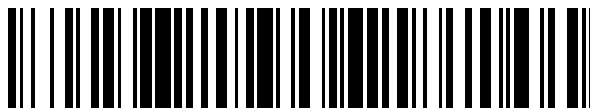


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 566**

21 Número de solicitud: 201830518

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

**A61K 35/747** (2015.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**31.05.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.02.2019**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**11.04.2019**

Fecha de concesión:

**24.09.2019**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**01.10.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE LEÓN (60.0%)**

**Avenida de La Facultad 25**

**24071 León (León) ES y**

**GERENCIA REGIONAL DE SALUD DE CASTILLA  
Y LEÓN (40.0%)**

72 Inventor/es:

**CASQUEIRO BLANCO, Francisco Javier;**

**PÉREZ ANDRÉS, Jenifer;**

**IGLESIAS BLÁZQUEZ, Cristina;**

**GARCÍA RUIZ DE MORALES, José María;**

**RODRIGUEZ APARICIO, Leandro Benito y**

**FERRERO GARCÍA, Miguel Ángel**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **CEPAS MICROBIANAS, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ALIMENTOS QUE LAS  
CONTIENEN PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS RELACIONADOS CON LA  
INGESTA DE GLÚTEN**

57 Resumen:

La invención se refiere a una cepa seleccionada de *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5 o una combinación de las mismas y composiciones que las comprenden, para uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la ingesta de gluten, como la enfermedad celiaca. Las cepas se pueden usar en composiciones farmacéuticas, en alimentos funcionales, alimentos probióticos, alimentos simbióticos, suplementos alimenticios o alimentos nutracéuticos.

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

ES 2 698 566 B2

**CEPAS MICROBIANAS, COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS Y ALIMENTOS QUE  
LAS CONTIENEN PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS RELACIONADOS  
CON LA INGESTA DE GLÚTEN**

5

**DESCRIPCIÓN**

**SECTOR TÉCNICO**

10 La presente invención pertenece a los campos de la industria de los alimentos y la industria farmacéutica, más concretamente a productos alimenticios o farmacéuticos que comprenden microorganismos implicados en el metabolismo del gluten.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15

La celiaquía o enfermedad celiaca es una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado mediada por el sistema inmune. La enfermedad produce lesiones en el epitelio y en la lámina propia del intestino delgado tales como atrofia de las vellosidades, hiperplasia en las criptas e infiltración leucocitaria. Clínicamente presenta una gran  
20 variedad de síntomas, tanto gastrointestinales como extra-intestinales, e incluso puede cursar de forma asintomática. Los síntomas clásicos incluyen diarrea crónica, esteatorrea, distensión abdominal, dolor, pérdida de peso y anemia; en niños además es común que presenten retraso en el crecimiento. 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%  
25 en familiares de primer grado. La enfermedad celíaca presenta una elevada incidencia y, sin embargo, no existe en la actualidad terapia, alternativa a la dieta sin gluten, para estos pacientes. Además, la ingesta de gluten y la enfermedad celiaca está asociados al desarrollo de otros desórdenes tales como el síndrome de Down, la diabetes mellitus tipo 1, la dermatitis herpetiforme, la miopatía, la esclerosis múltiple, la artritis, el autismo, la  
30 esquizofrenia, la depresión, los linfomas o la ataxia.

35

El gluten es el factor ambiental desencadenante de la enfermedad celiaca y desórdenes asociados. Es un conjunto de proteínas que se encuentran en la semilla de cereales como el trigo, la cebada, el centeno, la espelta, el triticale y posiblemente la avena.

Las proteínas del gluten de trigo se denominan gliadinas y gluteninas y poseen un alto contenido en el aminoácido prolina, la cual las protege de la degradación proteolítica por

parte de las enzimas gastrointestinales humanas. La digestión incompleta del gluten en el intestino, genera dos tipos de péptidos involucrados en el desarrollo de la enfermedad celiaca, se denominan péptidos tóxicos y péptidos inmunogénicos.

- 5 Los péptidos tóxicos son capaces de inducir rápidamente daño en la mucosa intestinal activando la respuesta inmune innata del sujeto. Los más estudiados son el péptido 19-mer (PGQQQPFPPQQPYQPQPF), que corresponde a la región p31-49 de la  $\alpha$ -gliadina y el péptido 13-mer (PGQQQPFPPQQPY), que es un fragmento más corto del anterior y corresponde a la región p31-43 de la  $\alpha$ -gliadina (Sturgess *et al.* 1994).

10

Los péptidos inmunogénicos son aquellos fragmentos proteicos capaces de activar la respuesta inmune adaptativa, de los cuales el más estudiado es el 33-mer (LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF), que corresponde a la región p57-89 de la  $\alpha$ -gliadina. Este péptido es capaz de inducir una fuerte activación de las células T de  
15 pacientes celiacos y, debido a su alto contenido en prolina (13 de sus 33 aminoácidos), es muy resistente a la digestión gastrointestinal (Shan *et al.* 2002).

20

En condiciones normales el epitelio intestinal es impermeable a estos péptidos. Sin embargo, los pacientes celiacos tienen la permeabilidad intestinal aumentada, por lo que los péptidos tóxicos e inmunogénicos alcanzan la lámina propia del intestino delgado y desencadenan la patogenia de la enfermedad celiaca induciendo respuestas inmunes innata y adaptativa.

25

La respuesta inmune innata se ocasiona debido a que los péptidos tóxicos del gluten provocan de manera muy rápida un incremento en la expresión de la interleucina 15 (IL-15), que induce la activación y el aumento masivo de linfocitos intraepiteliales que, al activarse, expresan el receptor NKG2D y se transforman en células *Natural Killer* (NK). Estas células NK activadas se vuelven citotóxicas provocando daño tisular, ya que destruyen los enterocitos que expresan en su superficie moléculas del complejo MHC I  
30 tipo A (MHCA). La respuesta inmune adaptativa es más lenta y comienza con la desaminación de los péptidos inmunogénicos del gluten que llegan a la lámina propia mediante transglutaminasa tisular (TGt). La TGt transforma en glutamato los abundantes residuos de glutamina presentes en los péptidos del gluten, confiriendo a los péptidos una carga negativa que favorece su unión a moléculas HLA DQ2/DQ8 localizadas en la  
35 membrana de las células presentadoras de antígeno. De este modo, los péptidos inmunogénicos activan los linfocitos TCD4+ restringidos por HLA DQ2/DQ8, lo que provoca la liberación de citoquinas proinflamatorias como el interferón gamma, la

activación de metaloproteinasas y otros mediadores de daño tisular, y la estimulación de células B productoras de anticuerpos anti-gliadina y anti-TGt.

5 Actualmente el único tratamiento completamente efectivo para los sujetos que sufren enfermedad celiaca es llevar a cabo una dieta libre de gluten de por vida, lo cual presenta muchos inconvenientes tales como un incremento del precio, menor palatabilidad y riesgo de contaminación cruzada entre alimentos.

10 En la industria agroalimentaria se están desarrollando estrategias para reducir la presencia de los péptidos del gluten en los alimentos 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 los cereales. De este modo, se pretende introducir mejoras en la dieta de los enfermos celíacos y proporcionarles una mayor variedad de productos (Rizzello *et al.* 2007). Sin embargo, es  
15 muy difícil asegurar que una variedad de trigo, o un proceso de fermentación elimine completamente todos los péptidos tóxicos e inmunogénicos que se generan a partir del gluten.

Dado que los alimentos modificados genéticamente o manipulados durante su  
20 fermentación ni previenen ni tratan la enfermedad, se están desarrollando alternativas terapéuticas como compuestos inhibidores de la enzima TGt (WO2007025247), anticuerpos capaces de capturar los péptidos derivados de las gliadinas (US20070184049 A1), compuestos que bloquean los sitios de unión de los péptidos del gluten a las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8 (US20070161572 A1) o administración de  
25 citoquinas reguladoras recombinantes (Salvati *et al.*, 2005). Estas estrategias suponen la modificación de moléculas implicadas en múltiples procesos biológicos, por lo que su manipulación puede dar lugar a efectos secundarios no deseados.

Otras alternativas que actualmente se encuentran en fase de investigación incluyen la  
30 administración oral de enzimas proteolíticas obtenidas a partir de plantas o de microorganismos para acelerar la digestión de los péptidos del gluten (Gass *et al.* 2007). Sin embargo, no se han realizado estudios in vivo que demuestren su eficiencia en individuos que ingieran gluten tal y como está presente en los alimentos. Los efectos de estas enzimas son altamente dependientes del momento de la ingesta y únicamente  
35 reduce el umbral de toxicidad del gluten.

A pesar de los esfuerzos por mantener una dieta libre de gluten, sus trazas están muchas veces presentes en la vida diaria del enfermo, por ejemplo, cada vez que ingieren alimentos fuera de su ambiente controlado, dado que la mayoría de personas o restaurantes no pueden asegurar una ausencia completa del gluten en sus alimentos o procesos culinarios o disponen de alimentos certificados por FACE (Federaciones de Asociaciones de celíacos de España). Esto hace que bien los pacientes no puedan salir fuera de su ambiente controlado para evitar ingerir alimentos con trazas de gluten que les ocasione una respuesta inmune.

Existe por lo tanto la necesidad de identificar sustancias que puedan incluirse en composiciones, alimentos o composiciones farmacéuticas para administrarse a personas que padecen enfermedad celíaca o cualquiera de sus trastornos asociadas, y por lo tanto les permita ingerir alimentos que contengan trazas de gluten, sin que ello afecte negativamente a su salud.

El uso de microorganismos como aditivos en composiciones para su administración a enfermos celíacos es una nueva aproximación en el tratamiento y prevención de la celiacía, dado que se ha visto que existen microorganismos capaces de metabolizar gluten.

Para que un microorganismo pueda emplearse en una composición para el tratamiento o prevención de la enfermedad celíaca, es necesario que los microorganismos cumplan una serie de requisitos:

- (i) metabolicen gluten;
- (ii) eviten la actividad inflamatoria sobre las células intestinales de los péptidos derivados del gluten;
- (iii) sean estables y resistentes al pH y concentración de sales biliares del tracto gastrointestinal;
- (iv) sean seguros para el individuo;
- (v) tengan alta capacidad de adhesión al epitelio intestinal.

Una composición que comprenda un microorganismo que cumpla estas características supondría un gran avance en la dieta de los enfermos, ya que podría emplearse como ingrediente en composiciones para administrarse a estas personas, dado que les permitiría ingerir alimentos que contengan trazas de gluten sin sufrir los efectos de la enfermedad y mejorando su calidad de vida.

