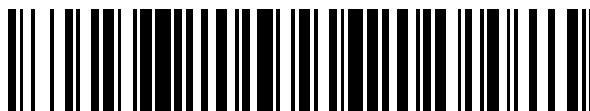


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 552**

51 Int. Cl.:

C12R 1/225 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/IB2011/055876**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093561**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11811572 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2794930**

54 Título: **Cepa nueva de *Lactobacillus mucosae***

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2017

73 Titular/es:

**COMPAGNIE GERVAIS DANONE (100.0%)
17, Boulevard Haussmann
75009 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**SMOKVINA, TAMARA y
DEGIVRY, MARIE-CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 598 552 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

Cepa nueva de *Lactobacillus mucosae*

La invención se refiere a una cepa nueva de *Lactobacillus mucosae* y su uso, en particular para aliviar disfunciones de la barrera intestinal.

- 5 El epitelio intestinal actúa como una barrera defensiva que protege la superficie de la mucosa frente a contenidos lumbinales y medioambiente externo.

La capa epitelial intestinal tiene un nivel bajo de permeabilidad debido a la presencia de uniones estrechas (UEs) entre las células. Las uniones estrechas son complejos intercelulares que funcionan como una barrera que limita la transferencia de materiales a partir del lumen intestinal en la mucosa intestinal. La alteración de estos complejos se puede inducir por factores externos tales como algunos patógenos entéricos, o por citoquinas proinflamatorias, que incluyen en particular TNF- α y INF- γ ; esto lleva a permeabilidad paracelular epitelial incrementada, que contribuye a varios desórdenes intestinales, que incluye en particular síndrome del intestino irritable, enfermedades de inflamación intestinal crónica (enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa), y enfermedad celiaca (para revisión, véase (CLAYBURGH et al., Lab Invest, 84, 282-91, 2004).

- 15 Se sabe que varias bacterias ácido lácticas probióticas tienen efectos de protección del epitelio intestinal, a través de diferentes mecanismos (para revisión véase (OHLAND & MACNAUGHTON, American Journal of Physiology – gastrointestinal and Liver Physiology, 298, G807-G19, 2010). Sin embargo, solo algunas cepas de algunas especies han mostrado que mejoran la función de la barrera epitelial a través del decremento de su permeabilidad. (RESTA-LENERT & BARRETT, Gastroenterology, 130, 731-46, 2006) informan que *Streptococcus thermophilus* y
20 *Lactobacillus acidophilus* evitan el incremento de permeabilidad epitelial inducido por TNF- α y INF- γ . (MIYAUCHI et al., J. Dairy Sci, 92, 2400-8, 2009) estudiaron los efectos de 4 lactobacilos (una cepa de *L. delbrueckii*, una cepa de *L. casei*, una cepa de *L. gasserii*, y *L. rhamnosus* cepa OLL2838) sobre la función de la barrera intestinal disminuida y permeabilidad paracelular inducida por TNF- α . Encontraron que *L. rhamnosus* OLL2838 suprimía significativamente el incremento de TNF- α inducido de permeabilidad paracelular, mientras que otras cepas
25 ensayadas no tenían efectos significativos. (DONATO et al., Microbiology, 156, 3288-97, 2010) mostró que *L. rhamnosus* cepa LGG aliviaba los efectos de TNF- α o INF- γ sobre la integridad de la barrera epitelial. (EUN et al., Apmis, 119, 49-56, 2010) mostró que *L. casei* cepa DN114001 (CNCM I-1518) también evitaba el incremento de permeabilidad epitelial inducida por TNF- α o INF- γ . Z. ZAKOSTELSKA et al., informaron de que el lisado de *Lactobacillus paracasei* DN-114001 (CNCM I-1518) refuerza la integridad de la barrera celular de la tripa in vivo
30 (ZAKOSTELSKA et al., 2011. PlosOne 6(11).

Se aisló *Lactobacillus mucosae* por primera vez del intestino delgado de cerdos, y después se aisló de intestino y vagina humanos, así como de intestino de perro, ternero y caballo.

- Primero se caracterizó como especies por ROOS y sus colaboradores (ROOS et al., Int J Syst Evol Microbiol, 50 Pt 1, 251-8, 2000). Taxonómicamente, *Lactobacillus mucosae* está íntimamente relacionado con *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus pontis*. Contiene el género *mub*, que engloba una proteína de la superficie celular que le da la capacidad de unirse al mucus. ROOS et al., la describieron como Gram-positiva, catalasa negativa, no formadora de esporas, bacilo no móviles, que crece a 45°C pero no a 15°C.

