(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 678 395**

(51) Int. CI.:

C12N 1/20 (2006.01)
A61K 35/747 (2015.01)
C12R 1/245 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2015 PCT/EP2015/061467**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177366**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2015 E 15723540 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 3146037**

(54) Título: **Nueva cepa de Lactobacillus casei con capacidad para degradar el péptido inmunotóxico del gluten**

(30) Prioridad:

23.05.2014 ES 201430768

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.08.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

ALVAREZ SIEIRO, PATRICIA;
MARTÍN MARTÍN, MARIA, CRUZ;
REDRUELLO TRELLES, BEGOÑA;
LADERO LOSADA, VÍCTOR;
FERNÁNDEZ GARCÍA, MARÍA y
ÁLVAREZ GONZÁLEZ, MIGUEL, ÁNGEL

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Nueva cepa de *Lactobacillus casei* con capacidad para degradar el péptido inmunotóxico del gluten

Campo de la invención

La presente invención pertenece al sector de la industria alimentaria y farmacéutica. La cepa que se reivindica puede ser aplicada en la degradación de gluten, gliadina y sus péptidos, durante la elaboración de alimentos fermentados, funcionales y nuevos alimentos. También puede ser utilizada como un probiótico, simbiótico, nutracéutico o suplemento dietético, y en la elaboración de formulaciones farmacéuticas con aplicaciones clínicas.

Estado de la técnica

La enfermedad celíaca es un trastorno crónico del intestino delgado de carácter autoinmune que se induce por la ingestión de gluten en individuos genéticamente predispuestos. La sintomatología típica está asociada a alteraciones intestinales, debido a la atrofia de las vellosidades intestinales e hiperplasia de las criptas, que provocan una drástica reducción de la superficie de la pared intestinal (mala absorción, diarrea, anemia, fatiga, pérdida de peso, distensión abdominal, etc.). En la mayoría de los casos se dan también síntomas extra intestinales (osteoporosis, depresión, infertilidad, etc.), además la ingesta de gluten y la enfermedad celíaca se encuentran estrechamente asociadas con otros trastornos tales como diabetes mellitus tipo I, síndrome de Down, esclerosis múltiple, dermatitis herpetiforme, miopatía, artritis, autismo, esquizofrenia, linfomas etc. La enfermedad celíaca se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo, siendo una de las enfermedades genéticas más comunes en la que se encuentran implicados factores ambientales (gluten) y genéticos. Se estima una prevalencia de un 1% en la población general de la cual tan sólo 1 de cada 7-10 pacientes se encuentran bien diagnosticados y del 10 al 12% en familiares de primer grado (Book et al., 2003. Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families. Am J. Gastroenterol. 93; 377-81. Gujral et al., 2012. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. World J Gastroenterol. 14; 18(42): 6036-6059). Aunque hasta el momento la intolerancia al gluten se encontraba asociada a la población europea y americana, datos recientes revelan un aumento notable de afectados en otros países como China.

El principal factor ambiental desencadenante de la enfermedad celíaca y otros trastornos asociados es el gluten. El gluten está compuesto por un conjunto de proteínas que se encuentra en los granos de diferentes cereales: trigo, cebada, centeno y avena. Las proteínas del gluten pueden ser clasificadas en dos grupos dependiendo de su solubilidad en soluciones agua-alcohol: las prolaminas (fracción soluble) y las gluteninas (fracción insoluble) (Wieser 2007. Chemistry of gluten proteins. Food microbiol. 24; 115-119). La mayor parte de las secuencias peptídicas que conforman los epítopos tóxicos implicados en el desencadenamiento de la enfermedad celíaca son las prolaminas, que reciben un nombre diferente dependiendo del cereal del que provengan: gliadinas para el trigo, hordeinas en la cebada, secalina en el centeno y aveninas en la avena. Esta estructura multiproteica del gluten le confiere ciertas características tecnológicas de gran importancia como absorción de agua, retención de gas, cohesividad, viscosidad y elasticidad. Debido a ello, el gluten es un ingrediente esencial en muchos productos alimenticios, estando presente en un 70% de los alimentos manufacturados, para el que aún no se ha encontrado un sustituto adecuado,.

La estructura primaria de las gliadinas consiste en un elevado porcentaje de residuos de prolina (15%) y glutamina (35%), que le confiere una alta resistencia a la degradación por las enzimas gastrointestinales. Debido a ello, los péptidos resistentes a la acción de las enzimas gastrointestinales se acumulan en el lumen intestinal (Shan et al. 2005. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. J Proteome Res. 4, 1732-1741). Entre estos, se encuentra un péptido de 33 aminoácidos (33-mer) (LQLQPFPQPQLPYPQPLPYPQPQLPYPQPQPF) que ha sido descrito como el péptido más inmunogénico del gluten, por poseer seis epítopos tóxicos solapados (Qiao et al. 2004. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. J Immunol 173:1757-1762). En individuos susceptibles, estos péptidos son los responsables de una reacción anómala que eventualmente da lugar a una inflamación crónica de la mucosa intestinal, hiperplasia de las criptas y un deterioro progresivo de las vellosidades intestinales e incluso su desaparición total.

Entre los factores genéticos se encuentra implicado el complejo mayor de histocompatibilidad humano (HLA). La enfermedad celíaca se encuentra asociada con la expresión de HLA-DQ2 en más del 90% de los pacientes y de HLA-DQ8 en la mayoría de los restantes. Los péptidos tóxicos una vez desaminados, son reconocidos por las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8. Estas moléculas presentan los péptidos a los linfocitos T CD4+ que se activarán provocando una respuesta inmune adaptativa (Hausch et al. 2002. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. Am J Physiol Gastroint Liver Physiol. 238:G996-1003). Además, los péptidos del gluten también pueden desencadenar los mecanismos de la inmunidad innata mediante la producción de la citoquina IL-15 (Maiuri et al. 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. Lancet. 362(9377):30-7).

A pesar de la gravedad de los síntomas y de la elevada prevalencia de la enfermedad, aún no se ha desarrollado una terapia efectiva. El único tratamiento que existe actualmente para la enfermedad celiaca es una estricta dieta libre de gluten durante toda la vida del paciente. Evitar totalmente el consumo de gluten es una tarea complicada debido a que se encuentran trazas de gluten en más del 80% de los alimentos que consumimos. Además, hay que

tener también en cuenta el elevado coste de los productos libres de gluten. Todo ello aumenta la dificultad de seguir esta dieta especialmente para algunos sectores de la población tales como niños y ancianos. Con el propósito de facilitar la monitorización de la dieta libre de gluten y como seguridad alimentaria, la Comisión del Codex Alimentarius requiere que un alimento sea etiquetado como “exento o libre de gluten” cuando tenga menos de 20 ppm (equivalente a 10 ppm de gliadina), y como “bajo contenido en gluten” cuando posea menos de 100 ppm. Sin embargo, algunos pacientes celíacos son extremadamente sensibles, por lo que incluso el consumo de trazas de gluten presentes en los alimentos puede constituir un riesgo grave para su salud.

Los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares de la enfermedad han permitido el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. Algunas de estas estrategias actúan sobre los efectos inmunoestimuladores del gluten en la mucosa intestinal, por ejemplo, inhibiendo la transglutaminasa tisular (Khosla et al. 2009. Transglutaminase inhibitors and methods of use thereof. US7579313 B2), bloqueando la presentación de los antígenos a las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (Sollid et al. 2007. Drug therapy for celiac sprue. 20070161572/A1) o modulando la acción de las citoquinas tales como el INF o la IL-15 (Sandborn y Targan. 2002. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. Gastroenterol. 122(6):1592-608). Estas estrategias modifican moléculas implicadas en numerosos procesos biológicos por lo que su manipulación produciría efectos secundarios adversos. También se están estudiando alternativas dirigidas a modular la respuesta inmunológica anormal ocasionada por la interacción de los péptidos tóxicos del gluten con las células inmunocompetentes del individuo (Laparra et al., Bifidobacterium longum CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. PLoS One. 2012;7(2):e30744).

Otra alternativa para luchar contra la enfermedad celiaca es evitar la presencia de los péptidos tóxicos en los alimentos, habiéndose planteado varias estrategias:

- La selección de variedades de trigo que contengan menos contenido de epítopos tóxicos (Spaenij-Dekking et al. 2005. Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. Potential for selection and breeding of non-toxic wheat varieties. Gastroenterology. 129:797-806).

- La utilización de microorganismos capaces de hidrolizar los péptidos inmunotóxicos en las masas panarias (DiCagno et al. 2004. Sourdough bread made from wheat and nontoxic flours and selected lactobacilli is tolerated in celiac sprue patients. Appl Environ Microbiol 70:1088-96).

- La hidrólisis de los péptidos inmunotóxicos durante el proceso digestivo, evitando su llegada al intestino delgado. Por ejemplo, mediante la administración oral de enzimas purificadas de origen vegetal o bacteriano capaces de degradar los péptidos del gluten (Piper et al. 2004. Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. J Pharmacol Exp Ther.311:213-9; Tack et al. 2013. Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: a pilot-study. World J Gastroenterol. 19(35):5837-47; Gass et al. 2007. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. Gastroenterology. 133(2):472-80).

WO2011110881 A1 describe sobrenadantes del cultivo de cepas de *Lactobacillus* y *Streptococcus* que tienen una capacidad de degradar péptidos gliadina implicados en la enfermedad celiaca. Particularmente, el porcentaje de degradación del péptido de 33-mer de sobrenadantes del cultivo de las cepas de *Lactobacillus casei* P02503 A1 y P02503 A3 son, respectivamente, 72,5% y 87,5% (Tabla 1). Esto significa que un 27,5% y un 12,5% es péptido de 33-mer que permanece intacto (no degradado) en el medio, siendo así todavía inmunotóxico. Caminero et al. (FEMS Microbiology Ecology 88(2):309-319, 2014) describe varias cepas de Lactobacillus (Lactobacillus mucosae, amylovorus y rhamnosus) aisladas del intestino humano y que son capaces de degradar la gliadina 33-mer (véase la Tabla 1 y la columna de la derecha en la página 315). Se propone la utilización de dichas cepas para el tratamiento de la enfermedad celiaca.

