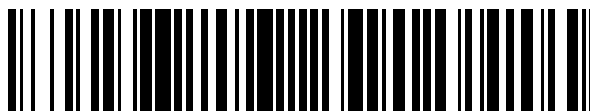


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 301**

51 Int. Cl.:

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: **12.03.2010** **PCT/IB2010/000699**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2011** **WO11110884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2010** **E 10714066 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018** **EP 2545160**

54 Título: **Bacterias de ácido láctico para la enfermedad celíaca**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
26.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MONTSERRAT CARRERAS, AGUSTI;
ANDREU COROMINAS, MONTSERRAT;
RAMON VIDAL, DANIEL;
GENOVES MARTINEZ, SALVADOR y
BATALLER LEIVA, ESTHER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 691 301 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).

Campo

La invención se refiere a lactobacilos o estreptococos en el tratamiento o la prevención de la enfermedad celíaca.

5 Antecedentes de la técnica

La enfermedad celíaca es un trastorno autoinmune del intestino delgado que se presenta en personas genéticamente predispuestas de todas las edades desde la infancia en adelante. La enfermedad celíaca está causada por una reacción hacia las gliadinas, una familia de proteínas ricas en prolina y glutamina relacionadas de la proteína del gluten, que se encuentran en el trigo (y proteínas similares de la tribu *Triticeae*, tales como la cebada y el centeno). Tras la exposición a la gliadina, la enzima transglutaminasa tisular modifica la proteína, y el sistema inmunitario de los sujetos predispuestos a la enfermedad celíaca reacciona y reacciona de forma cruzada con el tejido del intestino delgado, provocando una reacción inflamatoria. La inflamación posteriormente conduce a la atrofia de las vellosidades e interfiere en la absorción de los nutrientes, incluyendo los minerales y las vitaminas liposolubles. Los síntomas clásicos de la enfermedad celíaca incluyen distensión abdominal, vómitos, diarrea, pérdida de peso (o crecimiento atrofiado en los niños), anemia y fatiga. La respuesta más potente y más común del sistema inmunitario hacia la gliadina se dirige hacia un fragmento de $\alpha 2$ -gliadina de 33 aminoácidos de longitud (representado en la presente memoria como SEQ ID NO: 1) (Shan *et al.* 2005 *J. Proteome Res.* 4:1732- 1741; Moron *et al.* 2008; *Am. J. Clin. Nut* 87(2): 405-14).

20 La frecuencia de la enfermedad celíaca diagnosticada clínicamente es del 0,05 al 0,27 %. Sin embargo, los estudios de población de partes de Europa, India, América del Sur, Australia y Estados Unidos indican que la frecuencia puede estar entre el 0,33 y 1,06 % de los niños y 0,18-1,2 % de los adultos. Hay indicios de que muchas personas no han sido diagnosticadas y solo tienen síntomas leves de malestar gastrointestinal.

El único tratamiento eficaz conocido hasta la fecha es una dieta sin gluten durante toda la vida.

En Siegel M. *et al.* (2006, *Chem Biol* 13 (6): 649-58), se describe una combinación de enzimas (prolil endopeptidasa y una cisteína endopeptidasa específica de la glutamina de la cebada (EP-B2)) que degradan el supuesto epítipo del péptido 33-mérico de $\alpha 2$ -gliadina en el duodeno. Piper *et al.* (2004, *J Pharm Exper. Therap* 311: 213-219) describen el uso de prolil-endopeptidasa para degradar los péptidos de gliadina. El documento WO 2007/108763 describe cepas de *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* para potenciar la inmunotolerancia en la enfermedad celíaca o la dermatitis atópica. El documento WO 2006/097415 describe una mezcla de 8 bacterias lácticas y bifidobacterias de la masa fermentada capaces de degradar los péptidos de gliadinas, tales como el fragmento 62-75 de la A-gliadina y el péptido epítipo 33-mérico, gracias a una actividad proteolítica complementaria entre las bacterias. Los alimentos horneados obtenidos a partir de estas bacterias lácticas y bifidobacterias se pueden usar en la dieta de un sujeto que padezca la enfermedad celíaca. El documento WO 03/028745 describe cepas de bacterias lácticas con peptidasas internas capaces de degradar la exorfina A5, un péptido 5-mérico derivado de la proteína del gluten. Estas cepas son capaces de reducir la concentración de los péptidos patógenos intestinales.

