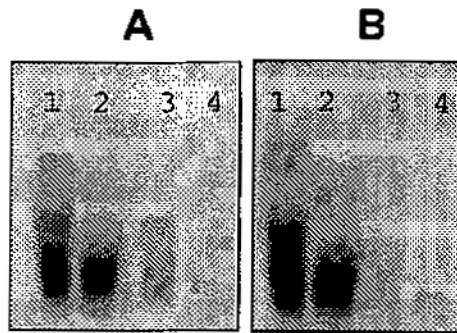
Las concentraciones de citoquinas (IFN-γ, IL-10, y TGF-β) de los sobrenadantes se midieron mediante kits ELISA de Bioscience (BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Los marcadores de la activación de moléculas se detectaron con anticuerpos contra HLA-DR, CD86, CD40 y CD83 marcados con FITC (eBioscience, San Diego, CA) y se cuantificaron mediante citometría de flujo (citómetro de flujo EPICS® XL-MCL; Beckman Coulter, Florida).

## Resultados

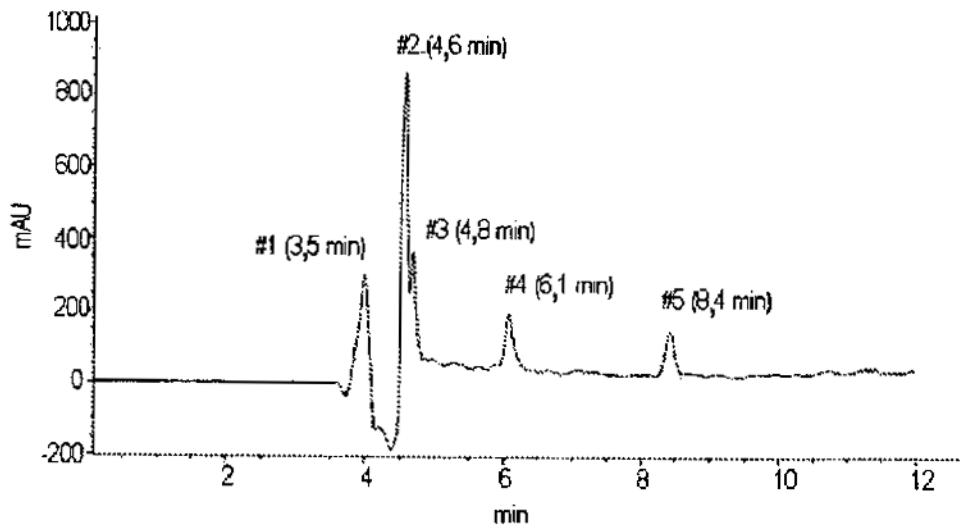
La cepa de la invención (IATA-ES1) redujo al menos en un 10% la producción de IFN-γ, la principal citoquina inflamatoria que se produce como respuesta a las gliadinas en celíacos, provocada por la estimulación de las células dendríticas con gliadinas y otras bacterias intestinales potencialmente proinflamatorias (por ejemplo, bacteroides y enterobacterias aislados de pacientes celíacos). Esta cepa también produjo un aumento en la síntesis de la citoquina antiinflamatoria IL-10 por células dendríticas de al menos el 200% en comparación con el efecto producido por la estimulación con gliadinas. La cepa de la invención (IATA-ES1) redujo la expresión de moléculas HLA-DR y CD86, inducida tras la incubación de las células dendríticas en presencia de gliadina e IFN-γ, entre un 15% y un 20%.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa de *Bifidobacterium longum* depositada en la Colección española de cultivos tipo (CECT) con el número de acceso CECT 7347.
2. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de células viables.
- 10 3. La cepa de acuerdo con la reivindicación 1, en forma de células no viables.
4. Una combinación de microorganismos, que comprende la cepa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y, al menos, otro microorganismo.
- 15 5. La combinación de microorganismos de acuerdo con la reivindicación 4, donde el otro microorganismo es *B. longum* ATCC 15707 y/o *L. lactis* NCD0712.
- 20 6. Sobrenadante de un cultivo o extracto obtenido a partir del microorganismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o a partir de la combinación de microorganismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5.
- 25 7. Un uso de la cepa *B. longum* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o de la combinación de microorganismos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 o 5; o de los sobrenadantes o extractos de acuerdo con la reivindicación 6, para la elaboración de formulaciones destinadas a reducir riesgos y mejorar el estado de salud de pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten.
- 30 8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, para la elaboración de formulaciones destinadas a la prevención y/o el tratamiento de la enfermedad celíaca.
- 35 9. Uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, donde la formulación preparada es un alimento, un producto nutracéutico, un suplemento, una composición farmacéutica, un probiótico y/o un simbiótico.
- 40 10. Composición nutritiva que comprende la cepa *B. longum* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la combinación de microorganismos de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, o los sobrenadantes o extractos de acuerdo con la reivindicación 6.
- 45 11. Composición de acuerdo con la reivindicación 10, que además comprende un vehículo.
- 50 12. Composición según la reivindicación 11, donde el vehículo es: leche, yogur, queso, leche fermentada, derivado lácteo, cereales, cereales fermentados, zumos, helados y/o formulaciones para niños.
13. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la cepa *B. longum* se halla presente en una cantidad de entre aproximadamente  $10^6$  ucf a aproximadamente  $10^9$  ucf por gramo o mililitro de la composición.
14. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde dicha composición se puede encontrar en forma de comprimido, cápsula, microcápsula, polvo, solución o pasta.
15. Composición farmacéutica que comprende la cepa *B. longum* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; o la combinación de microorganismos de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5; o los sobrenadantes o extractos de acuerdo con la reivindicación 6, junto con cantidades apropiadas de excipientes farmacológicamente aceptables.