El documento WO 2009/080862 A1 describe el uso del microorganismo *Bifidobacterium longum* IATA ES-1 en composiciones farmacéuticas y alimenticias destinadas al tratamiento o la prevención de alergias alimentarias, preferiblemente enfermedad celíaca. Este documento se considera el estado del arte más cercano. Sin embargo, únicamente  
5 muestra la inducción en la producción de citoquinas reguladoras (IL-10 y TGF- $\beta$ ) por la cepa en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos (PBMC) y la hidrólisis de péptidos de 2-4 aminoácidos que comprenden una prolina. Por lo tanto, este documento carece de suficientes resultados que garanticen que la cepa sea capaz de emplear gluten como fuente de nitrógeno, actuar sobre enterocitos del intestino delgado o  
10 digerir alguno de los péptidos asociados con la enfermedad (19-mer y/o 33-mer) y además sea segura.

Es necesario, por lo tanto, encontrar sustancias alternativas que puedan añadirse a composiciones farmacéuticas, alimentos o medicamentos para administrar a personas  
15 que padecen enfermedad celíaca o cualquiera de sus trastornos asociados.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 La presente invención se refiere a una cepa microbiana seleccionada entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6 (CECT 9514), *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 (CECT 9515) y *Bifidobacterium breve* N24.5 (CECT 9516), o una combinación de las mismas.

En una realización de la invención, la cepa microbiana seleccionada de *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5 o una  
25 combinación de las mismas, es para su uso como medicamento.

Otro objeto de la invención se refiere a una cepa microbiana seleccionada entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve*  
30 N24.5 o una combinación de las mismas, para uso en el tratamiento de trastornos relacionados con la ingesta de gluten. En una realización preferida, el trastorno relacionado con la ingesta de gluten es la enfermedad celiaca.

Otra realización de la invención se refiere al uso de la cepa microbiana seleccionada  
35 entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5, o una combinación de las mismas, como aditivo en alimentos funcionales, alimentos probióticos, alimentos simbióticos, suplementos alimenticios o alimentos

nutracéuticos.

En otra realización, la invención se refiere a alimentos funcionales, alimentos probióticos, alimentos simbióticos, suplementos alimenticios o alimentos nutracéuticos que comprenden al menos una cepa microbiana seleccionada entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5, o una combinación de las mismas, para uso en para el tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con la ingesta de gluten. En una realización preferida, el trastorno relacionado con la ingesta de gluten es la enfermedad celiaca.

10

Otra realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos una de las cepas microbianas de la invención. En una realización preferida, la composición se usa en tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con la ingesta de gluten. En una realización más preferida, el trastorno relacionado con la ingesta de gluten es la enfermedad celiaca.

15

Otra realización de la invención se refiere a una composición probiótica, alimento funcional, alimento simbiótico, suplemento alimenticio o alimento nutracéutico, que comprende al menos una de las cepas microbianas descritas anteriormente. En una realización preferida, la composición, alimento o suplemento se usa en tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con la ingesta de gluten. En una realización más preferida, el trastorno relacionado con la ingesta de gluten es la enfermedad celiaca.

20

Las cepas microbianas de la invención se encuentran en cualquiera de las composiciones anteriores en una proporción de entre 0,1% y 99,9%, preferiblemente entre el 1% y el 90% y más preferiblemente entre el 10 y el 90%. Las cepas de la invención se pueden combinar entre ellas o con otros microorganismos 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 el aumento del aporte de enzimas que favorezcan la digestión de las proteínas y/o péptidos del gluten incrementando su concentración total o aumentando su tipo y especificidad.

25

30

Otra realización se refiere al uso de al menos una cepa microbiana probiótica seleccionada entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5 en la fabricación de composiciones médico-farmacéuticas, composiciones probióticas, alimentos funcionales, alimentos simbióticos, suplementos

35

alimenticios o alimentos nutracéuticos relacionados con el tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con la ingesta de gluten. En una realización más preferida, el trastorno relacionado con la ingesta de gluten es la enfermedad celiaca.

- 5 La cantidad de al menos una cepa microbiana de la invención en composiciones farmacéuticas, composiciones probióticas, alimentos funcionales, alimentos simbióticos, suplementos alimenticios es de entre  $10^5$  unidades formadoras de colonias (ufc) y  $10^{13}$  ufc por gramo o mililitro de composición, alimento o suplemento, preferiblemente entre  $10^6$  y  $10^{12}$  y más preferiblemente entre  $10^7$  y  $10^{10}$  ufc por gramo o mililitro.

10

Otro objeto de la presente invención se refiere a un método para la prevención y/o de tratamiento de trastornos relacionados con la ingesta de gluten, preferiblemente de enfermedad celiaca, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente aceptable de una composición que comprenda al menos una cepa microbiana probiótica  
 15 seleccionada entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5; o administrar la composición probiótica, alimento funcional, alimento simbiótico, suplemento alimenticio o alimento nutracéutico, que comprende al menos una cepa microbiana probiótica seleccionada entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5; o la composición  
 20 farmacéutica que comprende dichas cepas.

A efectos de la presente invención, se definen los siguientes términos:

Cepa microbiana probiótica: A efectos de la presente invención se refiere a cepas de  
 25 bacterias vivas que, al administrarse a un sujeto, tienen un efecto beneficioso en la salud de dicho sujeto.

Trastornos relacionados con la ingesta de gluten: Las enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten son, por ejemplo y sin limitarse, enfermedad celiaca, la sensibilidad al  
 30 gluten no celiaca (SGNC), la alergia al trigo o el síndrome de intestino irritable (SII) y efectos asociados como alergia, autismo, ataxia, diabetes o esclerosis múltiple, entre otros.

Enfermedad celiaca (o celiaguía): La Enfermedad Celiaca (EC) es una enfermedad  
 35 sistémica inmunomediada, que consiste en una intolerancia a las proteínas del gluten que cursa con una atrofia severa de la mucosa del intestino delgado superior. Como



consecuencia, se establece un defecto de utilización de nutrientes a nivel del tracto digestivo.

5 Composición farmacéutica (o composición médico-farmacéutica): Composición que comprende uno o más fármacos (sustancia químicamente activa que ejerce su efecto sobre el organismo) presentado para uso industrial o clínico y destinado para su utilización en personas o en animales, dotado de propiedades que permiten el mejor efecto farmacológico de sus componentes con el fin de prevenir, aliviar o mejorar el estado de salud de las personas enfermas, o para modificar estados fisiológicos.

10

Composición probiótica: para los fines de la presente invención, el término probiótico se refiere al uso de microorganismos vivos que se agregan a composiciones o alimentos (leche, yogures, etc.), suplementos dietéticos (en forma de cápsulas, tabletas, píldoras, polvo, etc.) u otros, que permanecen activos y ejercen sus efectos fisiológicos sobre el  
15 sujeto que ingiere el alimento o producto similar que contiene dicho probiótico. Ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos. Los microorganismos de la presente invención pueden encontrarse vivos o liofilizados, mantienen su actividad biológica en el intestino e ingeridos en cantidades adecuadas ejercerían un efecto beneficioso sobre los individuos con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten,  
20 reduciendo sus riesgos y mejorando su estado de salud.

Alimento funcional: Alimentos que están formulados para aportar, más allá de su valor nutricional habitual, un efecto beneficioso sobre la reducción de riesgos y mejora del estado de salud de pacientes con enfermedades. En el presente caso, enfermedades  
25 relacionadas con la ingesta de gluten.

Alimento simbiótico: Alimentos funcionales que contienen una mezcla de productos alimenticios prebióticos y probióticos. Normalmente contienen componente prebiótico que favorece el efecto del componente probiótico.

30

Suplemento dietético o alimenticio: productos alimentarios cuyo fin es complementar la dieta normal y que consisten en fuentes concentradas de nutrientes u otras sustancias que poseen un efecto nutricional o fisiológico. En el caso del uso de los microorganismos objeto de la presente invención, un suplemento dietético o alimenticio, incluiría en su  
35 composición al menos uno de los microorganismos a fin de complementar la dieta con fines saludables 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 estado de salud.

5 Alimento nutracéutico: Sustancias naturales bioactivas altamente concentradas que, aunque se encuentran presentes en los alimentos, están procesadas para eliminar el sobrante y dejar la parte beneficiosa. Al estar concentradas y en dosis superiores al alimento natural, tienen un efecto favorable sobre la salud mucho mayor del que tiene el alimento tal y como se da en la naturaleza. En este caso ejercería efectos beneficiosos en pacientes con enfermedades relacionadas con la ingesta de gluten, reduciendo sus  
10 riesgos y mejorando su estado de salud.

Aditivo: Sustancia que se agrega a otras para darles cualidades de las que carecen o para mejorar las que poseen. En el campo de la alimentación, son sustancias que no constituyen por sí mismas un alimento ni poseen valor nutritivo, pero que su adición a  
15 alimentos y bebidas modifican sus características organolépticas, mejoran su conservación, textura o potencian alguna característica del propio alimento.

El concepto de composiciones probióticas, alimentos funcionales, alimentos simbióticos, suplementos dietéticos o alimenticios y alimento nutracéuticos incluye, sin por ello  
20 limitarse a: productos lácteos, como por ejemplo yogures, zumos, alimentos sólidos, así como productos de tés, herbolarios y parafarmacia, tales como como complejos vitamínicos o suplementos nutricionales.

Las cepas y composiciones que las comprenden de la presente invención, se caracterizan porque pueden usarse en el tratamiento y/o prevención de trastornos  
25 relacionados con la ingesta de gluten.

Las cepas objeto de la presente invención tienen la capacidad de metabolizar el gluten, lo cual les hace excelentes candidatos para ser incluidas en composiciones y productos  
30 alimentarios de personas celiacas.

El tratamiento de la enfermedad celiaca o de otros desórdenes relacionados con la ingesta de gluten impide que, el consumo ocasional de esta proteína, ocasione los efectos dañinos en el organismo indicados anteriormente. De esta forma se evitan los  
35 problemas que sufren los enfermos con las pequeñas transgresiones de la dieta debidas al posible mal etiquetado de los alimentos sin gluten o a las contaminaciones cruzadas, lo

cual supone una gran mejora en la calidad de vida de las personas que padecen estas enfermedades.

5 Para que un microorganismo se considere adecuado para metabolizar y disminuir la concentración de gluten, este debe tener actividad peptidasa que hidrolice la gliadina y otros péptidos tóxicos e inmunogénicos del gluten. Los microorganismos de la presente invención, o composiciones que las comprenden, pueden usarse en la prevención de trastornos relacionados con la ingesta de gluten, ya que son capaces de hidrolizar los péptidos tóxicos y/o inmunogénicos del gluten responsables de la activación de la  
10 respuesta inmune. En una realización más preferida, los microorganismos son capaces de hidrolizar los péptidos 19-mer y/o 33-mer. Teniendo en cuenta el modelo de las dos señales propuesto para el desarrollo de la patogénesis de la enfermedad celiaca (Bernardo, 2008), si estos péptidos son hidrolizados eficientemente se puede evitar la activación de la respuesta inmune innata y, como consecuencia, no se desencadena la  
15 respuesta inmune adaptativa, evitando así que comience la patogenia de la enfermedad celiaca.