Descripción de la invención

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a una nueva cepa bacteriana, *Lactobacillus casei* IPLA12038 con número de depósito CECT 8590. La cepa de *Lactobacillus casei* IPLA 12038 se depositó el 15 de abril de 2014 en la Spanish Type Culture Collection (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, Edificio 3 CUE, Parc Cientific Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980-Paterna, Valencia, España), por el depositante Miguel Ángel Álvarez González, IPLA-CSIC, Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa-Asturias (España). La cepa de *L. casei* IPLA 12038 recibió el número de acceso CECT 8590 después de que la Autoridad Internacional de Depósito declarara a la cepa como viable.

El depositante IPLA-CSIC, autorizó al Solicitante, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC), a hacer referencia al material biológico depositado mencionado anteriormente en la solicitud de patente europea que tiene el número de referencia de representante PD10109PC00 o en cualquier solicitud de patente posterior derivada de esta o que reivindica prioridad de esta, y otorgó su consentimiento sin reservas e irrevocable para que el material depositado esté disponible para el público según la Regla 33 de EPC y cualquier Regla de PCT y/o Artículo de PCT equivalente desde la fecha de presentación de la solicitud de patente mencionada anteriormente.

La cepa objeto de la invención fue aislada a partir de una masa ácida utilizada para la elaboración de pan. Se identificó mediante la secuenciación molecular del ARNr 16S, obteniendo que pertenecía a la especie *Lactobacillus casei*. La huella genética se determinó mediante PFGE, confirmándose que es diferente de otras cepas pertenecientes a la misma especie y demostrando así su exclusividad.

La principal ventaja de la invención es que la cepa *Lactobacillus casei* CECT 8590 sola, no combinada con otras cepas bacterianas, es capaz de degradar completamente el péptido de 33-mer en 12 horas de incubación. Otras cepas de la técnica anterior requieren su uso en combinación con otras cepas para degradar los péptidos del gluten y requieren más tiempo para degradarlos completamente. Otras cepas de la técnica anterior no son capaces de degradar completamente el péptido de 33-mer, produciendo así un combinado de péptidos 33-mer que todavía son inmunotóxicos. Otras cepas de la técnica anterior son capaces de degradar otros péptidos del gluten (tales como el 20-mer, 18-mer) pero no el péptido de 33-mer.

La cepa de la invención posee actividades peptidasa específicas para hidrolizar residuos de prolina, uno de los aminoácidos mayoritarios en las proteínas del gluten. La combinación de las distintas peptidasas de la cepa permite la degradación total del péptido inmunotóxico de 33-mer (FIG. 1 y 2). Particularmente, la cepa tiene actividades prolidasa (PepQ), prolil iminopeptidasa (PepI), dipeptidil aminopeptidasa IV (PepX) y aminopepidasa N (PepN).

La cepa objeto de la presente invención, sobrevive a las condiciones de estrés gastrointestinal, pH ácido y concentraciones altas de sales biliares, analizadas in vitro. Estas características garantizan su persistencia y efectividad prolongadas en el intestino tras su administración por vía oral, lo que facilita su uso como probiótico o complemento alimenticio (FIG. 3).

Así, en un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende una cantidad efectiva de la cepa aislada de *Lactobacillus casei* depositada en la Spanish Type Culture Collection (CECT) con el número de acceso CECT 8590, en la que la cepa tiene la capacidad de degradar gliadina y el péptido de 33-mer inmunotóxico que tiene la SEQ NO: 1 (LQLQPFPQPQLPYPQPLPYPQPQLPYPQPQPF), y se ha aislado de una masa fermentada usada en la preparación de pan.

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición que comprende la cepa, como se ha definido anteriormente, para uso como un medicamento o como un probiótico.

Otros aspectos de la invención se refieren a un producto farmacéutico, un producto veterinario, un alimento médico, un producto alimenticio, un suplemento alimenticio o una masa agria, una composición alimenticia probiótica, un suplemento dietético, una composición simbiótica, o una composición bioterapéutica, que comprende una cantidad efectiva de la composición como se ha definido anteriormente, junto con cantidades apropiadas de excipientes o ingredientes alimenticios aceptables.

Finalmente, otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener un mutante de la cepa de *Lactobacillus casei* depositada en la Spanish Type Culture Collection (CECT) con el número de acceso CECT 8590, en el que el método comprende usar la cepa depositada como material de partida y aplicar mutagénesis, y en el que el mutante obtenido retiene o potencia adicionalmente al menos la capacidad de la cepa depositada de degradar la gliadina y el péptido de 33-mer inmunotóxico que tiene la SEQ NO: 1.

Descripción detallada de la invención

Constituye un aspecto de la invención un microorganismo con capacidad para degradar la gliadina y el péptido inmunotóxico de 33 aminoácidos (33-mer) mencionado anteriormente. Esta propiedad funcional favorece la hidrólisis y eliminación de los epítopos tóxicos implicados en el desencadenamiento de la enfermedad celíaca, reduciendo la acumulación de los péptidos inmunotóxicos, y por lo tanto el riesgo del desarrollo de la enfermedad. Se caracteriza por ser un microorganismo no modificado genéticamente, aislado a partir de un alimento, no patógeno y seleccionado por su actividad degradadora de gluten, de aquí en adelante microorganismo objeto de la presente invención o cepa de la invención.

El microorganismo objeto de la presente invención se caracteriza también por ser una cepa perteneciente a la especie *Lactobacillus casei y* presenta otras características adicionales que se enumeran a continuación:

- Es un microorganismo generalmente reconocido como seguro (Generally Regarded As Safe, GRAS) según la FDA y QPS (Qualified Presumption of Safety) según la EFSA (Adams y Marteau. 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. Int J Food Microbiol. 27, 263-264).

- Forma parte de la microbiota gastrointestinal normal humana y durante años ha sido ampliamente utilizado en alimentos fermentados y como probióticos para mejorar la salud de su hospedador (Tuohy et al. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov Today 8:692-700).

- Las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* han sido utilizadas para tratar enfermedades inflamatorias del intestino (Clarke et al. 2012. Review article: probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome – focus on lactic acid bacteria. Aliment Pharmacol Ther 35:403-413). En concreto, estudios con una cepa de *Lactobacillus casei*

muestran su capacidad para reducir la enteropatía inducida por la gliadina en un modelo animal murino (D'Arienzo et al. 2011. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* administration in a mouse model of gliadin-sensitive enteropathy. Scand J Immunol 74:335-341).

La cepa de la invención, *Lactobacillus casei* IPLA12038 con número de depósito CECT 8590, ha sido aislada a partir de una masa fermentada utilizada para la elaboración de pan, proveniente de Polonia. Se identificó mediante la secuenciación molecular del fragmento de ARNr 16S. El fragmento secuenciado (1.007 bases) se amplificó por PCR utilizando los cebadores 1492R y 27F (Lane 1991. 16S/23S rRNA sequencing, 115-175. En E. Stackebrandt, y M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido). Mediante el alineamiento de la secuencia obtenida con las existentes en las bases de datos se detectó una similitud máxima con las secuencias equivalentes de cepas de la especie *L. casei*. La identidad más alta (99%) se obtuvo con la cepa *Lactobacillus casei* BL23 depositada en el GenBank (número de acceso CP005486.1).

La cepa de la presente invención es diferente de otras de la misma especie. Se determinó su huella genética con la técnica de electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE), según el protocolo descrito por Herrero-Fresno y colaboradores (Herrero-Fresno et al. 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. Int. J. Food Microbiol. 157, 297-304). Con esta técnica se obtuvo el perfil de restricción del ADN cromosómico de la cepa, cortado con la enzima SfiI, lo que da un perfil específico para cada cepa. Esto indica que en la presente se proporciona una cepa exclusiva. Mediante el software GeneTools se realizó un dendograma con otras cepas de la misma especie aisladas de ambientes similares, utilizando el índice de similitud Dice. Se obtuvo un 62% de homología con la cepa *Lactobacillus casei* BL23 depositada en el GenBank (número de acceso FM177140.1).

La nueva cepa de la invención posee peptidasas de amplia especificidad y peptidasas con especificidad para sustratos que contienen prolina, tales como la gliadina inmunotóxica que debido a su alto contenido en prolina son resistentes a la acción de las enzimas gastrointestinales. Concretamente, la cepa seleccionada tiene actividad aminopeptidasa (EC 3.4.11.11; PepN) (8,03 mUE/mg). Respecto a las actividades específicas para residuos de prolina, la nueva cepa de la invención tiene actividad prolidasa (EC 3.4.13.9; PepQ) (9,5 mUE/mg), prolina iminopeptidasa (EC 3.4.11.9; PepI) (0,58 mUE/mg) y prolil didpeptidil aminopetidasa IV (EC 3.4.14.5; PepX) (3,19 mUE/mg) (FIG. 1).

La cepa objeto de la invención es capaz de utilizar la gliadina como la única fuente de nitrógeno para su crecimiento y desarrollo.

El microorganismo objeto de la presente invención, se caracteriza porque degrada el principal péptido inmunotóxico presente en el gluten. La cepa es capaz de degradar totalmente el péptido de 33-mer (FIG. 2). La incubación de este péptido (195 ppm) en presencia de células viables de la cepa seleccionada permite la degradación total del péptido. Tras ocho horas de incubación, la cepa objeto de la presente invención degradó un 82 % del péptido inmunotóxico y tras 12 horas el péptido fue degradado completamente. Así, en una realización particular, la cepa es capaz de degradar totalmente el péptido inmunotóxico de 33-mer en 12 horas.