- Algunas cepas de *Lactobacillus mucosae* han mostrado tener actividad antimicrobiana. TZORTIS al (TZORTZIS et al., J Appl Microbiol, 96, 552-9, 2004) señala que la cepa NCIMB 41149 de *L. mucosae* tiene actividad inhibitoria *in vitro* sobre *Echerichia coli* y *Salmonella typhimurium* cuando crece en presencia de malto oligosacárido o maltosa, pero no en presencia de glucosa, isomalto oligosacáridos, gentiobiosa o celobiosa. La solicitud PCT WO 2011/107960 describe el uso de *L. mucosae* cepas DSM23409 y DSM23408 para tratamiento y prevención de infecciones de *E. coli*.

- Hasta ahora, no se ha informado de ningún efecto de ninguna cepa de especies de *Lactobacillus mucosae* sobre la función de la barrera intestinal.

Los inventores ahora han identificado una cepa nueva de *Lactobacillus mucosae*, que además de actividad antimicrobiana tiene la capacidad de mejorar la función de la barrera intestinal, en particular disminuyendo la permeabilidad epitelial intestinal.

- Un sujeto de la presente invención es esta cepa, que se depositó, de acuerdo con el Tratado de Budapest, con el CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue Docteur Roux, Paris), el 3 de febrero de 2011, con el número I-4429.

La cepa CNCM I-4429 es un microorganismo Gram positivo, catalasa negativo, no móvil, no formador de esporas; las células se dan como bacilos con dimensiones de 1x2-4 μ m, aislados en pares o como cadenas pequeñas.

Tiene propiedades antimicrobianas y en particular inhibe fuertemente el crecimiento de *Salmonella enterica*.

También tiene la propiedad de disminuir la permeabilidad de la barrera intestinal, en otras palabras de proteger o restaurar la impermeabilidad paracelular epitelial, y en particular la propiedad de evitar o revertir el incremento de permeabilidad paracelular epitelial inducido por TNF- α .

5 También se describen las cepas de *Lactobacillus mucosae* que se pueden obtener por mutagénesis o por transformación genética de la cepa CNCM I-4429.

10 Preferentemente, estas cepas retienen las propiedades de la cepa CNCM I-4429 sobre la decreciente permeabilidad de la barrera intestinal. Pueden ser cepas en las que uno o más de los genes endógenos de la cepa CNCM I-4429 ha (han) mutado, por ejemplo de modo que modifica algunas de sus propiedades metabólicas (p. ej., la capacidad de esta cepa de metabolizar azúcares, su resistencia al tránsito intestinal, su post acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas que resultan de transformación genética de la cepa CNCM I-4429 con uno o más genes de interés, haciendo posible, por ejemplo, conferir características fisiológicas adicionales sobre dicha cepa, o expresar proteínas de interés terapéutico o vacunas, que se desea administrar por medio de dicha cepa.

15 Estas cepas se pueden obtener de la cepa CNCM I-4429 por medio de técnicas convencionales de mutagénesis al azar o de sitio dirigido y transformación genética de lactobacilos, tales como los descritos, por ejemplo, por GURY et al. (Arch Microbiol., 182, 337-45, 2004) o por VELEZ et al. (Appl Environ Microbiol., 73, 3595-3604, 2007), o por la técnica conocida como "barajado de genoma" (PATNAIK et al. Nat Biotechnol., 20, 707-12, 2002; WANG Y. et al., J Biotechnol., 129, 510-15, 2007).

20 Un sujeto de la presente invención es también un método para obtener una cepa de *Lactobacillus mucosae* capaz de disminuir la permeabilidad de la barrera intestinal, que comprende una etapa de mutagénesis o una transformación genética de la cepa CNCM I-4429.

También se describe un método para obtener una fracción celular capaz de disminuir la permeabilidad de la barrera intestinal, a partir de una cepa de *Lactobacillus mucosae* según la invención.

Dichas fracciones celulares son el particular preparaciones de ADN o preparaciones de pared bacteriana obtenidas a partir de cultivos de dicha cepa. También pueden ser cultivos sobrenadantes o fracciones de esos sobrenadantes.

25 Un sujeto de la presente invención también es una composición que comprende una cepa de *Lactobacillus mucosae* según la invención.

30 Estas composiciones en particular pueden ser fermentos lácticos, que combinan una cepa de *Lactobacillus mucosae* según la invención con uno u otros más, cepa(s) de bacteria ácido láctica, opcionalmente probiótica. A modo de ejemplo de bacterias ácido láctica, se puede hacer mención de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Bifidobacterium*, en particular *Lactobacillus bulgaricus*, cepas de *Streptococcus thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, cepas de *Lactobacillus casei ssp. paracasei*.

También pueden ser productos alimentarios, y en particular productos lácteos, o productos farmacéuticos o cosméticos que comprenden una cepa de *Lactobacillus mucosae* según la invención.

35 Cuando dicha cepa está presente en forma de una bacteria viva, preferentemente está presente en una proporción de al menos 10^5 cfu por gramo, ventajosamente al menos 10^6 cfu por gramo de producto, más ventajosamente al menos 10^7 cfu por gramo, e incluso más ventajosamente 10^8 cfu por gramo.