Es necesario que las cepas tengan actividad antiinflamatoria sobre las células intestinales. Una medida de la actividad antiinflamatoria de un compuesto es la  
20 disminución de la liberación de citoquina IL-8 provocada por la presencia de un compuesto tóxico inflamatorio. La combinación de estas cepas entre sí, o con otras que posean peptidasas de distinta especificidad, permite que se complemente su acción, favoreciendo la degradación completa de los epítomos tóxicos e inmunogénicos. Las tres cepas descritas tienen actividad antiinflamatoria.

25 Para que los microorganismos sean adecuados para incluirse en composiciones de administración oral es imprescindible que los microorganismos resistan el tránsito por el tracto gastrointestinal: sean estables a pH ácido, resistentes a jugos gástricos y pancreáticos y a diferentes concentraciones de sales biliares. De esta forma, los  
30 microorganismos pueden alcanzar el intestino y ejercer allí su efecto. Las tres cepas descritas en la presente invención son resistentes a las condiciones del tracto gastrointestinal.

Otro requerimiento de las cepas de la presente invención es que sean seguras, dado que  
35 van a administrarse, directamente o comprendidas en composiciones, a sujetos humanos. La seguridad de una cepa se puede determinar mediante el análisis de factores de virulencia, tales como actividad hialuronidásica, actividad elastásica, actividad

gelatinásica, o actividad hemolítica. Además, las cepas no deben presentar resistencia a antibióticos.

5 Otra característica de las cepas es la adhesión al epitelio intestinal para que el microorganismo aumente el tiempo de residencia en el intestino y, por lo tanto, el tiempo en el que puede ejercer su efecto. Las tres cepas descritas en la presente invención tienen capacidad de adhesión al epitelio intestinal.

10 Todas estas propiedades garantizan la persistencia y efectividad prolongada en el lugar en el que las cepas deben llevar a cabo su efecto, el intestino. También garantizan su uso en forma de alimentos probióticos, funcionales, suplementos, nutracéuticos y fármacos para la reducción de riesgos y mejora del estado de salud y calidad de vida de los sujetos con enfermedad celiaca, así como el de otros trastornos asociados a la ingesta de gluten. Por último, los microorganismos tienen el valor añadido de ser capaces de inhibir el  
15 crecimiento de microorganismos patógenos.

Las cepas de la invención metabolizan el gluten y tienen actividad antiinflamatoria frente a la gliadina y, por tanto, pueden proteger a los pacientes celíacos en dieta sin gluten de las pequeñas contaminaciones traza de gluten que se pueden encontrar en su vida diaria.  
20

Las cepas *Lactobacillus rhamnosus* L8.6 (CECT 9514), *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 (CECT 9515) y *Bifidobacterium breve* N24.5 (CECT 9516) o composiciones que las comprendan, constituyen una alternativa para el tratamiento y prevención de la enfermedad celíaca y desórdenes asociados debido a sus características intrínsecas, no  
25 descritas hasta la fecha en otro compuesto. Las ventajas de las cepas son:

- Actividad antiinflamatoria
- Hidrólisis de los péptidos tóxicos e inmunogénicos del gluten
- Bioseguridad: ausencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos
- 30 - Resistencia a estrés gastrointestinal
- Actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos
- Adhesión a las células intestinales.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos aquí  
35 usados tienen el mismo significado a los habitualmente entendidos por una persona experta en el campo de la invención. Métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos pueden ser usados en la práctica de la presente invención. A lo largo de la

descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes, no tienen carácter limitativo y por lo tanto no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. El término "comprende", además, incluye el término "consiste".

5

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

### **Figura 1. Medida de la actividad anti-inflamatoria de los microorganismos aislados.**

10 La actividad antiinflamatoria de los microorganismos *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5 se determina de acuerdo con la media de la cantidad de citoquina IL-8 liberada. Las barras blancas corresponden a las células HT-29 (blanco), las barras negras corresponden a las células HT-29 + 7 mg/mL PT-gliadina (control positivo), las barras grises corresponden al co-cultivo de células HT-29 con cada microorganismo, las  
15 barras ralladas negras y grises corresponden al co-cultivo de células HT-29, PT-gliadina y cada microorganismo, las barra con cuadros blancos y grises corresponden al co-cultivo de células HT-29 y cada microorganismo inactivado por calor y las barras con cuadrados negros y grises corresponden al co-cultivo células HT-29, PT-gliadina y cada microorganismo inactivado por calor (\* p<0,05).

20

**Figura 2. Capacidad de hidrólisis de los péptidos tóxicos del gluten.** Cromatogramas de la hidrólisis del péptido tóxico 19-mer por parte de los microorganismos *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 y el control negativo sin incubar con ninguna cepa.

25 **Figura 3. Capacidad de hidrólisis de los péptidos inmunogénicos del gluten.** Cromatogramas de la hidrólisis del péptido inmunogénico del gluten 33-mer por parte de los microorganismos *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5 y el control negativo sin incubar con ninguna cepa. Las flechas se corresponden con el pico correspondiente al péptido 33-mer.

30

### **Figura 4. Capacidad de adhesión de los microorganismos a las células intestinales.**

Capacidad de adhesión de los microorganismos *Lactobacillus rhamnosus* L8.6, *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 y *Bifidobacterium breve* N24.5 a las células epiteliales intestinales Caco-2 (barras negras). Se muestra el efecto que ejerce la mucina sobre la  
35 capacidad de adhesión a las células intestinales (barras blancas). La adhesión se expresa como el porcentaje de microorganismos adheridos respecto al total de microorganismos añadidos (\* p<0,05).

## DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS BAJO EL TRATADO DE BUDAPEST

Los microorganismos usados en la presente invención han sido depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), localizada en el Edificio 3 CUE, Parc Científic Universitat de Valencia. Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna (Valencia, España):

- CECT 9514: *Lactobacillus rhamnosus*, L8.6, depositada el 28 de noviembre de 2017.
- CECT 9515: *Lactobacillus rhamnosus* N4.7, depositada el 27 de marzo de 2018.
- CECT 9516: *Bifidobacterium breve* N24.5, depositada el 27 de marzo de 2018.

## EJEMPLOS

El propósito de los ejemplos indicados a continuación sirve para ilustrar la invención, sin por ello limitar el alcance de la misma.

### **Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de microorganismos que metabolizan gluten**

Se obtuvieron muestras de leche materna de madres sanas voluntarias y muestras fecales de sus hijos sanos a lo largo de varios períodos: 0-5 días desde el nacimiento y 3-4 meses desde el nacimiento.

Las muestras de leche materna se recogieron en tubos estériles mediante extracción manual o mediante sacaleches, limpiando previamente el pezón con agua y jabón. El tubo se llenó por completo de leche materna para minimizar el contacto con el oxígeno. Las muestras fecales fueron recogidas directamente del pañal en el menor tiempo posible tras la deposición. Se recogieron directamente arrastrando un bote estéril de 125 mL por el pañal y cerrándolo lo más rápido posible. Inmediatamente después, el bote con la muestra se introdujo en un recipiente hermético de plástico de 2 litros junto con un sobre de ácido ascórbico (*Anaerogen*, Oxoid) para generar anoxia en la muestra.

Las muestras se procesaron en condiciones asépticas en una cabina de seguridad biológica. Las muestras de leche materna se diluyeron en NaCl-cisteína (NaCl 9 g/L con 0,5 g/L de cisteína) en una proporción 1:5 (v/v). Las muestras diluidas se homogenizaron con vórtex. Las muestras fecales se diluyeron en una proporción 1:5 (p/v) en NaCl-

cisteína, se pesaron dentro de la cabina de seguridad biológica y, siempre que hubo cantidad suficiente, se utilizó la parte interior de la muestra para evitar posibles contaminaciones. La muestra fecal diluida se homogenizó con un digestor *Stomacher 80* (Seward).

5

Para el aislamiento de las bacterias a partir de las muestras homogenizadas se prepararon diluciones seriadas 1/10 en NaCl-cisteína. Las muestras de leche materna homogenizadas se diluyeron hasta  $10^{-2}$  y las muestras fecales homogenizadas se diluyeron hasta  $10^{-6}$ . A continuación, se sembró por duplicado 100  $\mu$ L de cada dilución en  
10 placas de medio de cultivo MCG-3 sólido (Caminero *et al.* 2014). El medio MGC-3 es un medio de cultivo que lleva gluten como fuente principal de nitrógeno y fue desarrollado para el aislamiento y el crecimiento de bacterias capaces de metabolizar gluten. Cada una de las réplicas se incubó dentro de un recipiente hermético, uno con condiciones anóxicas (sin oxígeno, generado con sobres *Anaerogen*, Oxoid) y el otro con condiciones  
15 microóxicas (concentración baja de oxígeno, entre 2-10%, generada con sobres *Campygen*, Oxoid). Los recipientes se incubaron durante 48 horas a 37 °C.

Pasado ese tiempo se analizaron las placas de MGC-3. Se observó la morfología de las colonias de las bacterias presentes en cada placa. Se seleccionaron todas las  
20 morfologías diferentes que se pudieron diferenciar.

Para determinar si un microorganismo es capaz de metabolizar el gluten, debe cumplir al menos una de las siguientes condiciones (Caminero *et al.* 2014):

- 25 (i) El microorganismo no crece cuando se retira el gluten del medio de cultivo en el que ha sido aislado. Esto se analiza con medio MSG-3, que tiene la misma composición que el medio MCG-3, pero no lleva gluten.
- (ii) El microorganismo crece en un medio de cultivo cuya única fuente de nitrógeno es el gluten. Esto se probó creciendo los microorganismos en medio MCG-1.
- 30 (iii) El microorganismo presenta actividad glutenásica en placa, es decir, es capaz de degradar gluten extracelular.

Las colonias de bacterias se observaron que metabolizaban gluten de acuerdo con las características anteriores, se purificaron y se sembraron cuatro veces en aislamiento por  
35 agotamiento en estrías, para asegurar que no existía contaminación con otras bacterias. Una vez aislados los microorganismos, se procedió a su identificación molecular.