La nueva cepa objeto de la presente invención es capaz de sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal simulado *in vitro*. Se determinó la resistencia al estrés gástrico y gastrointestinal (Fernández de Palencia et al. 2008. Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. Eur Food Res Technol. 227:1475-1484). La cepa objeto de la presente invención mantuvo una viabilidad celular entre 10^7 - 10^8 ufc ml^{-1} y en las condiciones más extremas, pH 2 y pH 1,8, la cepa mantuvo una viabilidad celular de 10^4 ufc ml^{-1} (FIG. 3). Estos resultados confirman su uso potencial como probiótico. Además, la cepa fue resuspendida en leche, una matriz alimentaria que puede actuar como vehículo de probióticos y ser una fuente de nuevos alimentos funcionales.

Mediante la utilización de la cepa depositada como material de partida, el experto en la técnica puede obtener rutinariamente, por técnicas convencionales de mutagénesis y reaislamiento, mutantes adicionales de esta que retienen o potencian las características relevantes descritas en la presente memoria de las cepas que forman la composición de la invención. En una realización particular, los mutantes se obtienen usando tecnología de ADN recombinante. En otra realización, los mutantes se obtienen por mutagénesis aleatoria. Así, otro aspecto de la invención se refiere a un método para obtener un mutante de la cepa de *Lactobacillus casei* CECT8590, en el que el método comprende utilizar la cepa depositada como material de partida y aplicar mutagénesis, y en el que el mutante obtenido retiene o potencia adicionalmente al menos la capacidad de la cepa depositada de degradar la gliadina y el péptido inmunotóxico de 33-mer que tiene la SEQ NO:1.

El uso general de las cepas es en la forma de células viables. Sin embargo, también puede extenderse a células no viables tales como cultivos muertos o lisados celulares (obtenidos por la exposición a pH alterado, sonicación, radiación, temperatura, presión, o entre otros medios para matar o lisar bacterias) o composiciones que contienen factores beneficiosos producidos por la cepa.

En otra realización particular, la cepa aislada se ha fermentado en un medio artificial y sometido a un post-tratamiento después de la fermentación, para obtener células bacterianas, y en el que las células bacterianas resultantes están en un medio líquido o en una forma sólida. Particularmente, el post-tratamiento se selecciona del

grupo que consiste en: secado, congelación, liofilización, secado en lecho fluido, secado por pulverización y refrigeración en medio líquido.

La cepa de la invención se produce cultivando (o fermentando) las bacterias en un medio artificial adecuado y en condiciones adecuadas. Por la expresión "medio artificial" para microorganismos debe entenderse un medio que contiene sustancias naturales, y opcionalmente compuestos químicos sintéticos tales como el polímero polivinil alcohol que puede reproducir algunas de las funciones de los sueros. El medio artificial se esteriliza apropiadamente una vez que las sustancias se mezclan. De acuerdo con esto, entre las sustancias naturales, los medios artificiales comunes adecuados son caldos nutritivos que contienen los elementos incluyendo una fuente de carbono (p. ej., glucosa), una fuente de nitrógeno (p. ej., aminoácidos y proteínas), agua y sales necesarios para el crecimiento bacteriano. El medio de crecimiento puede estar en forma líquida o frecuentemente mezclado con agar u otro agente gelificante para obtener un medio sólido. El medio de crecimiento puede considerarse también cualquier matriz alimenticia en la que las bacterias puedan crecer en condiciones apropiadas, tales como los ingredientes para preparar yogur.

Las cepas pueden cultivarse solas para formar un cultivo puro. Las cepas también pueden cultivarse como un cultivo mixto con otros microorganismos seleccionados presentes en la masa agria original, o junto con microorganismos no presentes en la masa agria original. Los productos alimenticios de masa agria se refieren a los productos alimenticios preparados a partir de masa agria que contiene al menos las cepas de la invención, en el que dichos productos alimenticios son tolerados por los sujetos celiacos. La cepa de la invención también puede obtenerse cultivando bacterias de diferentes tipos separadamente y después combinándolas en las proporciones deseadas. La fermentación produce una biomasa libre de cualesquiera otros microorganismos sin interés (en contraste claro con las cepas tal y como están presentes en la naturaleza), y puede conseguirse usando cualesquiera nutrientes naturales y/o artificiales adecuados. Después del cultivo, y dependiendo de la formulación final, las cepas pueden utilizarse como bacterias purificadas, o alternativamente, puede usarse el cultivo o la suspensión de células bacterianas, bien como tal o después de un post-tratamiento apropiado. En esta descripción, el término "biomasa" se refiere al cultivo de cepas bacterianas obtenido después del proceso de cultivo (o fermentación como un término sinónimo a cultivo).

Por el término "post-tratamiento" debe entenderse en el contexto de la presente invención, cualquier procesamiento llevado a cabo en la biomasa con el objetivo de obtener células bacterianas que se puedan almacenar. El objetivo del post-tratamiento es disminuir la actividad metabólica de las células en la biomasa, y así, ralentizar la tasa de las reacciones celulares perjudiciales. En otras palabras, poner a las células bacterianas de la invención en un estado artificial quiescente, no proliferativo, en el que las células no experimentan prácticamente una actividad metabólica, no replican su material genético, no se dividen y la tasa de reacciones celulares perjudiciales es casi inexistente. Este estado quiescente inducido artificialmente no se puede producir en la naturaleza. Las únicas vías naturales para que las células procariotas reduzcan su actividad metabólica, cesen la replicación genética, y paren la división celular se dan cuando las células mueren. o si se transforman en endosporas. A diferencia de las vías naturales para conseguir un estado celular quiescente, la fermentación y procesos post-tratamiento inducidos por los seres humanos descritos en la presente memoria ponen a la cepa de la invención en un estado no natural que preserva la viabilidad de las células en una forma de no endospermo. Así, la cepa quiescente depositada de la invención se diferencia de sus equivalentes naturales.

Como resultado del post-tratamiento, las células bacterianas pueden estar en forma sólida o líquida. En forma sólida, las células bacterianas almacenadas pueden ser un polvo o gránulos. En cualquier caso, tanto las formas sólidas como líquidas que contienen las células bacterianas no están presentes en la naturaleza, por lo tanto, no son naturales, ya que son el resultado de proceso(s) de post-tratamiento artificial(es). Los procesos de post-tratamiento pueden requerir, en realizaciones particulares, la utilización de uno o más de los denominados agentes de post-tratamiento. En el contexto de la presente invención, la expresión "agente de post-tratamiento" se refiere a un compuesto utilizado para realizar los procesos de post-tratamiento descritos en la presente memoria. Entre los agentes de post-tratamiento deben incluirse, sin limitación, agentes deshidratantes, agentes bacteriostáticos, agentes crioprotectores (crioprotectores), rellenos inertes (también conocidos como lioprotectores), material vehicular (también conocido como material básico), etc., usados solos o en combinación.

Existen dos estrategias básicas no naturales para disminuir la actividad metabólica de las células bacterianas, y así, dos estrategias para llevar a cabo el post-tratamiento. La primera es disminuir la tasa de todas las reacciones químicas. Esto puede hacerse disminuyendo la temperatura mediante la refrigeración o congelación usando refrigeradores, congeladores mecánicos, y congeladores de nitrógeno líquido. Alternativamente, la disminución de la tasa de todas las reacciones químicas también puede conseguirse añadiendo sustancias que inhiben el crecimiento de las células bacterianas, concretamente un agente bacteriostático, abreviadamente Bstatic, que es un agente biológico o químico que hace que las bacterias paren su reproducción, mientras no las perjudica de otra forma, entre ellos los antibióticos y conservantes bacteriostáticos. Esto contrasta con los bactericidas, que matan a las bacterias. El experto en la técnica sabe qué bacteriostático apropiado usar. Como ejemplo de bacteriostático, y sin limitación, los antibióticos bacteriostáticos que limitan el crecimiento de las bacterias interfiriendo con la producción de proteínas bacterianas, replicación del ADN, u otros aspectos del metabolismo celular bacteriano, en las concentraciones adecuadas para mantener solo su actividad bacteriostática. Un agente bacteriostático también puede entenderse como cualquier agente que se añade para modificar las condiciones ambientales tales como pH,

concentración de sales, o el estado redox.

La segunda estrategia para llevar a cabo el post-tratamiento es eliminar el agua de la biomasa, un proceso que puede implicar la sublimación del agua usando un liofilizador. Las técnicas adecuadas para eliminar el agua de la biomasa son secado, liofilización, secado por pulverización o secado en lecho fluido. Los post-tratamientos que dan como resultado una forma sólida, pueden ser secado, congelación, liofilización, secado en lecho fluido, o secado por pulverización.

El post-tratamiento después del cultivo de las cepas puede consistir en la congelación. En este caso, deben añadirse uno o más agentes crioprotectores. Las expresiones "agente (o aditivo) crioprotector" y "crioprotector" se usan indistintamente en la presente invención, y se refieren a compuestos químicos que protegen a las células durante la congelación mientras minimizan al mismo tiempo los efectos perjudiciales de la concentración incrementada de solutos y la formación de cristales de hielo que causan una caída en el número de células viables y pérdidas consecuentes en la producción industrial. Los agentes crioprotectores usados más comúnmente son dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol, bien solos o en combinación; aunque se han usado ocasionalmente otros crioprotectores, bien solos o en combinación, que incluyen: polietilen glicol, propilen glicol, glicerina, betaína (o glicina betaína), polivinilpirrolidona, sorbitol, dextrano y trehalosa. Los crioprotectores clasificados por familias son: sulfóxidos, alcoholes monohídricos y derivados, dioles y derivados, trioles, polialcoholes, mono, di, tri, polisacáridos, amidas, N-alquilamidas, imidas, compuestos heterocíclicos, aminoácidos y ácidos carbónicos, proteínas, péptidos, polipéptidos, glicoproteínas, y tensioactivos no iónicos. Los protocolos para congelar bacterias y la selección de crioprotectores adecuados están dentro de la elección y conocimiento del experto en la técnica. Básicamente, las bacterias pueden cultivarse o recogerse convenientemente de cultivos inclinados o placas de agar, o de cultivos en caldo y recogidas por centrifugación. En cualquier caso, las células se suspenden generalmente en medio de crecimiento fresco que contiene el o los agentes crioprotectores. Las bacterias también pueden concentrarse por centrifugación, pero frecuentemente se suspenden en el medio usado y después se diluyen añadiendo un volumen igual de medio de crecimiento fresco que contiene el o los agentes crioprotectores. Después, la mezcla de células y el o los crioprotectores se deja que se equilibre durante al menos 15 minutos, pero no más de 45-60 minutos, antes del proceso de enfriamiento. La suspensión se dispensa en viales y se enfría a una velocidad de enfriamiento apropiada.