Un sujeto de la presente invención es también un método para obtener una composición según se describió anteriormente, caracterizado por que comprende:

- 40
- Obtener un *Lactobacillus mucosae* según la invención, y
 - Incorporar dicha cepa a dicha composición.

La cepa de *Lactobacillus mucosae* y composición de la invención se pueden usar en el tratamiento o prevención de estados que implican disfunciones de la barrera intestinal, en particular estados asociados con un incremento de la permeabilidad de la barrera intestinal.

45 La presente invención se entenderá más claramente a partir de la descripción siguiente, que se refiere a ejemplos que ilustran la caracterización y propiedades de la cepa de *Lactobacillus mucosae* CNCM I-4429.

Ejemplo 1 – morfología y propiedades de fermentación de la cepa CNCM I-4429 de *Lactobacillus mucosae*.

Morfología.

50 En la figura 1 se muestran imágenes de microscopio electrónico de la cepa CNCM I-4429. La cepa CNCM I-4429 aparece en forma de espiral; es un bacilo en espiral.

ES 2 598 552 T3

Análisis del metabolismo de hidratos de carbono.

El análisis de fermentación de azúcares se llevó a cabo en un aparato Bioscreen (Oy Growth Curves Ab Ltd). Para el análisis se seleccionaron 21 azúcares. Se listan en la tabla 1.

5 El ensayo llevado a cabo en Bioscreen duró veinticuatro horas, la medición se llevó a cabo cada 20 minutos después de 10 segundos de agitado. Los análisis se hicieron dos veces en tres réplicas. Para evitar el efecto de represión del catabolito de glucosa, se usó galactosa para el medio de precultivo.

- Medio de precultivo MRS-galactosa;
- Medio de cultivo, MRS con 1% del azúcar probado
- En cada pocillo; 300 µl de medio y 1% de precultivo

10 - OD medido cada 20 minutos durante 24 horas después de 10 segundos de agitado.

El blanco se representa por MRS sin bacteria.

Los resultados se muestran en la tabla 1 siguiente: (+) para la presencia de crecimiento (+/-) para un crecimiento moderado y (-) para una ausencia de crecimiento. El crecimiento se consideró como positivo cuando el OD alcanzó 0,8 o más.

Nº	Azúcar	Crecimiento
1	D-ribosa	+
2	D-galactosa	+
3	D-fructosa	+
4	D-manosa	+
5	L-sorbosa	+
6	D-manitol	+
7	D-sorbitol	-
8	D-celobiosa	+
9	D-maltosa	+
10	D-lactosa	+
11	D-sacarosa	+
12	D-trehalosa	+
13	Dulcitol/galactitol	-
14	D-melecitosa	-
15	Xilosa	+
16	Mio-inositol	-
17	D-melibiosa	+
18	Gluconato	+
19	Galactosamina	-
20	Glucosa	+

15

Resultados.

La cepa CNCM I-4429 de *Lactobacillus mucosae* tiene un diseño específico de metabolismo de azúcar. El diseño es completamente diferente de los de cepas de *L. rhamnosus* o *L. paracasei*. Dos azúcares no se metabolizan en absoluto: melecitosa y dulcitol.

- 5 Tres azúcares se metabolizan muy poco y muy tarde: galactosamina, mio-inositol y sorbitol. Cuatro azúcares se metabolizan pero tarde: manitol, celulosa, sorbosa y fructosa.

Ejemplo 2 – propiedades de la unión al mucus de la cepa CNCM I-4429 de *Lactobacillus mucosae*.

Adhesión a mucina.

- 10 El ensayo de adhesión a mucina de estómago de porcino tipo II (Sigma Aldrich) se llevó a cabo mediante dos protocolos para estudiar la formación de biopelícula, “estático” y “dinámico”.

La primera y última etapa de la preparación para ambos protocolos era la misma. Se disolvió mucina en PBS pH 7, en concentración de 20 mg/ml, después se sumergieron esferas (6 mm de diámetro) de cristal esterilizadas por calor en la disolución de mucina, se incubó durante 1 hora a 37°C y posteriormente se dejó durante la noche a 4°C. El día después las esferas se lavaron dos veces en PBS a pH 7.

- 15 Para el protocolo “estático” las esferas se sumergieron en 1 ml de cultivo durante la noche de *L. mucosae* que creció en MRS + glucosa / MRS + ribosa y se incubó durante 4 horas a 37°C, mientras que en el modelo dinámico cada cepa se incubó con esferas de vidrio durante 1 hora a 37°C antes del comienzo.