Para identificar los microorganismos aislados, se extrajo su ADN genómico con el kit *SpeedTools Tissue DNA Extraction* (Biotools) y se amplificó por PCR un fragmento de 900 pares de bases del gen que codifica el rRNA 16S. Para ello se empleó como molde DNA genómico de cada microorganismo (entre 20 y 50 ng), como cebadores los oligonucleótidos 27F y E939R (concentración final 1µM) tal y como se describe en Baker 2003, con la rTaq polimerasa (GE Healthcare). Se comprobó por electroforesis en gel de agarosa que el fragmento amplificado se correspondía con el tamaño adecuado (900 pb), se clonó empleando el kit comercial *Strataclone PCR Cloning* (Agilent technologies) en el vector pSC-A-amp/kan. Se transformó *E. coli* con la construcción, se extrajo el ADN plasmídico de los transformantes y se digirió con la enzima *EcoRI* para comprobar que los transformantes habían incorporado el DNA de interés.

Para identificar las cepas aisladas se buscaron secuencias similares en la base de datos GenBank del NCBI utilizando la herramienta BLAST (Altschul *et al.* 1990). A continuación, se hizo un análisis utilizando el programa MEGA versión 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) y de esta forma se identificaron dos cepas aisladas pertenecientes a la especie *Lactobacillus rhamnosus* (cepas L8.6 y N4.7) y una cepa perteneciente a la especie *Bifidobacterium breve* (cepa N24.5).

## 20 **Ejemplo 2: Actividad antiinflamatoria de los microorganismos aislados.**

Los ensayos para determinar la actividad antiinflamatoria de los microorganismos frente a gliadina se llevaron a cabo sobre cultivos de la línea celular de epitelio intestinal HT-29 en monocapa entre los pases 132 y 144 de cultivo. El ensayo consistió en realizar una serie de co-cultivos de las células intestinales con los microorganismos y PT-gliadina, y medir la producción de citoquinas inflamatorias en cada caso.

Las muestras analizadas fueron las siguientes:

- Células HT-29 + 7 mg/mL PT-gliadina como control positivo de inflamación.
- 30 - Células HT-29 +  $10^8$  ufc/mL de microorganismo para medir el efecto de la cepa sobre el epitelio intestinal.
- Células HT-29 + 7 mg/mL PT-gliadina +  $10^8$  ufc/mL de microorganismo para comprobar si la cepa disminuye la inflamación producida por la gliadina.
- Células HT-29 +  $10^8$  ufc/mL de microorganismo inactivado por calor para medir el efecto del microorganismo inactivado.
- 35



- Células HT-29 + 7 mg/mL PT-gliadina +  $10^8$  ufc/mL de microorganismo inactivado por calor, para comprobar si el microorganismo inactivado es capaz de disminuir la inflamación producida por la gliadina.

- 5 Para simular las condiciones de digestión, se digirió la gliadina con pepsina y tripsina, dando lugar a PT-gliadina, tal y como ocurre en el organismo durante la digestión. Para ello, 100 mg de gliadina (Sigma) machacada con un mortero se disolvieron en 10 mL agua mili-Q pH 2. Se añadieron 34 mg de pepsina (Sigma) y se incubó la mezcla a 37°C durante 2 horas con agitación 180-200 rpm para simular las condiciones de digestión
- 10 gástrica. Tras la incubación, se añadieron 118,3 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y se aumentó el pH a 7,9 con NaOH 1 M, tal y como ocurre en el tránsito del estómago al intestino. Después se añadieron 10,3 mg de tripsina (Sigma) y se incubó de nuevo durante 2 horas a 37 °C con 180-200 rpm de agitación para simular las condiciones intestinales. Pasado ese tiempo se incubó durante 10 minutos a 99 °C para inactivar las enzimas y esterilizar la mezcla.
- 15 Las células HT-29 se cultivaron a una concentración de 25 000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 12 pocillos tratadas para cultivo celular (BD Falcon™) con 2 mL de medio de cultivo McCoy's 5A suplementado con un 10 % de SFB y 0,4 % de solución antibiótica. El medio de cultivo se cambió cada 2 días durante 7 días hasta que las células estuvieron totalmente diferenciadas y confluentes. Pasados esos días la monocapa celular estaba
- 20 compuesta por  $1-2 \times 10^6$  células HT-29 por pocillo. Un día antes de la incubación de los co-cultivos, la monocapa celular se lavó 3 veces con PBS pH 7,4 y se incubó (durante 24 horas a 37°C con atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>) con 1 mL del medio McCoy's 5A suplementado con un 10 % de SFB sin antibióticos. Tras la incubación, se añadió a los pocillos  $1-4 \times 10^8$  ufc/mL la cepa bacteriana cuya capacidad anti-inflamatoria se pretendía
- 25 ensayar. La cepa se añadió al pocillo resuspendida en medio McCoy's 5A con SFB sin antibióticos. La mezcla de bacterias y monocapa celular se incubó durante 24 horas a 37°C con atmósfera enriquecida con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

- 30 Para los casos en los que se ensayó la capacidad antiinflamatoria del microorganismo inactivado, este se añadió al pocillo correspondiente a la misma concentración que en el caso anterior, previamente calentado a 121°C durante 60 minutos.

- 35 La PT-gliadina se añadió al co-cultivo a una concentración final de 7 mg/mL. Tras 24 horas de incubación a 37°C en una estufa con atmósfera enriquecida con 5% de CO<sub>2</sub>, se recogió el contenido de los pocillos, que contenían las citoquinas liberadas por las células intestinales HT-29 y se centrifugó durante 15 minutos a 5000 xg para eliminar la gliadina del medio y los restos celulares. El sobrenadante se conservó a -80 °C hasta su

procesamiento para la cuantificación de las citoquinas liberadas. Para cada una de las muestras y condiciones se realizaron tres repeticiones independientes.

5 Para la cuantificación de la citoquina IL-8 liberada se utilizó el kit *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit* (BD Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante. La medida se hizo utilizando un citómetro *BD FACS Canto™ II*, y para la interpretación de los datos se utilizó el software *BD FACS Diva Software*.

10 El análisis estadístico se realizó determinando la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre cada ensayo y su respectivo control mediante la prueba estadística t de Student. Se compararon los ensayos “microorganismo” y “microorganismo inactivado” con el “control”, y los ensayos “microorganismo + gliadina” y “microorganismo inactivado + gliadina” con el “control gliadina”.

15 La **Figura 1** muestra el efecto antiinflamatorio de los microorganismos de la invención, *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5 de acuerdo con la media de la cantidad de citoquina IL-8 liberada.

20 La interleucina-8 (IL-8) es una citoquina de la familia de las quimiocinas, de naturaleza proinflamatoria. Su síntesis se realiza en los fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos que regula la producción de proteínas de adhesión. Se sabe que amplifica la respuesta inflamatoria local y estimula la angiogénesis. Se considera que existe efecto anti-inflamatorio de una cepa de la invención cuando la concentración de IL-8 liberada por la  
25 célula es inferior en presencia del microorganismo respecto a las mismas condiciones sin microorganismo. En este ensayo se puede observar que las tres cepas muestran claramente tres efectos:

- 30 i) Las tres cepas tienen efecto antiinflamatorio directo en las células del epitelio intestinal, puesto que son capaces de reducir significativamente la expresión basal de IL-8 cuando se cultivan directamente sobre células HT-29 (barras grises frente a barras blancas).
- ii) Las tres cepas son capaces de reducir significativamente el efecto inflamatorio provocado por la PT-gliadina (barras ralladas frente a barras negras): No solo  
35 reducen el efecto inflamatorio producido por la gliadina, sino que además reducen la expresión de IL-8 por debajo incluso del nivel de IL-8 de las células del epitelio intestinal (barras blancas).

- iii) Las tres cepas, incluso inactivadas por calor (barras con cuadros blancos y grises), tienen efecto antiinflamatorio.

Estos resultados son importantes porque demuestran el efecto antiinflamatorio de las tres cepas en el epitelio intestinal en presencia de péptidos de gliadina, incluso cuando las cepas han sido inactivadas. Esto es importante, dado que se trata de cepas probióticas cuya vía de administración es oral que tienen que pasar por el estómago y hacer su efecto en el duodeno. Ambos ambientes son fisiológicamente hostiles para los microorganismos, lo que podría provocar la muerte de una parte de las bacterias administradas. De esta forma, se demuestra que, incluso inactivadas, los microorganismos de la invención son capaces de ejercer un efecto antiinflamatorio.

**Ejemplo 3: Capacidad de hidrólisis de los péptidos tóxicos e inmunogénicos del gluten.**

A continuación, se determinó si las cepas aisladas en el Ejemplo 1, además de tener actividad antiinflamatoria (Ejemplo 2) eran capaces de hidrolizar los péptidos tóxicos e inmunogénicos generados durante la digestión incompleta de las proteínas del gluten en el intestino.

4,7 µL de los péptidos tóxicos 33-mer, o 19-mer a una concentración final de 60 µM se incubaron durante 24 horas a 37°C con 3,4 µL de cada cepa en PBS pH 7,4, en un volumen final de reacción de 40 µL. A su vez, también se incubaron como blanco 60 µL de PBS y un control negativo sin microorganismo (4,7 µL de péptido 60 µM + 35,3 µL de PBS).

Tras la incubación, se pararon las reacciones calentando las mezclas a 100°C durante 10 minutos. Después se filtraron por amicones con tamaño de poro 0,22 µm. Se centrifugaron durante 2 minutos a 8000 rpm y los eluidos se pasaron a viales de HPLC y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. Las muestras se analizaron en un HPLC *Waters Alliance 600* utilizando una columna hidrofóbica de fase reversa Lichrospher 100 RP18 de 25 cm de longitud y 0,4 cm de diámetro (Phenomenex). Las fases móviles que se emplearon fueron una fase móvil A con agua mili-Q + ácido trifluoroacético al 0,1 % y una fase móvil B con acetonitrilo + ácido trifluoroacético al 0,1 %. El volumen de inyección fue de 10 µL y la técnica de inyección fue automática. El flujo se mantuvo durante todo el programa a 1 mL/minuto y la temperatura de la columna fue de 35°C. El método empleado para el análisis tiene una duración de 35 minutos, pasando en 20 minutos de

un 90 % de fase A y un 10 % de fase B a un 30 % de fase A y un 70 % de fase B, y posteriormente a un 100 % de fase B que se mantuvo 5 minutos. Finalmente se pasó de nuevo a un 90 % de fase A y un 10 % de fase B que se mantuvo durante 7 minutos. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 215 nm con un detector *Waters 2447*.

5 Para el análisis de los resultados se utilizó el software *Empower 2 Pro* (Waters versión 2005).

La **Figura 2** muestra los cromatogramas del HPLC en los que se observa la hidrólisis del péptido tóxico del gluten 19-mer por los microorganismos *L. rhamnosus* L8.6 y *L.*  
10 *rhamnosus* N4.7 y el control negativo.

La **Figura 3** muestra los cromatogramas del HPLC en los que se observa la hidrólisis del péptido inmunogénico del gluten 33-mer por los microorganismos *L. rhamnosus* L8.6, *L.*  
15 *rhamnosus* N4.7, *B. breve* N24.5 y el control negativo.