Cuando el post-tratamiento después del cultivo de las cepas es secado, consiste básicamente en secar en un desecador en vacío sobre agentes deshidratantes tales como H_2SO_4 o P_2O_5, los microorganismos suspendidos en fluido de cultivo o resuspendidos en disolución salina.

El post-tratamiento después del cultivo de las cepas puede consistir en liofilización, como un método para eliminar el agua. La liofilización implica la eliminación del agua de las suspensiones bacterianas congeladas por sublimación bajo presión reducida. Los cultivos liofilizados se mantienen óptimamente a 4^0C o menos. La sublimación se produce cuando un líquido congelado pasa directamente a un estado gaseoso sin entrar en una fase líquida. El proceso de liofilización produce un producto estable que se puede rehidratar fácilmente. Este proceso consiste en tres etapas: precongelado del producto para formar una estructura congelada, secado primario para eliminar la mayor parte del agua, y secado secundario para eliminar el agua unida. Los medios y métodos para liofilizar son conocidos en la técnica y están a disposición del experto en la técnica. Debido a la variabilidad objetiva y esperada de los procesos industriales para la fabricación y aislamiento de los cultivos bacterianos liofilizados, los últimos contienen comúnmente una determinada cantidad de relleno inerte también conocido como lioprotector. Su papel es estandarizar el contenido de las bacterias probióticas vivas en el producto. Se usan los siguientes rellenos inertes en cultivos liofilizados disponibles comercialmente: sucrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, glucosa, maltosa, maltodextrina, almidón de maíz, inulina, y otros rellenos no higroscópicos farmacéuticamente aceptables. Opcionalmente, también se usan otros agentes estabilizantes o protectores frente a la congelación como ácido ascórbico para formar una pasta viscosa, que se somete a liofilización. En cualquier caso, el material así obtenido puede molerse hasta un tamaño apropiado, incluyendo hasta un polvo.

El post-tratamiento después del cultivo de las cepas puede consistir en secado por pulverización. El secado por pulverización es un proceso mediante el cual una formulación líquida se convierte en un polvo seco en una única etapa. El proceso se realiza típicamente atomizando en primer lugar la disolución en gotitas artificialmente finas tan pequeñas como sea posible, maximizando la transferencia de calor y la velocidad de la vaporización del agua. Los tamaños de las gotas pueden variar de 20 a 180 µm dependiendo de la tobera. Existen dos tipos principales de toberas: tobera de único fluido de alta presión (50 a 300 bares) y toberas de dos fluidos: un fluido es el líquido que se va a secar y el segundo es gas comprimido (generalmente aire a 1 a 7 bares). Las gotitas se secan entonces rápidamente en una cámara grande usando gas caliente. Las partículas secas resultantes se recogen con un ciclón.

El post-tratamiento después del cultivo de las cepas puede consistir en secado en lecho fluido. En el proceso de lecho fluidizado, es necesario en primer lugar un material vehicular (también conocido como material básico) como una base para el sustrato que se va a secar. El material vehicular puede ser, sin limitación, celulosa. Este material vehicular se mantiene en el aire para permitir la aplicación del sustrato a través de una tobera pulverizadora. Comparado con el secado por pulverización, las temperaturas son menores. Las bacterias se pulverizan en el material vehicular dispersado en la forma de gotitas finas. El agua contenida desfavorecida por el aire seco fluye de forma ascendente a través del lecho fluidizado. Al mismo tiempo, la corriente de aire es la responsable de la

fluidización de las partículas. Posteriormente, se aplica un recubrimiento protector en la misma materia sobre el vehículo que está recubierto con las bacterias. El recubrimiento protector usado debe prevenir el daño en las células bacterianas mediante la estabilización de los constituyentes de la membrana celular, p. ej., crenado una estructura porosa en el producto secado que hace que la rehidratación sea más fácil y contiene proteínas que proporcionan un recubrimiento protector para las células. El material de recubrimiento protector puede ser, sin limitación, leche desnatada y alginato de calcio. La estructura de un producto encapsulado conseguido por recubrimiento de lecho fluidizado consiste en al menos tres partes: en el interior el material vehicular o básico (esférico), capa de recubrimiento protectora uniforme, en el exterior, y entre ellos el ingrediente activo de interés recubierto, concretamente, las bacterias. Algunas veces, se requieren múltiples capas de diferentes materiales de recubrimiento para obtener las propiedades deseadas del producto. El tamaño de las microcápsulas resultantes varía entre 200 µm y 2 mm.

Alternativamente a tener la biomasa conservada en forma sólida, la biomasa también puede conservarse en forma líquida. Esto puede hacerse añadiendo un agente bacteriostático como se ha descrito anteriormente, para parar el crecimiento bacteriano, al medio de cultivo o con una etapa intermedia de recogida de las células, resuspensión del sedimento en disolución salina con un agente bacteriostático, y opcionalmente, refrigeración.

Algunas veces, como se ha descrito, por ejemplo, anteriormente en el proceso de secado en lecho fluido, la preparación probiótica se somete a un proceso de inmovilización y/o recubrimiento, o encapsulación, con el fin de mejorar la vida útil y/o funcionalidades. En la técnica se conocen varias técnicas para la inmovilización, recubrimiento o encapsulación de bacterias.

En una realización particular de la invención, la composición comprende al menos una cepa aislada del primer aspecto de la invención, por lo tanto, incluyendo la cepa CECT 8590 y mutantes de esta, fermentada en un medio artificial y sometida a un post-tratamiento después de la fermentación, para obtener células bacterianas, y en el que las células bacterianas resultantes están en un medio líquido o en una forma sólida. En una realización particular de la presente invención, el post-tratamiento se selecciona del grupo que consiste en: secado, congelación, liofilización, secado en lecho fluido, secado por pulverización y refrigeración en medio líquido. En una realización particular, el post-tratamiento es liofilización.

En una realización particular, la cepa se ha modificado genéticamente.

Un aspecto adicional de la invención es el uso del microorganismo objeto de la presente invención en la degradación de la gliadina y los péptidos inmunotóxicos responsables de desencadenar la enfermedad celiaca y trastornos asociados con la ingesta de gluten, y preferiblemente del péptido inmunotóxico de 33 aminoácidos (33-mer).

Según las características beneficiosas descritas anteriormente de la cepa CECT 8590, otro aspecto de la invención se refiere a cualquiera de las composiciones como se ha definido anteriormente para uso en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca y trastornos asociados con la ingesta de gluten. Este aspecto puede formularse alternativamente como el uso de cualquiera de las composiciones de la invención para la fabricación de un producto farmacéutico, un producto veterinario, un medicamento, un alimento médico, un producto alimenticio o un suplemento alimenticio, con la condición de que se toleren por los sujetos celiacos, para la prevención y/o tratamiento de una afección relacionada con alteraciones de la microbiota urogenital. Esto también puede formularse alternativamente como un método para la prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca y trastornos asociados con la ingesta de gluten, que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones de la invención. En una realización particular, los trastornos asociados con la ingesta de gluten son todas las enfermedades desencadenadas por el gluten; los trastornos asociados con la ingesta de gluten o trastornos relacionados con el gluten incluyen la enfermedad celiaca y la sensibilidad al gluten no celiaca (NCGS). Con anterioridad, la intolerancia al gluten también se ha usado como un término paraguas, y la expresión sensibilidad al gluten se ha usado bien como término paraguas o para NCGS. Los síntomas incluyen distensión abdominal, malestar o dolor abdominal, diarrea, estreñimiento, alteraciones musculares, dolores de cabeza, migrañas, acné severo, fatiga, y dolor óseo o articular.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un producto farmacéutico, un producto veterinario, un alimento médico, un producto alimenticio o un suplemento alimenticio, tolerado por un sujeto celiaco, que comprende una cantidad efectiva de cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria junto con las cantidades apropiadas de excipientes aceptables.

En el contexto de la presente invención, todos los productos, composiciones y alimentos reivindicados son tolerados por los celiacos. Las expresiones "tolerado por un sujeto celiaco", "libre de gluten" y "adecuado para sujetos celiacos" tienen el mismo significado y se usan indistintamente en la presente invención.

Un aspecto adicional de la presente invención el uso del microorganismo objeto de la presente invención en la fabricación de una composición alimenticia probiótica, un suplemento dietético, una composición simbiótica o una composición bioterapéutica, todos los cuales proporcionan un efecto beneficioso en la reducción de riesgos y la mejora del estado de salud de pacientes respecto a la ingesta de gluten.

Se entiende por “composición alimenticia probiótica” cualquier combinación de ingredientes, composición que es

constitutiva de un producto alimenticio sólido o líquido libre de gluten, que además de sus características nutricionales, incluye características específicas que ayudan a mejorar la salud y a reducir el riesgo de contraer la enfermedad.

Se entiende por “suplemento alimenticio” a un suplemento nutricional adicional destinado a complementar la dieta.

Se entiende por “composición bioterapéutica” un producto compuesto por una preparación microbiana con un efecto beneficioso sobre la salud o efecto terapéutico.

Se entiende por “composición simbiótica” el alimento funcional que contienen una mezcla de productos alimenticios prebióticos y probióticos.