- 20 El modelo dinámico para estudiar la formación de biopelícula estaba compuesto de dos válvulas de admisión de 5-vías (Sarstedt S.R.L., Verona, Italia) conectadas entre ellas con tubos de plástico, conectores (PF 0052), y cámaras de goteo corto (PF 0047) equipadas con cobertor de una dirección (PF 0146), (Industrie Borla S.p.A., Moncalieri, Italia). Todos los componentes se esterilizaron previamente por inmersión en etanol (50%) y su unión con los colectores se dio en condiciones estériles. En todas las pruebas se usaron tres cámaras, rellenas con el cultivo y tres esferas de vidrio. El medio MRS (Oxoid) diluido en agua (50%) y con adición de vancomicina (4 µg/ml), se usó como medio para obtener el flujo continuo (por gravedad) en las cámaras durante 24 horas. La temperatura de las cámaras se mantuvo a 37°C por medio del uso de un baño de agua externo. Posteriormente la esfera se eliminó asépticamente (en el modelo dinámico dos veces: después de 1 hora-T0 y al final de la incubación-T24), enjuagado dos veces en disolución salina fisiológica para eliminar las células no adherentes, sumergido en 1 ml de disolución salina fisiológica y sometido a vortex durante 1 minuto para eliminar las células adjuntas en la disolución. Después se prepararon diluciones decimales y se pulverizó 100 µl de cada dilución en placas Petri que contenían medio Agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe).

Las diluciones decimales se prepararon también de los cultivos de la noche (para protocolo estático) y del medio presente en las cámaras – células planctónicas (en protocolo dinámico), para determinar el número de células adheridas. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas en condiciones anaeróbicas.

Los resultados se muestran en la tabla II siguiente:

35

Tabla II

Adhesión a mucus de cepas de *L. mucosae* (ensayo estático)

Cepas/tiempo	Líquido (cfu/ml)	T4 (cfu/ml)
Glucosa		
<i>L. mucosae</i> CNCM I-4429	7,55E+08	4,20E+06
<i>L. mucosae</i> LMG 19534 T	1,69E+08	2,20E+05
<i>L. mucosae</i> 4	5,55E+08	2,00E+06
<i>L. mucosae</i> 5	2,40E+08	1,70E+06
Ribosa		
<i>L. mucosae</i> CNCM I-4429	1,50E+09	1,20E+05
<i>L. mucosae</i> LMG 19534 T	1,50E+06	2,00E+03

Cepas/tiempo	Líquido (cfu/ml)	T4 (cfu/ml)
<i>L. mucosae</i> 4	4,50E+07	3,00E+04
<i>L. mucosae</i> 5	1,70E+07	6,00E+04

Adhesión a mucus de cepas de *L. mucosae* (ensayo dinámico)

Cepas/tiempo	T0 (cfu/ml)	T4 (cfu/ml)
<i>L. mucosae</i> CNCM I-4429	1,6E+06	8,8E+04
<i>L. mucosae</i> LMG 19534 T	1,6E+03	5,4E+04
<i>L. mucosae</i> 4	5,22E+04	5,2E+04
<i>L. mucosae</i> 5	5,84E+04	3,0E+04

5 Estos resultados muestran que la cepa CNCM I-4429 de *Lactobacillus mucosae* tiene una adhesión más alta a mucus cuando se compara con las otras 3 cepas de *L. mucosae*.

Adhesión a monocapas celulares.

10 La evaluación de adhesión a monocapas Caco2 y HT29 se llevó a cabo dos veces en dos réplicas. Los ensayos consistieron en 90 minutos de incubación de cepas de *L. mucosae* (10^7 cfu – 10^8 cfu) con la monocapa de líneas de células compuestas de 500.000 células. Las cepas de *L. mucosae* se tiñeron previamente durante 30 minutos con sonda fluorescente 6CFDA. Al final del tiempo de incubación, las monocapas se lavaron suavemente y las células de microorganismos adheridas se lisaron para cuantificar el nivel fluorescente y para determinar el número de células adheridas al epitelium.

Los resultados se muestran en la tabla III siguiente:

Tabla III

15 Células HT-29

CNCM I-4429	Extendido: 10^8 cfu	Adherido:	3,00E+05
-------------	-----------------------	-----------	----------

Células Caco2

CNCM I-4429	Extendido: 10^8 cfu	Adherido:	4,00E+05
-------------	-----------------------	-----------	----------

Ejemplo 3 – actividad antimicrobiana de cepas CNCM I-4429 de *Lactobacillus mucosae*.

20 Para las pruebas se ha usado el método “de recubrimiento” descrito en la bibliografía. (CHARTERIS et al., J Food Prot, 61, 1636-43, 1998; TOMINAGA & HATAKEYAMA, Appl Environ Microbiol, 72, 1141-7, 2006).