De este experimento se concluye, en primer lugar, que las cepas de la invención *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 son capaces de digerir el péptido tóxico del gluten 19-mer. Este péptido es responsable de la activación de la respuesta inmune innata en el organismo. Teniendo en cuenta el modelo de las dos señales propuesto para el  
20 desarrollo de la patogénesis de la enfermedad celiaca (Bernardo 2008), si estos péptidos son hidrolizados eficientemente se puede evitar la activación de la respuesta inmune innata y, como consecuencia, no se desencadena la respuesta inmune adaptativa, evitando así que comience la patogenia de la enfermedad celiaca.

25 Además, las tres cepas de la invención son capaces de hidrolizar el péptido inmunogénico 33-mer y, por tanto, pueden disminuir la concentración de este péptido en el duodeno y evitar la activación de la respuesta inmune adaptativa.

Estos resultados demuestran que las cepas *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B.*  
30 *breve* N24.5 hidrolizan los péptidos del gluten responsables de la enfermedad celiaca y, por lo tanto, les convierte en excelentes candidatos para usarse en composiciones farmacéuticas y productos alimentarios para administrarse a personas celiacas o patologías relacionadas.

35

**Ejemplo 4. Bioseguridad de los microorganismos: evaluación de la presencia de factores de virulencia y resistencia a antibióticos.**

Los tres microorganismos de la invención pertenecen a especies consideradas QPS  
 5 (*Qualified Presumption of Safety*) por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*). Sin embargo, como medida de precaución se estudió la presencia de factores de virulencia y la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas en el Ejemplo 1.

10 4.1 Factores de virulencia

La presencia de factores de virulencia en las bacterias se evaluó ensayando la presencia de actividades enzimáticas que pueden causar daño al hospedador.

- Actividad hemolítica: La actividad hemolítica permite a los microorganismos  
 15 degradar la hemoglobina presente en los glóbulos rojos de la sangre para disponer de hierro, lo que provoca daños en el hospedador.

A partir de un cultivo puro de *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5, se hicieron siembras en estría en placas de medio Agar Sangre. Se incubaron durante 48 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación, si existe  
 20 actividad hemolítica, esta se observa directamente en las placas por la formación de un halo de degradación alrededor de las colonias. El resultado de este ensayo es que las tres cepas no tienen actividad hemolítica.

- Actividad hialuronidásica: El ácido hialurónico es un mucopolisacárido presente en  
 25 los tejidos humanos que es despolimerizado por la enzima hialuronidasa. La presencia de esta actividad permite a las bacterias la invasión de los tejidos.

A partir de un cultivo puro de *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5, se hicieron siembras en estría en placas de medio BHIA (Brain Heart Infusion Agar) que contenía 400 µg/mL de ácido hialurónico (Fluka) y un 1 % de  
 30 albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma). La solución de ácido hialurónico y BSA se añadió al BHIA tras ser esterilizada por filtración con filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm. Las placas se incubaron 48 horas a 37°C. La actividad hialuronidásica se detecta añadiendo a las placas ácido acético 2 M e incubando durante diez minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, la placa se vuelve opaca  
 35 salvo en aquellas zonas donde exista actividad, donde se observan zonas translúcidas alrededor de las colonias por la degradación del ácido hialurónico del

medio. El resultado de este ensayo mostró que ninguna de las tres cepas tiene actividad hialuronidásica.

- 5        - Actividad gelatinásica: Esta actividad se considera un factor de virulencia porque puede causar daño en las matrices proteicas extracelulares de los tejidos.  
A partir de un cultivo puro de *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7, se hicieron siembras en estría en placas de medio MRS con 3 % de gelatina (Sigma) y se incubaron durante 48 horas a 37°C en condiciones microóxicas. A partir de un cultivo puro de *B. breve* N24.5, se hicieron siembras en estría en placas de medio MRS con 2% de maltosa y con 3 % de gelatina (Sigma) y se incubaron durante 48 horas a 37 °C en condiciones anóxicas. Para detectar la actividad gelatinásica, se añadió a la placa ácido tricloroacético (TCA) al 30 %. Este ácido tiene la capacidad de precipitar las proteínas, por lo que, debido a este efecto, a los pocos minutos de añadirlo las placas se vuelven de color blanco opaco como consecuencia de la precipitación de la gelatina, salvo alrededor de las colonias de las cepas que tengan actividad gelatinásica, donde se observa un halo transparente de degradación. El resultado de este ensayo mostró que ninguna de las tres cepas objeto de la invención tiene actividad gelatinásica.
- 10
- 15
- 20        - Actividad elastásica: La elastina es una proteína que forma parte de la matriz extracelular de los tejidos y les aporta, entre otras funciones, elasticidad.  
A partir de un cultivo puro de *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7, se hicieron siembras en estría en placas de medio MRS con elastina-rojo Congo (Sigma) al 0,1 % y se incubaron durante 48 horas a 37°C. A partir de un cultivo puro de *B. breve* N24.5, se hicieron siembras en estría en placas de medio MRS con 2% de maltosa y con elastina-rojo Congo (Sigma) al 0,1 % y se incubaron durante 48 horas a 37°C. Tras el periodo de incubación, las placas se dejaron a 4°C durante 3 días. Pasado ese tiempo, la actividad elastásica se detectó por la formación de un halo alrededor de las colonias que la producen. El resultado de este ensayo
- 25
- 30        mostró la ausencia de actividad elastásica en las tres cepas de la invención.

En la Tabla 1 se muestra un resumen del resultado de la presencia de factores de virulencia para cada cepa.

35

**Tabla 1.** Resultado de los ensayos de bioseguridad.

| Microorganismo           | Actividad    |            |                 |            |
|--------------------------|--------------|------------|-----------------|------------|
|                          | Gelatinásica | Elastásica | Hialuronidásica | Hemolítica |
| <i>B. breve</i> N24.5    | -            | -          | -               | -          |
| <i>L. rhamnosus</i> L8.6 | -            | -          | -               | -          |
| <i>L. rhamnosus</i> N4.7 | -            | -          | -               | -          |

#### 4.2 Resistencia a antibióticos

- 5 La resistencia a antibióticos es una característica poco deseable en las bacterias genéticamente transferibles, dado que es fácilmente transferible entre especies. Especialmente, es indeseable que microorganismos que se van a administrar a individuos celíacos o que padezcan enfermedades asociadas sean resistentes a antibióticos, dado que una vez en el intestino pueden transmitir las resistencias a otros microorganismos.
- 10 Se realizó un ensayo para determinar la resistencia de las cepas *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5 a antibióticos mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de varios antibióticos. La CIM es la concentración más baja de antibiótico a partir de la cual no se observa crecimiento bacteriano.
- 15 El ensayo se llevó a cabo con las tiras antibióticas M.I.C.E. (Oxoid), que contienen el antibiótico a ensayar en un gradiente de concentración entre 0,015 µg/mL y 256 µg/mL. Se analizaron siete antibióticos de diferentes familias farmacológicas para que los grupos más importantes de antibióticos se vieran representados. Se siguieron las recomendaciones del fabricante y los resultados obtenidos se compararon con los valores
- 20 de los puntos de corte microbiológicos establecidos por la EFSA para la susceptibilidad a compuestos antibacterianos en bacterias usadas como aditivos alimentarios (EFSA, 2012). La Tabla 2 muestra el resultado para cada una de las cepas. Los datos obtenidos son el resultado de dos experimentos independientes.
- 25 **Tabla 2.** Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los microorganismos para antibióticos.

| Antibiótico    | CIM (µg/mL)           |                          |                          |
|----------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
|                | <i>B. breve</i> N24.5 | <i>L. rhamnosus</i> L8.6 | <i>L. rhamnosus</i> N4.7 |
| Amoxicilina    | 1                     | 0,5                      | 1,5                      |
| Cefotaxima     | 12                    | 3                        | 6                        |
| Ciprofloxacina | 2                     | 0,375                    | 0,375                    |
| Eritromicina   | 1,5                   | 0,023                    | 0,023                    |

|              |      |       |       |
|--------------|------|-------|-------|
| Penicilina   | 0,75 | 0,375 | 0,375 |
| Tetraciclina | 0,18 | 0,18  | 0,75  |
| Vancomicina  | 0,25 | >256  | >256  |

De estos experimentos se concluye que las cepas *B. breve* N24.5, *L. rhamnosus* L 8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 no comprenden factores de virulencia ni son resistentes a antibióticos de acuerdo con los criterios establecidos por la EFSA, lo que las hace seguras y adecuadas para incorporarse en productos destinados al consumo humano y animal.

**Ejemplo 5: Resistencia al estrés gastrointestinal: resistencia al tránsito gástrico, al tránsito intestinal y a las sales biliares.**

Debido a que las cepas de la invención pueden formar parte de composiciones para administración oral, es necesario que sean resistentes al estrés gastrointestinal, es decir, sean resistentes a todas las etapas de la digestión hasta que ejerzan su actividad anti-inflamatoria en el intestino delgado. Por este motivo, se analizó la resistencia de cada cepa al tránsito gástrico, al tránsito intestinal y a las sales biliares.

15

**5.1 Resistencia al tránsito gástrico**

A partir de cultivos de cada cepa en fase estacionaria se incubaron *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 en medio MRS a 37°C durante 48 horas en condiciones microóxicas y *B. breve* N24.5 en medio MRS suplementado con 2 % de maltosa a 37°C durante 48 horas en condiciones anóxicas. Una vez los cultivos alcanzaron su fase estacionaria, se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos. Las células recogidas se lavaron con PBS a pH 7,4 y cada muestra se centrifugó a 5000 xg durante dos minutos. Este proceso se repitió tres veces. A 0,2 mL de la suspensión final de bacterias lavadas se añadieron 0,3 mL de solución salina estéril (NaCl al 0,9 %) y 1 mL de una solución de pepsina 3 g/L pH 2 o pH 4,5 en solución salina que simula el jugo gástrico. En el experimento control se sustituyó el mililitro de “jugo gástrico” por 1 mL de PBS a pH 7,4. Cada muestra se mezcló suavemente durante 5-10 segundos y se incubó a 37°C. Se tomaron alícuotas de 100 µL de las mezclas a tiempos 0, 30, 90 y 180 minutos para determinar el número total de microorganismos viables de cada cepa resistentes al jugo gástrico. Se hicieron diluciones seriadas 1:10 en NaCl 0,9 % y se plaquearon: *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 en medio MRS y se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones microóxicas, mientras que *B. breve* N24.5 se sembró en medio MRS suplementado con 2% de maltosa y se incubó a 37°C



durante 48 horas en condiciones anóxicas. Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias de cada cepa para calcular las ufc/mL y determinar su viabilidad.