Las características del microorganismo de la invención también permiten su utilización como coadyuvante tecnológico en la preparación de alimentos con contenido en gluten reducido. Se entiende por coadyuvante tecnológico toda sustancia que no se consuma como alimento en sí misma, si no que se utilice intencionadamente en el procesamiento de materias primas, alimentos o sus ingredientes para cumplir un determinado propósito tecnológico durante el tratamiento o procesamiento, y pueda dar lugar a la presencia inintencionada, pero técnicamente inevitable, en el producto final de residuos del propio coadyuvante tecnológico o de sus derivados, con la condición de que no presenten ningún riesgo para la salud y que no tengan ningún efecto tecnológico en el producto final.

Un aspecto adicional de la invención es el uso del microorganismo objeto de la presente invención como coadyuvante tecnológico que favorece la degradación de gliadina y de los péptidos inmunotóxicos que son responsables del desencadenamiento de la enfermedad celíaca y de los trastornos asociados con la ingesta del gluten.

Otro objeto de la invención es una composición alimenticia probiótica, un suplemento alimenticio, una composición simbiótica o una composición bioterapéutica que comprende el microorganismo objeto de la presente invención. La composición alimenticia probiótica, suplemento dietético, la composición simbiótica o la composición bioterapéutica pueden tomar la forma de cápsulas, estar liofilizados, en forma líquida, en pastillas o como geles.

La resistencia de la cepa probiótica de la invención a condiciones de extrema acidez, la hacen especialmente adecuada para ser empleada en condiciones de pH ácido, particularmente en productos lácteos.

Un objeto adicional de la invención es el uso de del microorganismo objeto de la presente invención en la preparación de una composición farmacéutica útil para el tratamiento de la enfermedad celíaca y de los trastornos asociados con la ingesta del gluten.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende el microorganismo objeto de la presente invención, de aquí en adelante composición farmacéutica de la invención.

De acuerdo con esto, la composición de la invención puede prepararse en cualquier forma adecuada que no afecte negativamente la viabilidad de la cepa que forma la composición de la invención. La selección de los excipientes y los métodos más apropiados para la formulación a la vista del propósito particular de la composición está dentro del alcance de los expertos en la técnica de la tecnología farmacéutica. La composición puede administrarse por vía oral y/o rectal.

En este sentido, la composición de la invención está en forma sólida o líquida y puede estar, entre otras, en la forma de polvos, comprimidos o pastillas, comprimidos para chupar, preparaciones en película, disoluciones, aerosoles, gránulos, píldoras, suspensiones, emulsiones, cápsulas, comprimidos y cápsulas con recubrimiento entérico, jarabes, líquidos, elixires, caramelos, chicle, supositorios, microenemas.

La composición según la invención puede formularse en una forma en la que la cepa de la invención es el único agente activo. Alternativamente, la composición según la invención puede formularse mezclada con uno o más de otros agentes activos. Alternativamente, las cepas de la invención bien solas o formuladas mezcladas con uno o más de otros agentes activos, también pueden formularse con excipientes farmacéuticamente o veterinariamente aceptables o aditivos o ingredientes adecuados en el caso de un producto alimenticio. En una realización particular de la invención, la composición contiene adicionalmente uno o más agentes activos adicionales. Alternativamente, el o los agentes activos adicionales son otras bacterias probióticas que no son antagonistas de la cepa que forma la composición de la invención.

En una realización particular, la composición comprende más de un agente activo, los agentes activos pueden formularse en una única forma farmacéutica, veterinaria, de suplemento alimenticio o alimento médico, tolerada por sujetos celiacos, o en formas separadas que se administran secuencial o consecutivamente en cualquier orden, en el que la forma que comprende al menos una de las cepas de la presente invención, se administra antes de, sustancialmente simultáneamente con, después de o entre la administración del o de los otros agentes activos.

Adicionalmente, la administración puede ser crónica o intermitente, según considere apropiado el médico responsable, particularmente a la vista de cualquier cambio en el estado de la enfermedad o cualesquiera efectos

secundarios indeseables. La administración "crónica" se refiere a la administración de la composición de una manera continua mientras la administración "intermitente" se refiere al tratamiento que se hace con interrupción.

La cantidad efectiva de unidades formadoras de colonias (ufc) para las cepas en la composición será determinada por el experto en la técnica y dependerá de la formulación final. Por ejemplo, cuando se administra por vía oral sin ningún otro agente activo, la cantidad total de las cepas de la invención está presente en la composición en una única dosis en una cantidad que proporciona una dosis diaria efectiva de 10^7 a 10^{12} ufc, según la legislación actual, preferiblemente de 10^9 a 10^{11} ufc y, cuando se administra por vía vaginal o rectal, en una cantidad que proporciona una dosis diaria efectiva de 10^3 a 10^{12} ufc, preferiblemente de 10^5 a 10^{10} ufc. El término "unidad formadora de colonias" ("ufc") se define como el número de células bacterianas según se revela por recuentos microbiológicos en placas de agar. Los suplementos alimenticios tolerados por los sujetos celiacos contienen habitualmente cepas probióticas en una cantidad que varía de 10^7 y 10^{12} ufc/g. En una realización particular, la composición de la invención es un suplemento alimenticio libre de gluten para dosis diarias que comprenden entre 10^9-10^{11} ufc/g.

El término "producto farmacéutico" se entiende en su significado amplio en esta descripción, incluyendo cualquier composición que comprende un ingrediente activo, en este caso, las cepas de la invención preferiblemente en la forma de composición, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "producto farmacéutico" no está limitado a medicamentos. El término "farmacéuticamente aceptable", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, en el alcance del criterio médico razonable, adecuados para uso en contacto con los tejidos de un sujeto (p. ej., un ser humano) sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas, u otro problema o complicación, proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable y adecuados adicionalmente para celiacos. Cada vehículo, excipiente, etc. también debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación. Los vehículos, excipientes, etc. pueden encontrarse en los textos farmacéuticos estándar.

El término "excipiente" se entiende en su significado amplio en esta descripción, incluyendo cualquier sustancia natural o sintética formulada junto con el ingrediente activo de un producto farmacéutico, producto veterinario, un medicamento, suplemento alimenticio y alimento médico, todos ellos tolerados por los sujetos celiacos. El o los excipientes más apropiados para usarse dependen de la formulación final.

Los excipientes se seleccionan, sin limitación, del grupo que comprende: rellenos/diluyentes/agentes de volumen, aglutinantes, antiadherentes, disgregantes, recubrimientos, agentes antiapelmazamiento, antioxidantes, lubricantes, edulcorantes, saporíferos, colorantes, tensioactivos y otras clases de excipientes farmacéuticamente y veterinariamente aceptables adecuados para celiacos.

Los rellenos se seleccionan, sin limitación, del grupo que comprende: inulina, oligofructosa, pectina, pectinas modificadas, celulosa microcristalina, lactosa, almidón, maltodextrina, sacarosa, glucosa, fructosa, manitol, xilitol, sorbitol que no cristaliza, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio, otros rellenos inertes inorgánicos y orgánicos farmacológicamente aceptables, y mezclas de estas sustancias. En la forma de dosificación de la suspensión oral, los rellenos o diluyentes se seleccionan del grupo que comprende: aceite vegetal, ácido oleico, oleil alcohol, polietilen glicol líquido, otros líquidos inertes farmacológicamente aceptables, o mezclas de estas sustancias.

Los aglutinantes se usan en las formas de dosificación sólidas, p. ej., para mantener a los ingredientes en un comprimido conjuntamente, para asegurar que los comprimidos y gránulos pueden formarse con la resistencia mecánica requerida, y para proporcionar volumen a los comprimidos con baja dosis activa. Los aglutinantes en las formas de dosificación sólidas como comprimidos son: lactosa, sacarosa, almidón de maíz (maíz), almidones modificados, celulosa microcristalina, celulosa modificada (por ejemplo, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC) e hidroxietilcelulosa), otros éteres de celulosa solubles en agua, polivinilpirrolidona (PVP) también conocida como povidona, polietilen glicol, sorbitol, maltitol, xilitol y fosfato de calcio dibásico; otros aglutinantes farmacológicamente aceptables adecuados, o mezclas de estas sustancias.

Los antiadherentes se usan para reducir la adhesión entre el polvo (gránulos) y las caras perforadas y así prevenir la adherencia a los punzones de comprimidos. También se usan para ayudar a proteger a los comprimidos de la adherencia. El usado más comúnmente es el estearato de magnesio.

Como disgregantes y superdisgregantes en las formas de dosificación sólidas como comprimidos y cápsulas, se usan las siguientes sustancias, sin limitación: polivinilpirrolidona entrecruzada, glicolato sódico de almidón, carboximetil celulosa de sodio, carboximetil celulosa de calcio, y formaldehído-caseína, otro disgregante y superdisgregante farmacológicamente aceptable adecuado, o sus mezclas.

Los recubrimientos en el caso de las formas de dosificación sólidas, tales como comprimidos y gránulos para el relleno de cápsulas, protegen a los ingredientes frente al deterioro por humedad en el aire, hacen que los comprimidos grandes con sabor desagradable sean más fáciles de tragar y/o en el caso de los recubrimientos entéricos aseguran el paso intacto a través de un medio ácido fuerte del jugo gástrico (pH de alrededor de 1), y lo que permite la liberación en el duodeno o el íleo (intestino delgado). Para la mayor parte de los comprimidos recubiertos, se usa un recubrimiento con película de éter de celulosa hidroxipropil metilcelulosa (HPMC). Ocasionalmente, se usan otros materiales de recubrimiento, por ejemplo, polímeros y copolímeros sintéticos como polivinilacetato ftalato (PVAP); copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico; copolímeros de metacrilato de

metilo-ácido metacrílico; goma laca, proteína de maíz zeína u otros polisacáridos, ceras o sustancias semejantes a ceras tales como cera de abejas, ácido esteárico, alcoholes grasos superiores como cetil o estearil alcohol, parafina sólida, monoestearato de glicerol, diestearato de glicerol, o sus combinaciones. Las cápsulas se recubren con gelatina o hidroxipropil metilcelulosa.