25 Se centrifugaron cultivos de 11h, 18h y 48h de *Lactobacillus mucosae* CNCM I-4429 sobre medio que contiene glucosa y se ajustó el pH ácido del sobrenadante (~pH 4) con NaOH 2M a pH 6,5. De ese modo el ácido láctico se neutralizó y disoció lo cual elimina su toxicidad. La prueba “de recubrimiento” se lleva a cabo sobre placas. El medio usado era Brain Heart Infusion-BHI (Difco) suave (0,7% agar), inoculado con un cultivo durante la noche de *Salmonella enterica*. Cuando la superficie del medio tras la inoculación se secó, en cada placa se perforaron 4 pocillos de 5 mm de diámetro. Después, se colocó en cada pocillo 80 µl de sobrenadante sin células de *L. mucosae* (pH ajustado y sin ajustar para comparar).

30 Las placas se incubaron 24 horas en condiciones anaeróbicas a 37°C. Los resultados se visualizaron y se tomaron las placas con manchas. Los experimentos se repitieron al menos dos veces, mayoritariamente tres veces.

Los resultados de un experimento representativo con un cultivo de 16 horas se muestran en la figura 2: a la izquierda y arriba la inhibición del crecimiento de *Salmonella enterica* con el sobrenadante de *L. mucosae* a pH 4; a

la derecha y arriba la inhibición del crecimiento de patógeno con el sobrenadante de *L. mucosae* neutralizado (pH 6,5). Abajo la inhibición de crecimiento de *Salmonella enterica* con el sobrenadante de *L. paracasei* a pH 4 (a la izquierda) y pH 6,5 (a la derecha).

5 Para el *L. mucosae*, los tamaños de la zona de inhibición son: a pH 4 = 18 mm y a pH 6,5 = 16 mm. Para el *L. paracasei*, los tamaños de la zona de inhibición son: a pH 4 = 16 mm y a pH 6,5 = 3 mm.

Estos resultados muestran que *L. mucosae* CNCM I-4429 muestra una inhibición de crecimiento muy fuerte del patógeno *Salmonella enterica*.

Ejemplo 4: efecto de la cepa CNCM I-4429 de *Lactobacillus mucosae* sobre la resistencia transepitelial de células epiteliales de la tripa.

10 Se comparó el efecto de la cepa CNCM I-4429 sobre la resistencia transepitelial de una monocapa de células epiteliales intestinales Caco2 con las de diversas cepas de *L. casei* y *L. rhamnosus* incluyendo cepa DN 114001 de *L. casei* (CNCM I-1518) y cepa LGG de *L. rhamnosus*, que ambas son conocidas por su capacidad para disminuir la permeabilidad de la barrera epitelial intestinal (DONATO et al., 2010 y EUN et al., 2010, citados anteriormente).

Métodos:

15 Se usaron células Caco2. Estas células son capaces de formar una monocapa con condiciones *in vivo*.

Las células crecen en un medio mínimo Eagle (modificado por Dulbecco/vogt DMEM, Invitrogen) que contiene 10% de suero (BioWhittaker), 1% de aminoácidos (Invitrogen) y 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de penicilina/estreptomicina (10.000 U/ml de penicilina, 10.000 µg/ml de estreptomicina, Invitrogen). Las células se mantienen a 37°C en un incubador de atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

20 Dos veces a la semana las células se lavan con tampón BFS sin calcio y magnesio y se diluyen en un medio fresco. Las células están triptinizadas (Trypsine Invitrogen). La viabilidad de las células se comprueba con el ensayo de exclusión azul de tripán. Se pusieron 4 millones de células en matraces especiales para cultivo celular de 75 cm² (TPP).

Se inoculan placas Transwell (Sigma) con 10⁵ células en 0,5 ml de medio en ambos compartimentos.

25 En paralelo se cultivan bacterias durante 16 horas a 37°C en medio MRS.

Después de 6 días de incubación celular, cuando TEER es > 1.300 omega, las bacterias se ponen en contacto con células. 10⁶ cfu de las bacterias a ensayar se añaden al compartimento apical de las cámaras Transwell y se incuban con células durante 24 horas. Para la experimentación llevada a cabo en presencia de TNF-α, se añade en el compartimento basal de las cámaras Transwell a 10 ng/ml, 3 horas después de las bacterias. Como un control, se usa una cámara Transwell sin adición de bacterias.

30 Se mide TEER en las cámaras Transwell con el voltímetro Evom² (World Precision Instruments) a T₀ y T₂₄. La experiencia se repitió tres veces independientemente. La evolución de TEER durante se representa como la proporción:

[TEER_{24h}/TEER_{t0} células tratadas con bacterias] / [TEER_{24h}/TEER_{t0} control].

35 Resultados:

Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4.

40 La figura 3 muestra los efectos de la bacteria probada sobre la resistencia transepitelial de la monocapa celular en condiciones basales. La figura 4 muestra sus efectos sobre la resistencia transepitelial de la monocapa celular después de su desestabilización con TNF-α. L.c. indica cepas de *L. casei*, siendo L.c. 01 cepa CNCM I-1518; L.rh. indica cepas de *L. rhamnosus*, siendo L.rh 35 cepa LGG; L.m. 15 representa *L. mucosae* CNCM I-4429; se identifica el control.