La Tabla 3 muestra el resultado de este ensayo. La resistencia de las cepas al jugo gástrico se expresa como el logaritmo de las ufc/mL de los microorganismos viables. Se expresa la media de dos ensayos independientes y entre paréntesis la desviación estándar. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas mediante la prueba estadística t de Student respecto al tiempo 0. \*\* p<0,01.

10 **Tabla 3.** Resistencia de los microorganismos al tránsito gástrico. NC: No Crecimiento.

|                                       |         | <i>B. breve</i><br>N24.5 | <i>L. rhamnosus</i><br>L8.6 | <i>L. rhamnosus</i><br>N4.7 |
|---------------------------------------|---------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Control</b><br><b>(PBS pH 7,4)</b> | 0 min   | 9,9 (0,16)               | 9,6 (0,12)                  | 9,1 (0,05)                  |
|                                       | 30 min  | 9,6 (0,03)               | 9,5 (0,08)                  | 9,1 (0,08)                  |
|                                       | 90 min  | 9,6 (0,08)               | 9,6 (0,06)                  | 9,1 (0,15)                  |
|                                       | 180 min | 9,8 (0,02)               | 9,4 (0,04)                  | 9,4 (0,13)                  |
| <b>pH 2 + pepsina</b>                 | 0 min   | 10,0 (0,13)              | 9,5 (0,03)                  | 9,2 (0,05)                  |
|                                       | 30 min  | 6,7 (0,07) **            | 4,2 (0,09) **               | 6,7 (0,04)                  |
|                                       | 90 min  | NC                       | NC                          | 4,8 (0,05)                  |
|                                       | 180 min | NC                       | NC                          | NC                          |
| <b>pH 4,5 + pepsina</b>               | 0 min   | 9,9 (0,08)               | 9,25 (0,02)                 | 9,3 (0,02)                  |
|                                       | 30 min  | 9,6 (0,04)               | 9,3 (0,06)                  | 9,3 (0,01)                  |
|                                       | 90 min  | 9,4 (0,02)               | 9,6 (0,05)                  | 9,5 (0,07)                  |
|                                       | 180 min | 9,7 (0,04)               | 9,6 (0,07)                  | 9,4 (0,14)                  |

## 5.2 Resistencia al tránsito intestinal

Para determinar la resistencia de los microorganismos al paso por el intestino, se siguió un procedimiento similar al realizado para estudiar la resistencia al tránsito gástrico. La diferencia es que se sustituyó la solución que simula el jugo gástrico por una solución de pancreatina 3 g/L en solución salina a pH 6,5 o pH 8, que simula el jugo intestinal. Como control, se sustituyó el mililitro de solución que simula el "jugo intestinal" por 1 mL de PBS a pH 7,4. Para determinar el total de microorganismos viables, se tomaron alícuotas de 100 µL de cada mezcla a tiempos 0, 120 y 240 minutos y, del mismo modo que en el caso anterior, se sembraron en placas diluciones seriadas 1:10 para calcular las ufc/mL de cada cepa y determinar su viabilidad.

La Tabla 4 muestra el resultado del ensayo. La resistencia de las cepas al jugo intestinal se expresa como el logaritmo de las ufc/mL de los microorganismos viables. Se expresa la media de dos ensayos independientes y entre paréntesis la desviación estándar. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas mediante la prueba estadística t de Student respecto al tiempo 0. \*p<0,05; \*\* p<0,01.

**Tabla 4.** Resistencia de los microorganismos de la invención al tránsito intestinal. NC: No Crecimiento.

|                                 |         | <i>B. breve</i><br>N24.5 | <i>L. rhamnosus</i><br>L8.6 | <i>L. rhamnosus</i><br>N4.7 |
|---------------------------------|---------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Control (PBS<br/>pH 7,4)</b> | 0 min   | 9,9 (0,16)               | 9,6 (0,12)                  | 9,1 (0,05)                  |
|                                 | 120 min | 9,6 (0,001)              | 9,06 (0,01)                 | 9,2 (0,02)                  |
|                                 | 240 min | 9,7 (0,02)               | 9,7 (0,04)                  | 9,5 (0,19)*                 |
| <b>pH 6,5 +<br/>pancreatina</b> | 0 min   | 9,9 (0,06)               | 9,8 (0,06)                  | 9,1 (0,15)                  |
|                                 | 120 min | 9,7 (0,07) *             | 9,7 (0,03) **               | 9,4 (0,08)                  |
|                                 | 240 min | 9,2 (0,15) *             | 9,8 (0,07)                  | 9,4 (0,01)                  |
| <b>pH 8 +<br/>pancreatina</b>   | 0 min   | 10,0 (0,05)              | 9,4 (0,12)                  | 9,3 (0,03)                  |
|                                 | 120 min | 9,6 (0,03)**             | 9,6 (0,12)                  | 9,5 (0,02)                  |
|                                 | 240 min | 9,8 (0,07)*              | 9,6 (0,09)                  | 9,4 (0,04)                  |

### 5.3 Resistencia a las sales biliares

A partir de cultivos de cada cepa en fase estacionaria se incubaron *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 en medio MRS a 37°C durante 48 horas en condiciones microóxicas y *B. breve* N24.5 en medio MRS suplementado con 2% de maltosa a 37°C durante 48 horas en condiciones anóxicas. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo y se centrifugaron a 5000 xg durante 5 minutos. Después se realizó un lavado de las células recogidas con PBS a pH 7,4 centrifugando a 5000 xg durante dos minutos. Este proceso se repitió tres veces. Sobre el pellet de bacterias lavadas se añadió 1 mL del medio MRS a *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 y 1 mL medio MRS suplementado con 2 % de maltosa a *B. breve* N24.5 suplementado con distintas concentraciones de sales biliares (Sigma) (0,1 %, 0,25 % y 0,5 %). Como control, se añadió medio de cultivo sin sales biliares. Se mezcló bien y se incubó a 37°C. Se tomaron alícuotas tras 1 minuto y 4 horas de incubación, se hicieron diluciones seriadas 1:10 en NaCl 0,9 % y se sembraron. Las cepas *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7 se sembraron en medio MRS y se incubaron a 37°C durante 48 horas en condiciones microóxicas. *B. breve* N24.5 se sembró en medio MRS suplementado con 2 % de maltosa y se incubó a 37°C durante 48

horas en condiciones anóxicas. Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las colonias para calcular las ufc/mL y determinar su viabilidad.

La Tabla 5 muestra el resultado del ensayo. La resistencia de cada cepa a las sales biliares se expresa como el logaritmo de las ufc/mL de los microorganismos viables. Se expresa la media de dos ensayos independientes y entre paréntesis la desviación estándar. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas mediante la prueba estadística t de Student respecto al control (0 % sales biliares) en ese mismo tiempo. \*p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

**Tabla 5.** Resistencia de los microorganismos de la invención a sales biliares. NC: No Crecimiento.

|                                     |         | <i>B. breve</i><br>N24.5 | <i>L. rhamnosus</i><br>L8.6 | <i>L. rhamnosus</i><br>N4.7 |
|-------------------------------------|---------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Control (0 % sales biliares)</b> | 1 min   | 9,0 (0,04)               | 10,1 (0,07)                 | 9,6 (0,05)                  |
|                                     | 240 min | 9,0 (0,04)               | 10,5 (0,03)                 | 9,3 (0,09)                  |
| <b>0,1 % sales biliares</b>         | 1 min   | 8,6 (0,10)               | 9,7 (0,05) **               | 9,2 (0,05)                  |
|                                     | 240 min | 8,1 (0,04) ***           | 8,8 (0,07) **               | 8,9 (0,03)                  |
| <b>0,25 % sales biliares</b>        | 1 min   | 4,7 (0,08) **            | 6,2 (0,08) ***              | 8,9 (0,007) *               |
|                                     | 240 min | 3,7 (0,03) ***           | 3,8 (0,11) ***              | 8,3 (0,05) *                |
| <b>0,5 % sales biliares</b>         | 1 min   | 3,5 (0,05) **            | NC                          | 4,2 (0,03) **               |
|                                     | 240 min | 2,7 (0) **               | NC                          | 2,7 (0) **                  |

#### **Ejemplo 6: Capacidad de adhesión a las células intestinales.**

La capacidad de adhesión de las cepas de la invención a las células intestinales es una característica deseable para cualquier microorganismo probiótico, ya que incrementa el tiempo de residencia de las bacterias probióticas en el intestino y, por lo tanto, su efecto beneficioso. Además, la adhesión de estos microorganismos al epitelio intestinal provoca la exclusión de microorganismos patógenos por competencia.

La capacidad de adhesión de las cepas de la invención se valoró en la línea celular intestinal de origen humano Caco-2. Esta línea celular, en condiciones de cultivo estándar, es capaz de expresar de manera espontánea, una diferenciación morfológica y funcional característica de los enterocitos maduros. Por esta razón, es un excelente modelo para estudios de adhesión al epitelio intestinal humano.

Las células se cultivaron a una concentración de 25000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 12 pocillos (BD Falcon™) con 2 mL de medio de cultivo EMEM suplementado con 20 % de SFB y 0,4 % de solución antibiótica. El medio de cultivo se cambió cada 2 días durante 10-12 días desde la siembra, hasta que las células estuvieron totalmente diferenciadas y confluentes, de manera que la monocapa celular poseía las condiciones óptimas para realizar el experimento. Los ensayos se llevaron a cabo entre los pases 22 y 30.

En primer lugar, se evaluó el efecto de la mucina en la capacidad de adhesión de los microorganismos. Para ello se siguió el protocolo descrito previamente, pero la monocapa de células Caco-2 se sometió a un tratamiento con mucina gástrica porcina tipo II (Sigma) en el momento previo a la adición de la cepa bacteriana. La presencia de mucina refleja mejor las condiciones fisiológicas del cuerpo humano, puesto que las mucinas tipo II son los componentes principales de la mucosa intestinal. El tratamiento consistió en añadir a la monocapa de células 1 mL de una solución filtrada de mucina gástrica porcina tipo II diluida en PBS pH 7,4 a una concentración de 0,5 mg/mL e incubar durante 1 hora.

A continuación, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron 3 veces con PBS pH 7,4. Tras los lavados, se añadió 1 mL del medio EMEM suplementado con 20 % de SFB sin antibióticos y se incubó durante 24 horas a 37°C con atmósfera enriquecida con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

Tras la incubación, se añadió a los pocillos en torno a  $1-4 \times 10^8$  ufc de cada cepa. Las bacterias se añadieron resuspendidas en medio EMEM con SFB sin antibióticos y la mezcla de células intestinales y cada cepa se incubó durante 1 hora a 37 °C con atmósfera enriquecida con un 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS pH 7,4 para retirar las bacterias no adheridas. Para resuspender las células intestinales y las bacterias adheridas la monocapa se disgregó añadiendo 200 µL de tripsina-EDTA (0,25 % tripsina y 0,53 mM EDTA) y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron 800 µL de EMEM con SFB sin antibióticos para inactivar la tripsina y se mezcló bien la suspensión de células intestinales y bacterias adheridas.