Los recubrimientos entéricos controlan la velocidad de la liberación del fármaco y determinan dónde se liberará el fármaco en el tracto digestivo. Los materiales usados para los recubrimientos entéricos incluyen ácidos grasos, ceras, goma laca, plásticos, y fibras de plantas y sus mezclas, también en combinación con otros recubrimientos mencionados anteriormente.

Un agente antiapelmazamiento es un aditivo que se añade en materiales en polvo o granulados para prevenir la formación de grumos (apelmazamiento) y para facilitar el envasado, transporte, y consumo. Como agentes antiapelmazamiento en las formas de dosificación sólidas como comprimidos, cápsulas, o polvos, se usan los siguientes: estearato de magnesio, dióxido de silicio coloidal, talco, otros agentes antiapelmazamiento farmacológicamente aceptables, o sus mezclas.

Los lubricantes se usan en las formas de dosificación sólidas, en particular, en comprimidos y cápsulas, para prevenir que los ingredientes se aglutinen entre sí y se adhieran a los punzones de los comprimidos o máquina de llenado de cápsulas, y también en cápsulas duras. Como lubricantes, el talco o la sílice, y las grasas, p. ej., estearina vegetal, estearato de magnesio o ácido esteárico, y mezclas de estos, son los lubricantes usados más frecuentemente en comprimidos o cápsulas de gelatina duras.

Los edulcorantes se añaden para hacer que los ingredientes sean más sabrosos, especialmente en las formas de dosificación sólidas, p. ej., comprimidos masticables, así como en las formas de dosificación líquidas, como jarabe para la tos. Los edulcorantes pueden seleccionarse de edulcorantes artificiales, naturales o sintéticos o semisintéticos; los ejemplos no limitativos de edulcorantes son aspartamo, acesulfamo de potasio, ciclamato, sucralosa, sacarina, azúcares o cualquier mezcla de estos.

Los sabores pueden usarse para enmascarar a los ingredientes activos con sabor desagradable en cualquier forma de dosificación. Los saborizantes pueden ser naturales (p. ej., extracto de fruta) o artificiales. Por ejemplo, para mejorar: (1) un producto amargo, pueden usarse menta, cereza o anís; (2) un producto salado, pueden usarse melocotón o albaricoque o regaliz; (3) un producto agrio, frambuesa; y (4) un producto excesivamente dulce, vainilla.

Excepto las sustancias auxiliares de la clase de los excipientes, la formulación de la presente invención puede contener otras sustancias farmacológicamente activas o nutritivas seleccionadas del grupo que comprende: minerales en la forma de forma química farmacéuticamente y nutritiva aceptable; y L-aminoácidos.

Respecto a la preparación de las formulaciones de la presente invención está dentro del alcance del experto en la técnica y dependerá de la formulación de la dosificación final. Por ejemplo, y sin limitación, cuando la forma de dosificación final es una sólida oral, tal como comprimidos, cápsulas, polvo, gránulos, suspensión oral, etc., el proceso para la preparación de las formas de dosificación sólidas de la formulación incluye la homogeneización de: (1) el o los ingredientes activos, que comprenden al menos una o más bacterias probióticas sometidas a post-tratamiento de la invención en una cantidad efectiva; (2) con uno o más excipientes para formar una mezcla homogénea que, p. ej., según los requerimientos, se somete a lubricación con estearato de magnesio u otros lubricantes dando lugar a una forma de dosificación final de polvo. Dicho polvo homogéneo se utiliza para rellenar cápsulas de gelatina ordinarias o, alternativamente, cápsulas gastro-resistentes. En el caso de los comprimidos, se fabrican por compresión directa o granulación. En el primer caso, se prepara una mezcla homogénea de los ingredientes activos y excipientes adecuados tales como lactosa anhidra, sorbitol que no cristaliza, y otros. En el segundo caso, los comprimidos se procesan en la mezcla en forma granulada. Los gránulos se preparan por un proceso de granulación de los ingredientes activos de la formulación con rellenos, aglutinantes, disgregantes adecuados, y una pequeña cantidad de agua purificada. Dichos gránulos preparados se tamizan y se secan hasta que el contenido de agua es <1 % p/p.

Respecto al proceso para la preparación de las formas de dosificación líquidas (p. ej., suspensión oral), implica la homogeneización del o de los ingredientes activos de la formulación que comprenden al menos una o más bacterias probióticas sometidas a post-tratamiento de la invención en una cantidad efectiva en un diluyente (relleno) líquido inerte tal como varios aceites vegetales como aceite de girasol, de soja o de oliva; ácido oleico; oleil alcohol; polietilen glicoles líquidos como PEG 200, PEG 400 o PEG 600; u otros líquidos inertes farmacológicamente aceptables. El proceso implica además el tratamiento de la mezcla homogénea con uno o más procesos seleccionados del grupo que comprende: (1) estabilización de la formulación, mediante la adición y homogeneización de estabilizadores de la suspensión como cera de abejas, dióxido de silicio coloidal, etc.; (2) endulzamiento de la formulación; mediante la adición y homogeneización de edulcorante; (3) saborización de la formulación, mediante la adición y homogeneización de saborizante. Dichas formas de la formulación también pueden contener otros excipientes o ingredientes, empleados habitualmente en la técnica.

El producto farmacéutico puede adoptar diferentes formas o nombres dependiendo de la vía de aprobación del producto y también dependiendo del país. Por ejemplo, un medicamento es un producto farmacéutico particular. Un alimento médico es otro producto farmacéutico particular, en el que el alimento médico carece de gluten. Los

términos "alimento médico" o "alimento para propósitos médicos especiales" se usan en algunos países para hacer referencia a un alimento formulado especialmente y pretendido para la gestión dietética de una enfermedad que tiene necesidades nutricionales distintivas que no pueden conseguirse solo con una dieta normal. Se definen en regulaciones tales como 1988 Orphan Drug Act Amendments de la Administración de Alimentos y Medicamentos en los Estados Unidos, y la Directiva de la Comisión 1999/21/EC en Europa. Los alimentos médicos son distintos de la categoría más amplia de suplementos alimenticios y de los alimentos tradicionales que presentan una reivindicación sanitaria. Así, en una realización particular, la composición de la invención es un alimento médico.

Frecuentemente, las composiciones bacterianas probióticas tales como la descrita en la presente memoria, se consideran como suplementos alimenticios adecuados para celiacos. Un suplemento alimenticio adecuado para celiacos, también conocido como suplemento dietético o suplemento nutricional, se considera otro producto farmacéutico particular. Este es una preparación o producto pretendido para suplementar la dieta, preparado a partir de compuestos usados habitualmente en los productos alimenticios, que proporciona nutrientes o ingredientes beneficiosos que no se ingieren habitualmente en la dieta normal o que pueden no consumirse en cantidades suficientes. La mayor parte de las veces, dichos suplementos alimenticios se consideran como productos alimenticios, pero algunas veces se definen como fármacos, productos sanitarios naturales, o productos nutracéuticos. En el sentido de la presente invención, los suplementos alimenticios también incluyen los nutracéuticos. Los suplementos alimenticios se venden habitualmente "sin receta", es decir, sin prescripción médica. Si el suplemento alimenticio adopta la forma de una píldora, una cápsula, un comprimido o un polvo, comprende excipientes que son los mismos que los usados en los medicamentos. Un suplemento alimenticio, sin embargo, puede adoptar también la forma de un producto alimenticio que está fortificado con algunos nutrientes (p. ej., una barrita o yogur). Así, en una realización particular, la composición de la invención es un suplemento alimenticio, que debe carecer de gluten.

Si la composición según la invención es un suplemento alimenticio adecuado para celiacos, puede administrarse como tal, puede mezclarse con un líquido libre de gluten bebible adecuado, tal como agua, yogur, leche o zumo de frutas, o puede mezclarse con alimentos sólidos o líquidos. En este contexto, el suplemento alimenticio puede estar en la forma de comprimidos o pastillas, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, suspensiones, sobres, caramelos, barritas, jarabes y formas de administración correspondientes, habitualmente en la forma de una dosis unitaria. Preferiblemente, el suplemento alimenticio libre de gluten que comprende la composición de la invención se administra en la forma de comprimidos, pastillas, cápsulas o polvos, fabricados en procesos convencionales para preparar suplementos dietéticos.

Las cepas de la invención también pueden incluirse en una variedad de productos alimenticios libres de gluten, tales como productos lácteos (un yogur, un queso, una leche fermentada, una leche en polvo, un producto fermentado basado en leche, un helado, un producto basado en cereal fermentado, un polvo basado en leche), pan, barritas, productos untables, galletas y cereales, una bebida, diferentes tipos de aceite, o un aliño. El término "producto alimenticio" se usa en la presente memoria en su significado más amplio, incluyendo cualquier tipo de producto, en cualquier forma de presentación, que puede ser ingerido por un animal, pero excluyendo los productos farmacéuticos y veterinarios. Los ejemplos de otros productos alimenticios son productos cárnicos (p. ej., salchichas o productos cárnicos untables), productos de chocolate untables, rellenos y glaseados, chocolate, pastelería, productos horneados (bollos, hojaldres), salsas y sopas, zumos de frutas y blanqueadores de café. Los productos alimenticios particularmente interesantes son los suplementos alimenticios y las fórmulas para bebés, con la condición de que sean tolerados por los sujetos celiacos. El producto alimenticio libre de gluten comprende preferiblemente un material vehicular tal como gachas de harina de avena, alimentos fermentados con ácido láctico, almidón resistente, fibras dietéticas, carbohidratos, proteínas y proteínas glicosiladas. En una realización particular, las cepas de la invención están encapsuladas o recubiertas. Por lo tanto, en una realización particular, la composición de la invención es un producto alimenticio libre de gluten. En particular, las cepas de la invención también pueden estar en la forma de masa agria que es una masa que contiene un cultivo de *Lactobacillus* incluyendo *L. casei* CECT 8590 en combinación simbiótica con levaduras. Así, una realización particular de la invención es un medio o un producto fermentado por la composición que comprende la cepa.