Los resultados de la figura 3 muestran que en condiciones basales *L. mucosae* CNCM I-4429 realiza la resistencia transepitelial aproximadamente 21%. Bajo las mismas condiciones experimentales *L. rhamnosus* LGG lo realiza aproximadamente 31% y *L. casei* CNCM I-1518 lo realiza aproximadamente 13%.

45 Los resultados de la figura 4 muestran que después de la desestabilización con TNF-α la resistencia transepitelial de la monocapa control baja un 14% comparado con las condiciones basales. Por el contrario, en células incubadas con *L. mucosae* CNCM I-4429 la resistencia transepitelial se realiza aproximadamente 8% cuando se compara con las condiciones basales. Bajo las mismas condiciones experimentales *L. rhamnosus* LGG lo realiza aproximadamente 16% y *L. casei* CNCM I-1518 lo realiza aproximadamente 5%.

Ejemplo 5: efecto de cepa CNCM I-4429 de *Lactobacillus mucosae* sobre la distribución de ZO-1 en una monocapa de células epiteliales de tripa.

ZO-1 es una proteína de andamiaje intracelular de unión estrecha, que juega un papel importante en la integridad de las uniones estrechas y las impermeabilizaciones del epitelio UE.

5 La distribución de ZO-1 en las monocapas de células Caco2 usada en el ejemplo 4 se estudió por inmunofluorescencia, bajo condiciones basales o después del tratamiento con TNF- α con o sin preincubación con lactobacilo, como se describe en el ejemplo 4. El efecto de *L. mucosae* CNCM I-4429 sobre la distribución subcelular de ZO-1 se comparó con el efecto de la cepa L.c. 21 de *Lactobacillus casei*, que no tenía efecto sobre el realce de resistencia transepitelial (figura 4).

10 Los resultados se muestran en la figura 5: A: monocapa de células Caco2 bajo condiciones basales; B: monocapa de células Caco2 tratadas con TNF- α ; C: monocapa de células Caco2 tratadas con TNF- α en presencia de L.c. 21; D: monocapa de células Caco2 tratadas con TNF- α en presencia de CNCM I-4429.

15 Bajo condiciones basales, ZO-1 se localiza principalmente en la membrana de células; tratamiento mediante TNF- α induce una desorganización de ZO-1, mostrado por la presencia de estructuras intracitoplasmáticas difusas. Estas estructuras también están presentes en células tratadas con TNF- α incubadas con L.c. 21, mientras que células tratadas con TNF- α incubadas con CNCM I-4429 muestran casi el mismo diseño de distribución de ZO-1 que células bajo condiciones basales.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Lactobacillus mucosae* depositada bajo el número CNCM I-4429.
- 5 2. Un método para obtener una cepa de *Lactobacillus mucosae* capaz de disminuir la permeabilidad de la barrera intestinal caracterizado por que comprende una etapa de mutagénesis o transformación genética de la cepa CNCM I-4429.
3. Una composición que comprende la cepa de *Lactobacillus mucosae* de la reivindicación 1.
4. La composición de la reivindicación 3 caracterizada por que es un producto alimentario.
- 10 5. Un método para obtener una composición según las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado por que comprende obtener la cepa de *Lactobacillus mucosae* de la reivindicación 1, e incorporar dicha cepa en dicha composición.
6. La cepa de *Lactobacillus mucosae* de la reivindicación 1 o la composición de la reivindicación 3 para usar como un medicamento para el tratamiento o prevención de estados que resultan de disfunciones de la barrera intestinal.