Para el recuento de las bacterias adheridas se hicieron diluciones seriadas 1:10 con NaCl 0,9 %, se sembraron en placas de medio MRS en el caso de *L. rhamnosus* y de medio MRS con 2 % de maltosa para *B. breve* y se calcularon las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL). Los ensayos se hicieron por triplicado para cada

microorganismo y la adhesión se expresó como el porcentaje de bacterias adheridas respecto al total de bacterias añadidas.

La **Figura 4** muestra capacidad de adhesión de las cepas *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5 a las células epiteliales intestinales Caco-2 en ausencia (barras grises) o presencia (barras blancas) de mucina. La adhesión de los microorganismos a las células intestinales se expresa como el porcentaje de microorganismos adheridos respecto al total de microorganismos añadidos. Los datos representados son la media de 3 experimentos independientes en cada caso, y las diferencias significativas entre la adhesión con y sin mucina se calcularon mediante la prueba estadística t de Student considerando diferencias significativas \*  $p < 0,05$ .

Como se observa en la figura, en presencia de mucina se incrementa significativamente la adhesión del microorganismo a las células, especialmente en los casos de *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7, lo que les convierte en muy buenos candidatos para usarse como probióticos con efecto en el intestino.

#### **Ejemplo 7. Actividad antibacteriana frente a microorganismos patógenos.**

Otro de los mecanismos mediante el cual las bacterias probióticas contribuyen a la protección del hospedador es su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos. Las bacterias probióticas pueden producir compuestos antimicrobianos que permitan reducir y controlar la presencia de microorganismos potencialmente patógenos.

25

Para analizar la actividad antibacteriana de las cepas de la invención se llevaron a cabo dos técnicas: la técnica Agar Spot Test y la técnica de difusión en agar de los sobrenadantes libres de células (SLC).

En la técnica Agar Spot Test, se depositaron 5  $\mu$ L del cultivo (una gota) en fase estacionaria de cada cepa sobre una placa de medio sólido MRS para *L. rhamnosus* L8.6 y *L. rhamnosus* N4.7, y sobre una placa de medio sólido MRS suplementado con 2 % de maltosa para *B. breve* N24.5. Una vez se secó la gota de cada cepa se incubó la placa durante 24 horas a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se vertió sobre las placas 7 mL de TSA con 0,5 % de agar y 0,1 % del microorganismo patógeno indicador *Pseudomonas aeruginosa* TCD46.1, previamente cultivado durante 24 horas a 37°C. Estas placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. Pasado ese tiempo, se observó un crecimiento

homogéneo del microorganismo indicador por toda la placa. Sin embargo, alrededor del *spot* (gota de crecimiento) de cada cepa se observó un halo de inhibición del crecimiento del microorganismo indicador, lo que indica que las cepas actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos.

5

La técnica de difusión en agar se realizó de la siguiente forma: se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivos de cada cepa al final de su fase exponencial y se centrifugaron a 5000 xg durante 10 minutos a 4°C para obtener los SLC. Se sembraron placas de medio de cultivo sólido TSA con el microorganismo patógeno indicador *P. aeruginosa* TCD46.1, previamente cultivado en medio líquido a 37°C durante 24 horas. A continuación, se introdujo una torunda de algodón estéril en el cultivo líquido y se sembró la placa arrastrando la torunda por toda la placa en varias direcciones. Cuando la placa estaba seca, se hicieron pocillos de aproximadamente 7-8 mm de diámetro en el centro y se añadieron a cada pocillo 50 µL del SLC de la cepa a ensayar. Las placas se incubaron a 4°C durante 3 horas para que el SLC difundiera a través del agar. Tras ese tiempo, se incubó la placa durante 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo, se observó un crecimiento homogéneo del microorganismo patógeno indicador por toda la placa y un halo de inhibición alrededor de los pocillos que contenían el SLC de cada una de las cepas.

20 *P. aeruginosa* es una bacteria que, además de ser patógena, puede estar implicada en el desarrollo de la enfermedad celiaca (Caminero *et al.*, 2016), de ahí la gran importancia de la actividad antibacteriana de las cepas de la invención. Se ha comprobado que las cepas *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5 tienen actividad antimicrobiana frente a *P. aeruginosa*.

25

Para saber si la actividad inhibitoria de las cepas es debida a producción de ácidos o de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por los microorganismos, los SLC en los que se detectó actividad antimicrobiana fueron analizados de la siguiente forma:

- (i) Para comprobar que la actividad antimicrobiana era debida a la formación de ácidos se añadió gota a gota una solución de NaOH 2 M a los SLC hasta ajustar su pH a 7;
- (ii) Para comprobar que la actividad era debida a la producción de peróxido de hidrógeno por el microorganismo, se incubó cada SLC con catalasa (Sigma) a una concentración final de 1 mg/mL durante 20 minutos a temperatura ambiente.

35

La Tabla 6 muestra la actividad antimicrobiana de las cepas *L. rhamnosus* L8.6, *L. rhamnosus* N4.7 y *B. breve* N24.5 frente a la cepa patógena *P. aeruginosa* TCD46.1

analizada mediante las técnicas “Agar Spot Test” y “Difusión en agar del SLC”. La presencia de actividad se indica con el signo +. El ensayo se hizo por duplicado para confirmar los resultados. En los casos en los que se detectó actividad antimicrobiana en los SLC, se repitió el ensayo tratando el SLC con NaOH o catalasa para comprobar si la actividad antimicrobiana era debida a la producción de ácidos o a la producción de peróxido de hidrógeno.

**Tabla 6.** Actividad antimicrobiana

| Microorganismo           | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TCD46.1 |     |            |                |
|--------------------------|---------------------------------------|-----|------------|----------------|
|                          | Spot Test                             | SLC | SLC + NaOH | SLC + catalasa |
| <i>B. breve</i> N24.5    | +                                     | +   | -          | +              |
| <i>L. rhamnosus</i> L8.6 | +                                     | +   | -          | +              |
| <i>L. rhamnosus</i> N4.7 | +                                     | +   | -          | +              |

10

De este experimento se deduce que las tres cepas son capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *P. aeruginosa* CT46.1 y que la inhibición es debida a la producción de ácido láctico. Esto corrobora los datos obtenidos en el resto de ejemplos y demuestra que las tres cepas son aptas para su uso en composiciones farmacéuticas o probióticas.

15

## BIBLIOGRAFÍA

20 Altschul SF1, Gish W, Miller W, Myers EW y Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3):403-410.

Baker GC, Smith JJ y Cowan DA (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Methods.* 55: 541-555.

25

Bernardo D (2008). Interacciones innato-adaptativas en el sistema inmune y su relación con la patogenia de la enfermedad celiaca. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.

30 Caminero A, Herrán AR, Nistal E, Pérez-Andrés J, Vaquero L, Vivas S, Ruiz de Morales JM, Albillos SM y Casqueiro J (2014). Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiol Ecol.* 88: 309-319.

- Caminero A, Galipeau HJ, McCarville JL, Johnston CW, Bernier SP, Russell AK, Jury J, Herran AR, Casqueiro J, Tye-Din JA, Surette MG, Magarvey NA, Schuppan D, Verdu EF (2016). Duodenal Bacteria From Patients With Celiac Disease and Healthy Subjects  
5 Distinctly Affect Gluten Breakdown and Immunogenicity. *Gastroenterology* 151:670-683.
- EFSA (2012). EFSA Panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*. 10(6): 2740.
- 10 Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A y Khosla C (2007). Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*. 133: 472-480.
- 15 Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, Camarca A, Silano M, Losito I, De Vincenzi M, De Bari MD, Palmisano F, Maurano F, Gianfrani C y Gobbetti M (2007). Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: new perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol*. 73 (14):4499-4507.
- 20 Salvati MV, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings MK, Stefanile R, De Giulio B, Iaquinto G, Giardullo N, Aurichio S, Roncarolo MG y Troncone R (2005). Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut* 54(1):46-53.
- Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM y Khosla C (2002).  
25 Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 297: 2275-2279.
- Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Lundin KE, Gjertsen HA, Kontakou M y Ciclitira PJ (1994). Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet*. 343 (8900): 758-761.



**REIVINDICACIONES**

- 5      1.    Cepa microbiana seleccionada entre *Lactobacillus rhamnosus* L8.6 (CECT 9514),  
         *Lactobacillus rhamnosus* N4.7 (CECT 9515) o una combinación de las mismas.
2.    Cepa microbiana de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como medicamento.
- 10     3.    Cepa microbiana de acuerdo con la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de  
         trastornos relacionados con la ingesta de gluten.
4.    Cepa microbiana para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el trastorno  
         relacionado con la ingesta de gluten es la enfermedad celiaca.
- 15     5.    Uso de una cepa microbiana de acuerdo con la reivindicación 1 como aditivo en  
         alimentos funcionales, alimentos probióticos, alimentos simbióticos, suplementos  
         alimenticios o alimentos nutraceuticos.
6.    Composición médico-farmacéutica que comprende al menos una de las cepas  
20           microbianas de acuerdo con la reivindicación 1.
7.    Composición de acuerdo la reivindicación 6 para uso en tratamiento y/o prevención  
         de trastornos relacionados con la ingesta de gluten.
8.    Composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el trastorno relacionado  
25           con la ingesta de gluten es la enfermedad celiaca.