La composición farmacéutica de la invención se administra preferentemente por vía oral, en forma sólida o líquida. Los ejemplos ilustrativos de formas farmacéuticas para la administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, disoluciones, suspensiones, etc., y pueden contener los excipientes convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, disgregantes, lubrificantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales. En cualquier caso, los excipientes se eligen en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de su preparación puede encontrarse en el libro “Tratado de Farmacia Galénica”, de C. Faulí i Trillo, 10 Edición, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, o en cualquier libro de similares características que exista en cada país.

En el ámbito de la presente invención también se incluyen aquellos métodos de tratamiento de la enfermedad celíaca y de los trastornos asociados a la ingesta del gluten, que consisten en la administración del microorganismo objeto de la presente invención o de la composición farmacéutica de la invención, tanto solos como combinados con otros fármacos o técnicas médicas.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variaciones no pretenden excluir

otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Para los expertos en la técnica, otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes después del examen de la descripción o pueden aprenderse por la práctica de la invención. Además, la presente invención abarca todas las combinaciones posibles de realizaciones particulares y preferidas descritas en la presente memoria. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan en la presente memoria para propósitos ilustrativos, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

FIG. 1.- Actividades enzimáticas PepX, PepI, PepQ y PepN de la cepa *L. casei* CECT 8590.

FIG. 2.– Cromatograma obtenido cuando el péptido de 33-mer se incubó con *L. casei* CECT 8590 durante 0 h (línea superior) o 12 h (línea media). Obsérvese que el péptido desapareció completamente después de 12 h de incubación con la cepa. Se usó una reacción que contenía la cepa sola para evaluar la aparición de péptidos derivados de su metabolismo normal (línea inferior). La sección del cromatograma que contiene el pico correspondiente al péptido de 33-mer se muestra agrandada en el recuadro.

FIG. 3.- Supervivencia a las condiciones gastrointestinales simuladas in vitro de la cepa *L. casei* CECT 8590. "CS" significa supervivencia celular. La cepa *L. casei* CECT 8590 fue resuspendida en leche y sometida a las condiciones gastrointestinales in vitro para determinar la supervivencia celular. Para simular el estrés gástrico (G) se incubó con lisozima y pepsina en valores de pH decrecientes. Para simular el estrés gastrointestinal (GI) las muestras provenientes de los pH 5, 4,1 y 3 fueron incubadas con sales biliares y enzimas pancreáticas durante 20 (GIa) y 120 (GIb) minutos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se usan para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la invención.

Ejemplo 1. Aislamiento y selección de la cepa objeto de la presente invención

La cepa de la invención, *Lactobacillus casei* CECT 8590, ha sido aislada a partir de una masa agria utilizada para la elaboración de pan, proveniente de Polonia. Se recogieron diez gramos de muestra y se homogeneizaron durante 5 min en 90 ml de disolución salina de Ringer (Merck, Darmstadt, Alemania) usando un Mezclador de Laboratorio Stomacher 400 (Seward Ltd., Londres, Reino Unido). Una vez homogeneizada, se realizaron diluciones seriadas en disolución salina de Ringer y se sembraron en placas 50 µl en un medio químicamente definido que contenía gliadina como única fuente de nitrógeno (AHG-M), y se incubaron en (paralelo en) tres condiciones diferentes: en aerobiosis a 30ºC, en aerobiosis a 37ºC y en anaerobiosis a 37ºC (en una estación de trabajo anaeróbica MAC 500 (Don Whitley Scientific, West Yorkshire, Reino Unido)). El medio de cultivo se suplementó con cicloheximida (50 µg ml^{-1}) para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. Tan solo 27 cepas fueron capaces de crecer en este medio. De estas, solo 8 fueron capaces de formar un halo alrededor de la colonia indicando la degradación de gliadina en el medio AHG-M, y atendiendo a sus características y al perfil determinado mediante PFGE una de ellas fue la cepa objeto de la presente invención, *Lactobacillus casei* CECT 8590.

Ejemplo 2. Actividades peptidasa con sustratos sintéticos

La capacidad de la cepa para hidrolizar las proteínas y péptidos derivados del gluten se ha llevado a cabo mediante la cuantificación de la actividad de peptidasas intracelulares de amplio espectro y específicas para hidrolizar secuencias peptídicas que contienen prolina, presentes en los péptidos responsables de las respuestas inmunológicas y tóxicas del gluten. Para la preparación de los extractos celulares se usaron 20 ml de un cultivo bacteriano de 20-22 horas crecido en MRS. Se recogieron mediante centrifugación (8.000 g durante 10 min), se lavaron dos veces y se resuspendieron en 2 ml del tampón correspondiente a la actividad enzimática que se fuera a ensayar. A continuación, las muestras se rompieron usando una Prensa de French a 2,3 kba (Constant Cell Disruption Systems [Low March, Daventry, Northents, Reino Unido]). Los restos celulares fueron eliminados mediante centrifugación a 10.000 g a 4ºC durante 30 min y los extractos libres de células fueron ensayados inmediatamente.

Las actividades peptidasas se caracterizaron usando sustratos cromogénicos específicos (Bachem, Bubendorf, Suiza). PepN, PepI y PepX se determinaron usando Leu-*p*-nitroanilida (Leu-*p*-NA), Pro-*p*-NA y Gly-Pro-*p*-NA respectivamente. La mezcla de reacción contenía 825 µl de tampón fosfato 10 mM (pH 7,5), 75 µl del sustrato adecuado (1,2 mM) y 150 µl del extracto celular. Tras 1 hora de incubación a 37ºC, se detuvo la reacción añadiendo 500 µl de ácido tricloroacético al 20%. La liberación de p-NA se midió espectofotométricamente a 410 nm (U-2800 Digilab, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japón). PepQ se determinó según el método de la ninhidrina (Yaron y Mlynar, 1968) usando Val-Pro como un sustrato. La mezcla de reacción contenía 100 µl del extracto celular en 162,5 µl de tampón citrato (citrato de sodio [20mM] y sulfato de zinc [2,5 mM]) pH 6,5, y 37,5 µl del substrato (1,2 mM). Se incubó durante 30 min a 40ºC. Para detener la reacción se añadieron 350 µl de ácido acético glacial y para formar el color 350 µl de la mezcla de reacción [ninhidrina [3% p/v], ácido fosfórico (60% v/v) y ácido acético glacial (40% v/v)]. Se incubó durante 10 min a 90ºC. El color se midió espectofotométricamente a 515 nm. Los ensayos

enzimáticos fueron realizados en triplicado y expresados como miliunidades por mg de proteína, definiendo una unidad (U) como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de p-NA, o 1 pmol de aminoácido en el caso de PepQ, por minuto bajo las condiciones ensayadas. La proteína total en cada una de las muestras se determinó utilizando el kit Pierce BCA "Ensayo de proteínas" (Pierce, Rockford, EEUU). Los resultados se presentan en la FIG.1.

Ejemplo 3.- Degradación del péptido inmunotóxico de 33 aminoácidos

La capacidad de la cepa para degradar el péptido inmunotóxico de 33 aminoácidos (33-mer) responsable del desencadenamiento de la enfermedad celíaca (Shan et al. 2002. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science 297:2275-2279) se cuantificó mediante análisis por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC). El péptido de 33-mer se sintetizó químicamente con una pureza del 95% (Immunosteps S.L., Salamanca, España) y se disolvió en tampón PBS, pH 7,4 (10 mM). Se creció el cultivo celular en caldo MRS a 37ºC hasta alcanzar la fase estacionaria. Se recogieron las células por centrifugación (8.000 g durante 10 min), se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4) y se resuspendieron en 1 ml del mismo tampón. La suspensión celular (DO_{600}= 35) se incubó con el péptido (50 µM=195 ppm) a 37ºC y se tomaron muestras (200 µl) para inyectar en el HPLC (50 µl) a 0, 8 y 12 horas. Las muestras fueron inactivadas por calor y se almacenaron a -20ºC hasta el momento de su análisis. Previamente a la inyección, las muestras se filtraron utilizando filtros de membrana de 0,2 µM HT Tuffryn®. La concentración del sustrato, así como los productos intermedios, se analizaron mediante RP-HPLC (según Shan et al., 2002). El sistema de HPLC consiste en un módulo de separación Alliance 2795, PDA con un detector de fotodiodo 2996, y un software de adquisición de datos Empower (Waters, Milford, MA). Se usó una columna XTerra MS C18 5 µm, columna de 4,6 x 150 mm con una pre-columna Nova-Pak C18 4µm, 3,9 x 20 mm (Waters), con un termostato a 30 ºC. Las fases de elución consistieron en (A) agua con 0,1% (v/v) TFA (ácido trifluoroacético) y (B) acetonitrilo con 0,1% (v/v) TFA. El programa de gradiente comenzó con un 100% del disolvente A y 0% del disolvente B y fue cambiando linealmente hasta alcanzar un 62,6% del disolvente A y 37,4% del disolvente B en 34 minutos La columna se lavó con 100% del disolvente B durante 5 minutos, y se equilibró hasta las condiciones iniciales durante 10 min. La absorbancia UV se recogió a 215 nm y a 280 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la FIG. 2. *L. casei* CECT 8590 degradó el péptido hasta un 82 % en 8 h, y lo degradó completamente en 12 h (Fig. 2). De forma interesante, no se observaron productos intermedios de la hidrólisis cuando este último cromatograma se comparó con el de una incubación paralela que solamente contenía la cepa (es decir, sin sustrato).