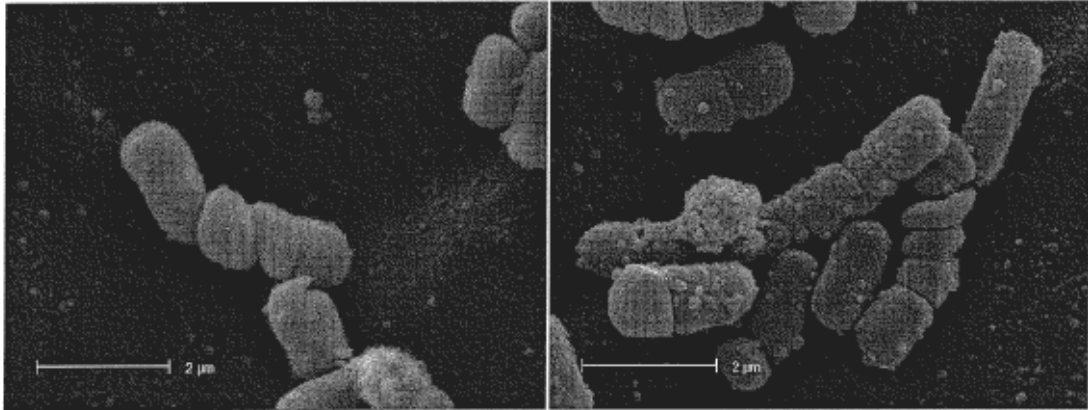


Figura 1

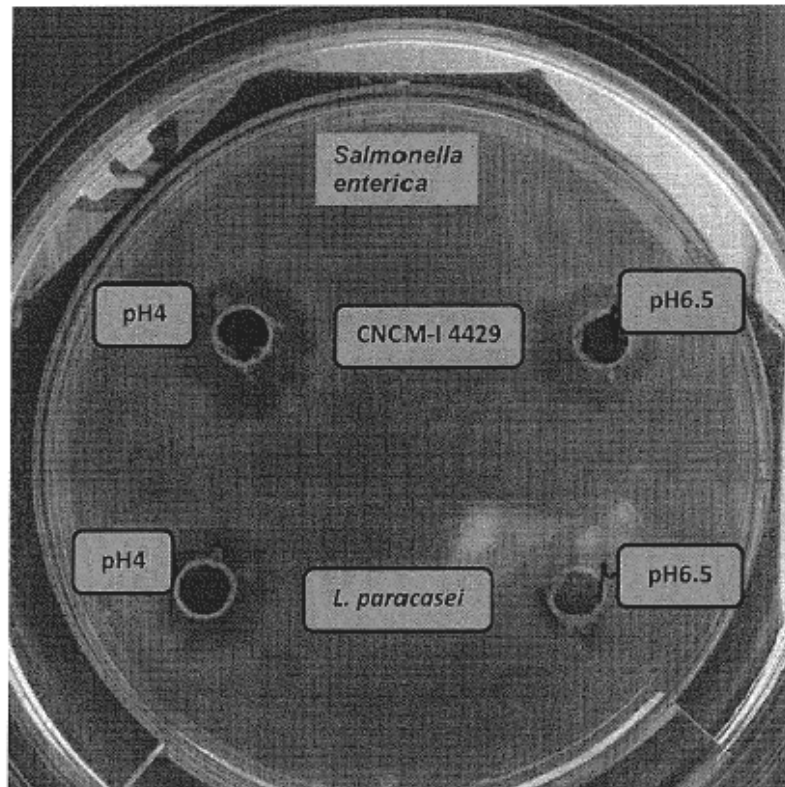


Figura 2

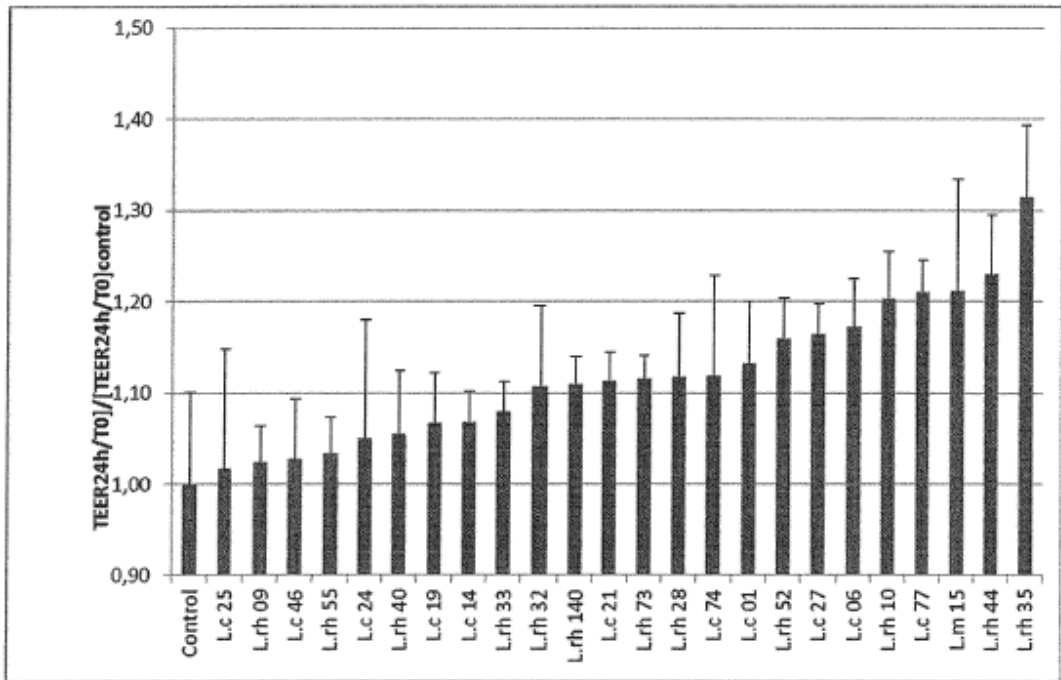


Figura 3

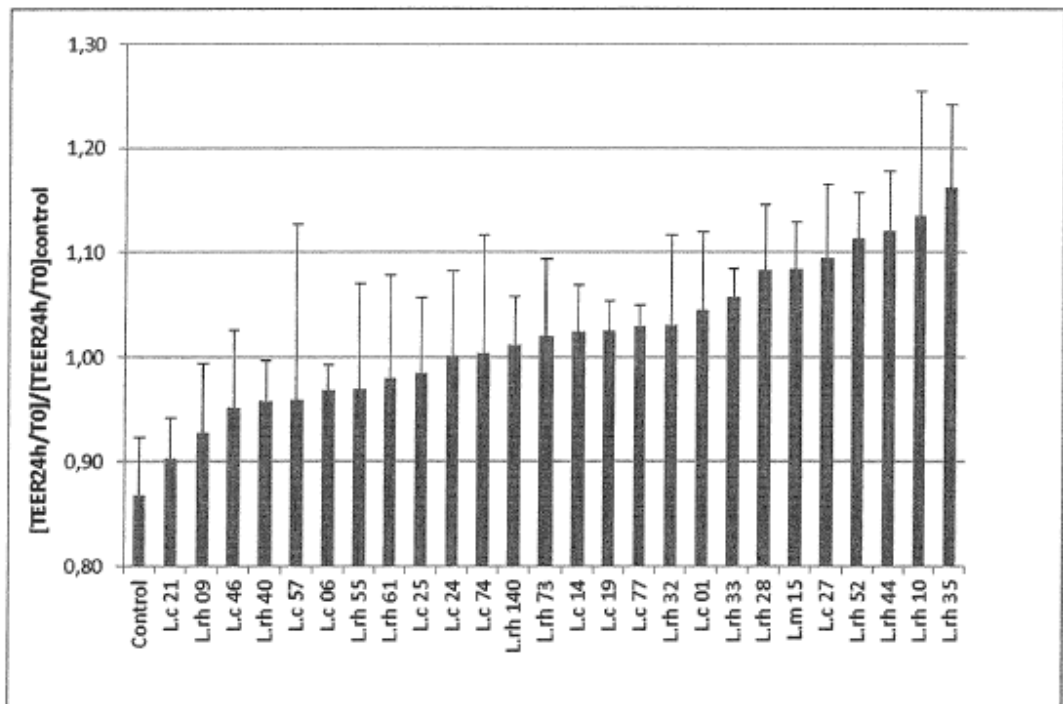