30

35

FIG.1

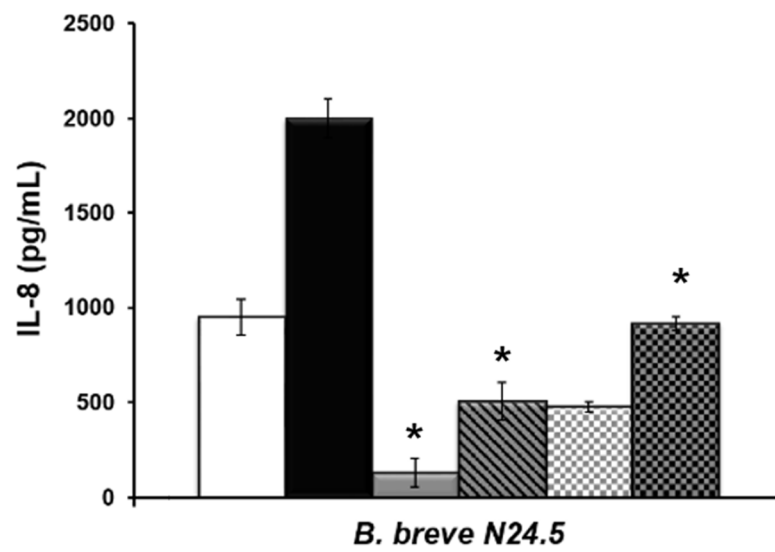
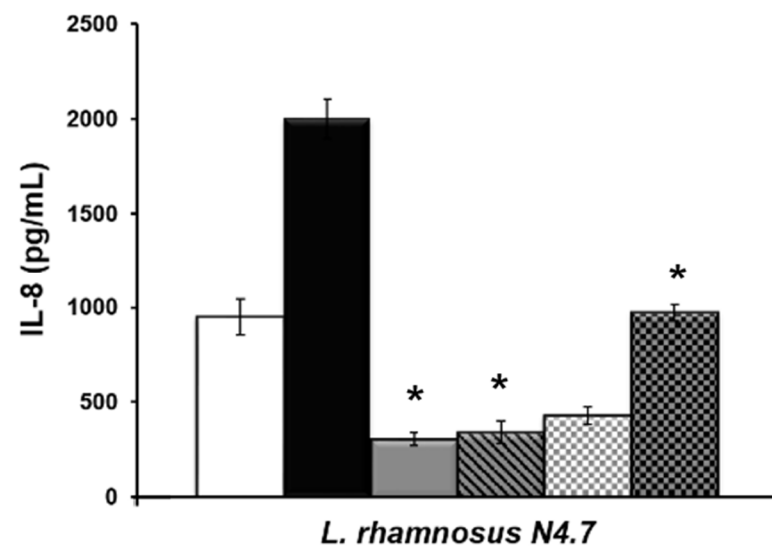
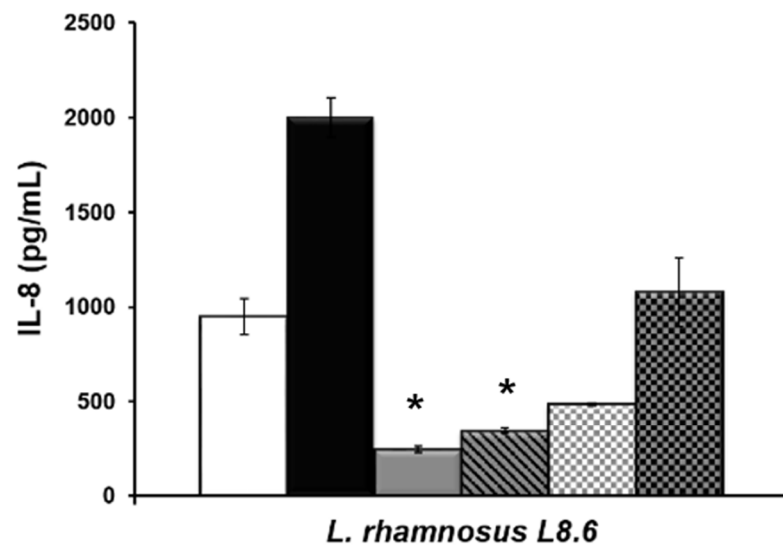


FIG. 2

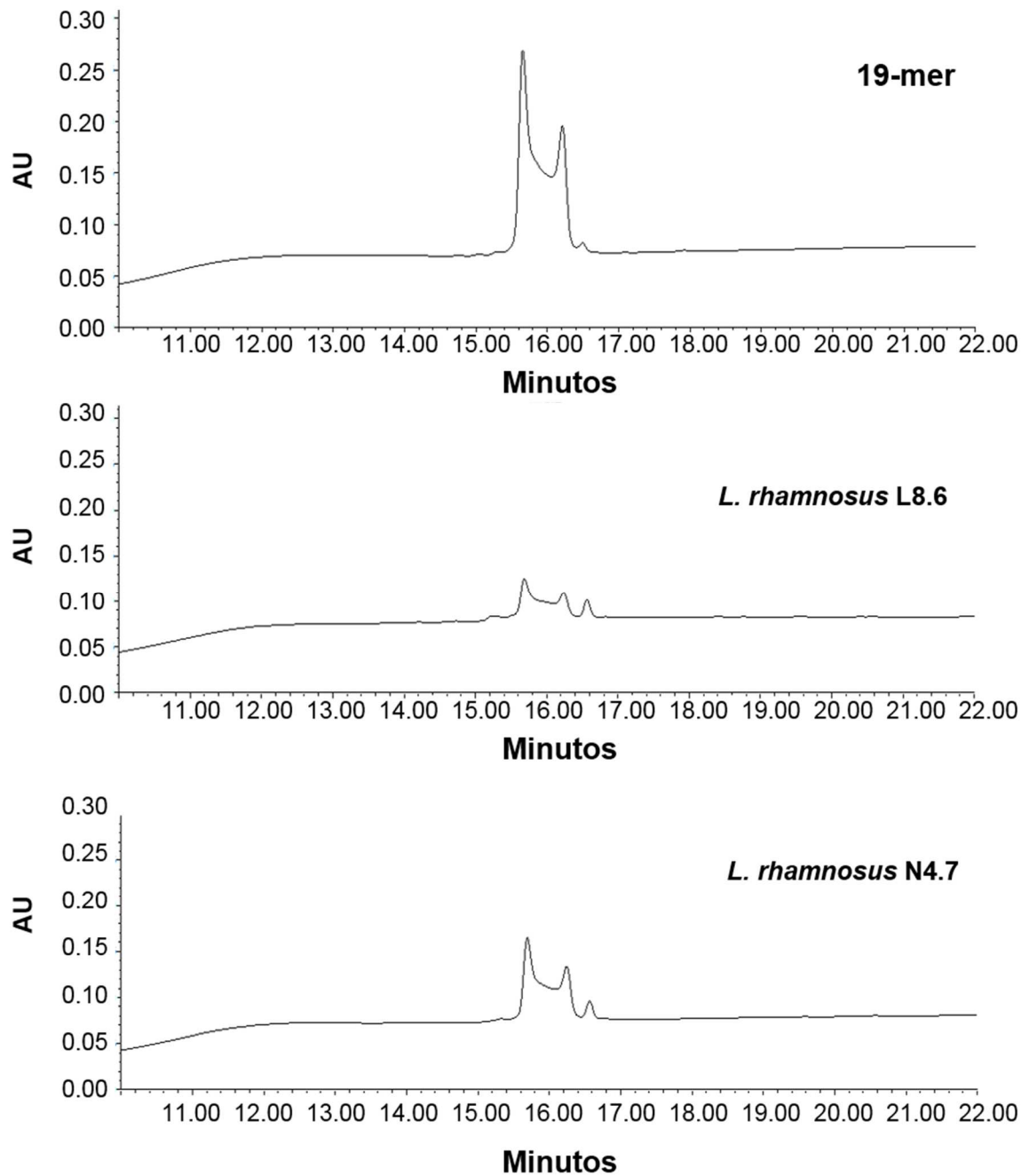


FIG. 3

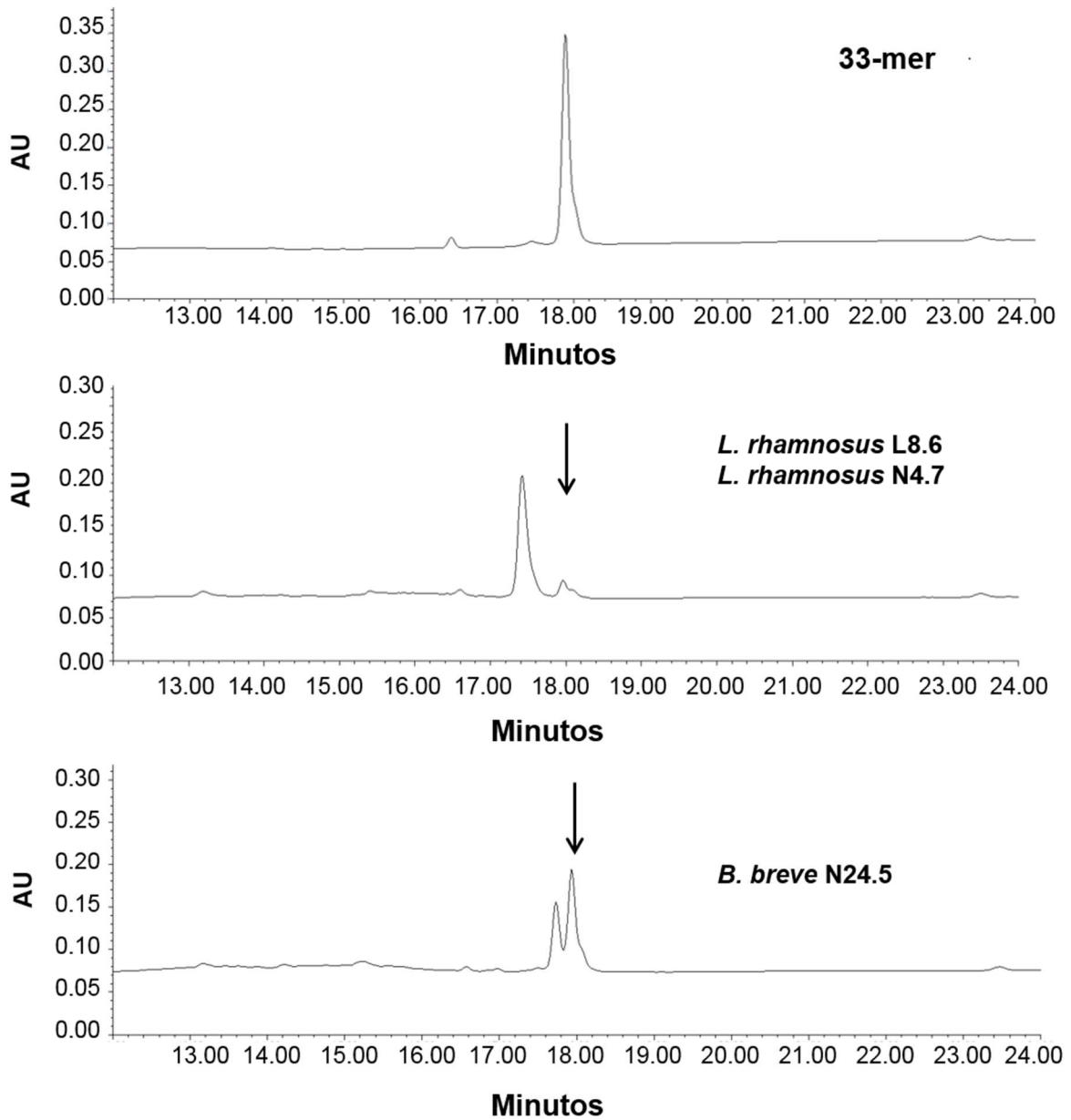


FIG. 4