Ejemplo 4. Evaluación de la resistencia a condiciones de estrés gastrointestinal

Se evaluó la resistencia de la cepa objeto de la invención a las condiciones ácidas de los jugos gástricos, que constituyen la primera barrera que limita la viabilidad de los microorganismos tras su ingestión, así como a la acción de las sales biliares y a las enzimas pancreáticas. Se prepararon suspensiones celulares de la cepa CECT 8590 (10^8 ufc ml^{-1}) en leche. Para ello se crecieron los cultivos celulares en 30 ml de MRS. Se recuperaron las células mediante centrifugación (15 min 3.000 g), se lavaron dos veces con NaCl al 0,85% (p/v) y se resuspendieron en un volumen de leche desnatada en polvo al 10 % (Oxoid). A continuación, estas suspensiones celulares se sometieron a las condiciones simuladas *in vitro* del tracto gastrointestinal (TGI). Para comenzar se añadió 0,1 % (p/v) de lisozima imitando la saliva humana. El estrés gástrico (G) se simuló añadiendo pepsina (Sigma) al 0,3 % (p/v) y disminuyendo el pH cada 20 minutos (pH 5, pH 4,1, pH 3, pH 2,1 y pH 1,8). El estrés gastrointestinal (GI) se ensayó tras el estrés G en las muestras provenientes de los pH 5, 4,1 y 3. Para simular la digestión del intestino delgado, se añadieron sales biliares (0,3 % p/v), una mezcla de enzimas pancreáticas (1 mg ml^{-1} de amilasa, 1 mg ml^{-1} de tripsina y 1 mg ml^{-1} de quimiotripsina) a una concentración final de 5 mg ml^{-1} y se subió el pH a 6,5. Se recogieron muestras tras 20 y 120 minutos de incubación en las condiciones GI. Se recogió una muestra en cada condición y se realizaron diluciones seriadas en una disolución salina de NaCl al 0,85% (p/v). Las muestras se sembraron en placas en MRS con 2% de agar y se realizó el recuento de viables tras incubar durante 48 h a 37ºC. Los resultados obtenidos se presentan en la FIG. 3.

Referencias bibliográficas

Book et al., 2003. Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families. Am J. Gastroenterol. 93; 377-81;

Gujral et al., 2012. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. World J Gastroenterol. 14; 18(42): 6036-6059.

Adams y Marteau. 1995. On the safety of lactic acid bacteria from food. Int J Food Microbiol. 27, 263-264.

Wieser 2007. Chemistry of gluten proteins. Food microbiol. 24; 115-119.

Listado de secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

<120> NUEVA CEPA DE *Lactobacillus casei* CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR EL PÉPTIDO INMUNOTÓXICO DEL GLUTEN

<130> PD10109PC00

<150> ES201430768

<151> 23-05-2014

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 1

```
Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1               5                   10                  15

Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Phe
            20                  25                  30
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad efectiva de la cepa aislada de *Lactobacillus casei* depositada en la Spanish Type Culture Collection (CECT) con el número de acceso CECT 8590.

2. La composición según la reivindicación 1, en la que la cepa aislada se ha fermentado en un medio artificial y se ha sometido a un post-tratamiento después de la fermentación, para obtener células bacterianas, y en la que las células bacterianas resultantes están en un medio líquido o en una forma sólida.

3. La composición según la reivindicación 2, en la que el post-tratamiento se selecciona del grupo que consiste en: secado, congelación, liofilización, secado en lecho fluido, secado por pulverización y refrigeración en medio líquido.

4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la cepa se ha modificado genéticamente.

5. La composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso como un medicamento o como un probiótico.

6. Una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad celiaca y de los trastornos asociados con la ingesta de gluten.

7. Una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso como coadyuvante tecnológico.

8. Un producto farmacéutico, un producto veterinario, un alimento médico, un producto alimenticio, un suplemento alimenticio o una masa agria, una composición alimenticia probiótica, un suplemento dietético, una composición simbiótica, o una composición bioterapéutica, que comprende una cantidad efectiva de la composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-4, junto con cantidades apropiadas de excipientes o ingredientes alimenticios aceptables.

9. Un método para obtener un mutante de la cepa de *Lactobacillus casei* depositada en la Spanish Type Culture Collection (CECT) con el número de acceso CECT 8590, en el que el método comprende el uso de la cepa depositada como material de partida y la aplicación de mutagénesis, y en el que el mutante obtenido retiene o potencia adicionalmente al menos la capacidad de la cepa depositada de degradar la gliadina y el péptido inmunotóxico de 33-mer que tiene la SEQ NO: 1.

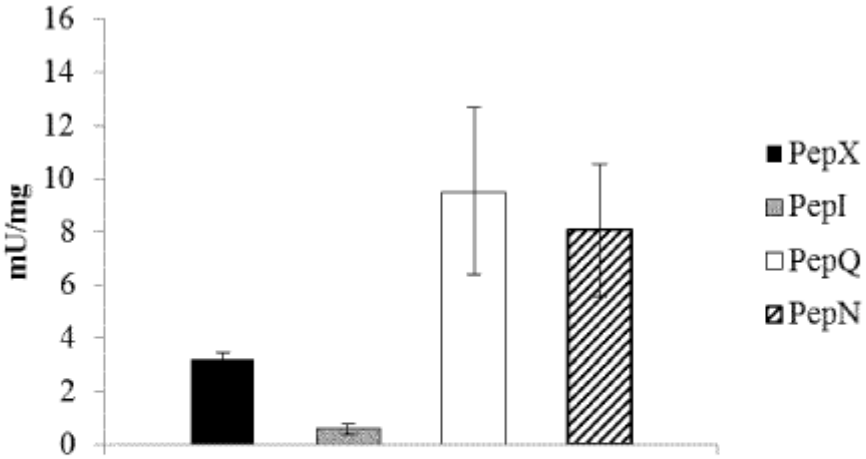

Fig 1.

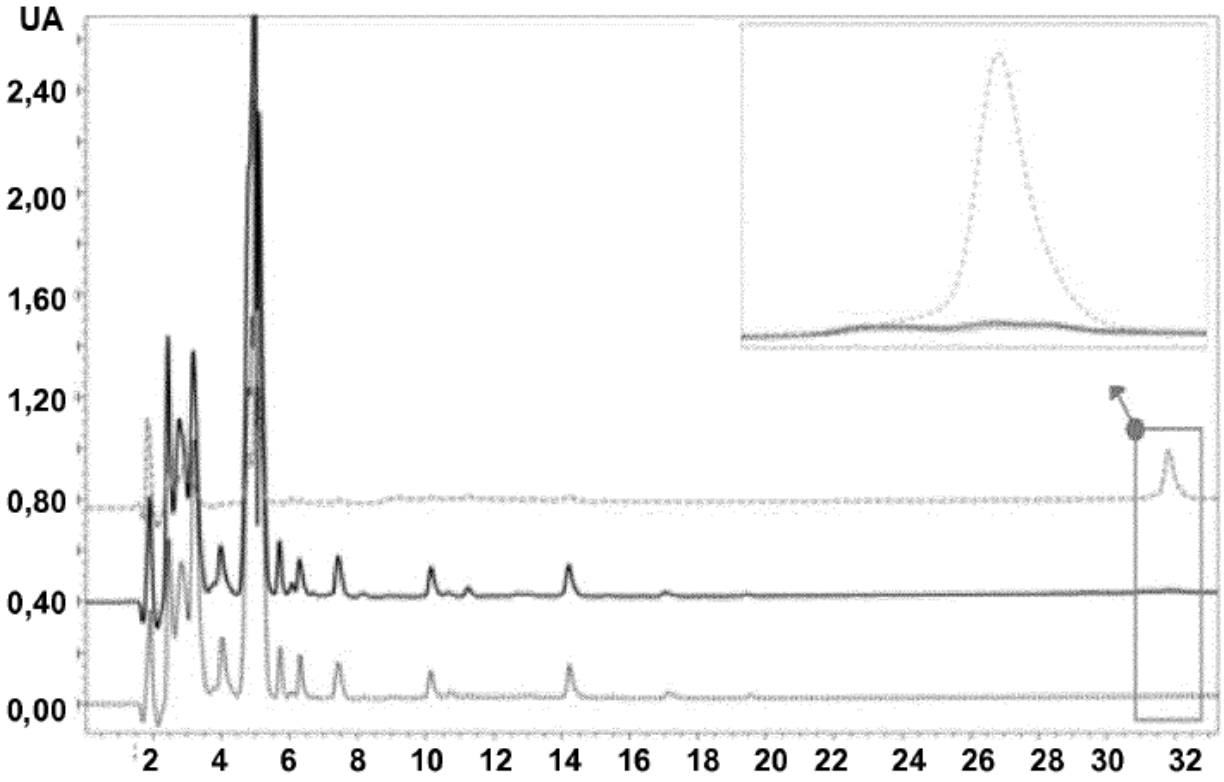
UA
2,40
2,00
1,60
1,20
0,80
0,40
0,00
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32

Fig. 2

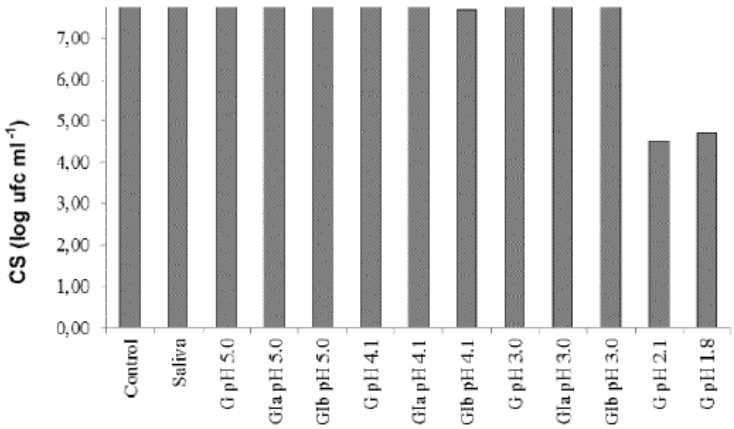
CS (log ufc ml-1)
7,00
6,00
5,00
4,00
3,00
2,00
1,00
0,00
Control
Saliva
G pH 5.0
Gla pH 5.0
Gib pH 5.0
G pH 4.1
Gla pH 4.1
Gib pH 4.1
G pH 3.0
Gla pH 3.0
Gib pH 3.0
G pH 2.1
G pH 1.8

Fig 3.