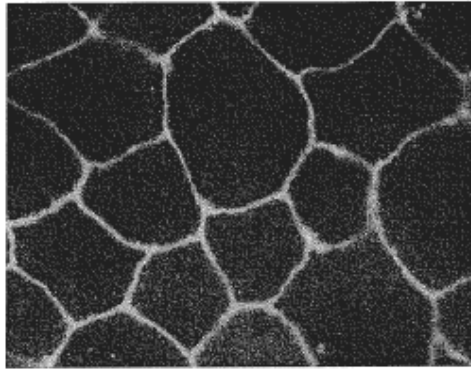
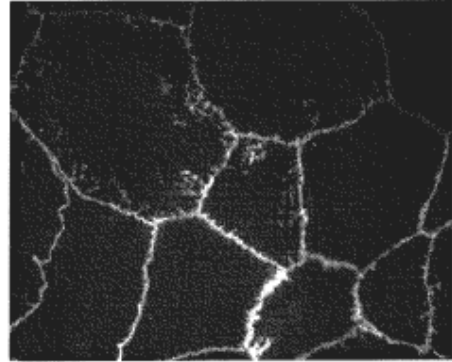


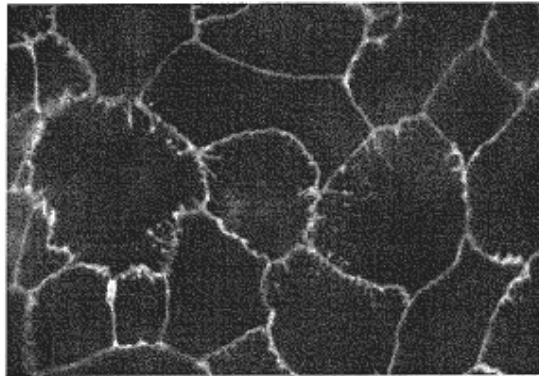
Figura 4



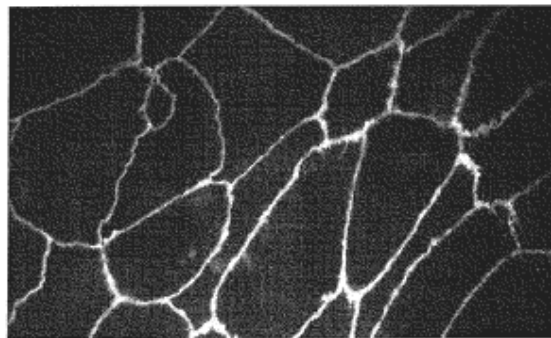
A



B



C



D

Figura 5