**FIG 1**



**FIG 2**

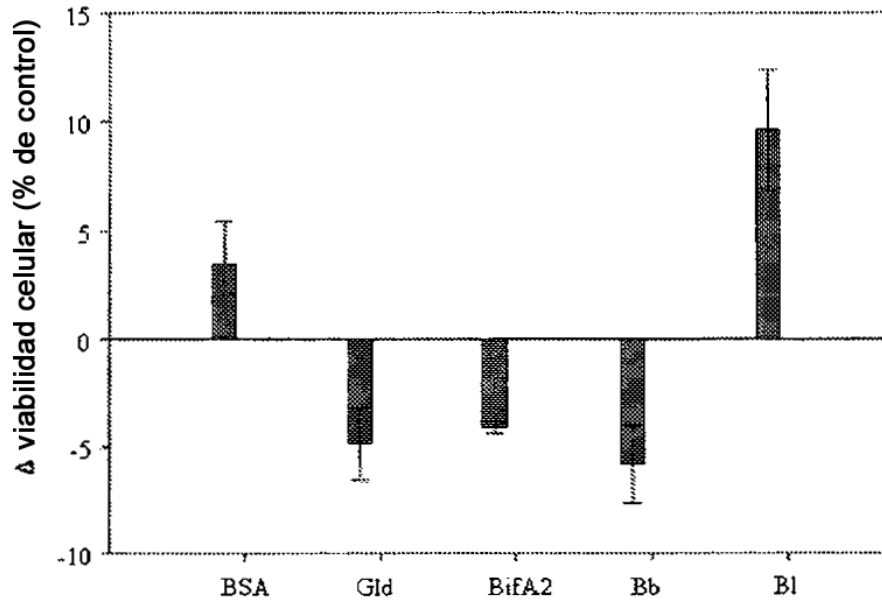


FIG 3.

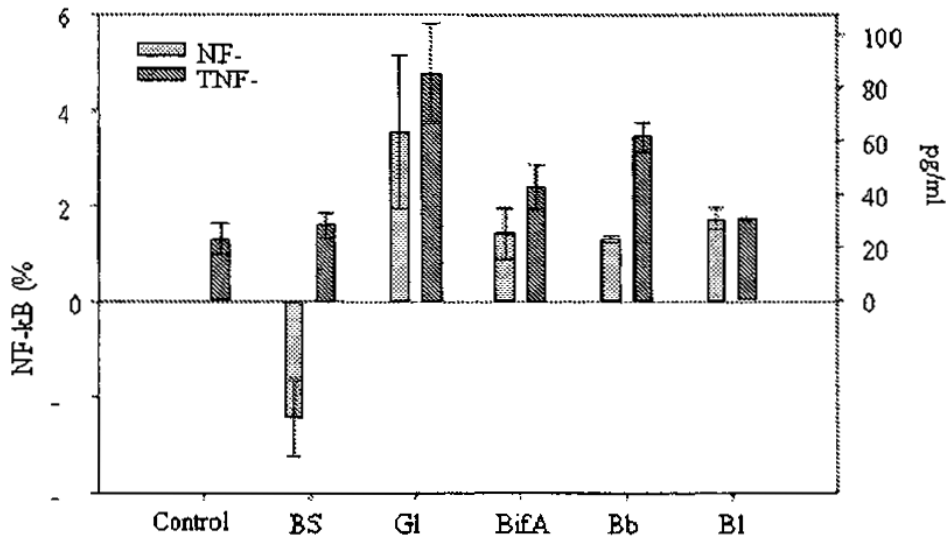


FIG 4