Angelis *et al.* (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(1):80-93, 2006) describen la capacidad de un preparado probiótico comercial para hidrolizar por completo el péptido de gliadina 33-mérico.

Compendio de la invención

40 Se llevaron a cabo estudios *in vitro* para seleccionar cepas de bacterias lácticas con características probióticas. Se examinó una gran cantidad de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium* para determinar la actividad peptidasa en el sobrenadante de cultivo capaz de degradar el péptido 33-mérico LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 1) que participa en la enfermedad celíaca.

45 Las cepas seleccionadas inicialmente se exploraron para determinar su capacidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal y la estabilidad de la actividad peptidasa del sobrenadante en el tracto gastrointestinal, es decir, su capacidad para alcanzar y conservar una actividad peptidasa degradante del péptido 33-mérico en el sitio de acción de la enfermedad celíaca, es decir, en el intestino delgado.

Posteriormente, las cepas seleccionadas se ensayaron para determinar su capacidad para degradar otros péptidos supuestamente implicados en la enfermedad celíaca, en concreto, un péptido 20-mérico de α -gliadina QQLPQPQQPQQSPFQQRP (SEQ ID NO: 2) y uno 13-mérico de A-gliadina, LGQQQPPPPQQPY (SEQ ID NO: 3).

Sorprendentemente, se descubrió que el péptido 33-mérico se degradó lentamente en condiciones que simulaban el tracto digestivo humano y que surgió un producto de descomposición del péptido 18-mérico PQLPYPQQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 4) que era completamente resistente a la degradación adicional por las

enzimas digestivas humanas. Este nuevo hallazgo permitió una mejor selección adicional, al explorar las cepas bacterianas lácticas para determinar su capacidad para degradar el péptido 18-mérico.

De un gran número de cepas, finalmente se seleccionaron tres cepas individuales y una mezcla de dos cepas. Estas cepas son resistentes a las condiciones gastrointestinales, producen una alta actividad peptidasa estable en las condiciones gastrointestinales y, de manera ventajosa, degradan los péptidos 33-mérico, 20-mérico y 13-mérico, que participan en la enfermedad celíaca, y también degradan el péptido 18-mérico resistente. Se purificó la enzima responsable de la degradación peptídica a partir de estas cepas y se caracterizó, se secuenció y se identificó como una proteína idéntica al factor de elongación Tu en el caso de *Lactobacillus casei* y como un factor de elongación G en el caso de *Streptococcus thermophilus*.

Por lo tanto, el consumo de estas cepas específicas de bacterias lácticas o de las enzimas producidas por estas bacterias con actividad peptidasa se puede usar ventajosamente en las personas que padecen la enfermedad celíaca o en las personas con riesgo de padecer la enfermedad celíaca, tales como las personas con antecedentes familiares de la enfermedad celíaca o personas con problemas gastrointestinales leves asociados con la enfermedad celíaca. Preferiblemente, las cepas se administran en un producto recién fermentado, más preferiblemente, en un producto lácteo fermentado.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la invención está definido por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una cepa de bacteria láctica para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de la enfermedad celíaca como se relata en la reivindicación 1.

En la presente memoria, se describe un medio fermentado por una cepa de bacteria láctica para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de la enfermedad celíaca, en donde el medio fermentado por la bacteria láctica es capaz de degradar el péptido 33-mérico LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 1), el péptido 20-mérico QQLPQPQPQSPFQQRRPF (SEQ ID NO: 2), el péptido 13-mérico LGQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 3) y/o el péptido 18-mérico PQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4), y en donde la bacteria láctica se selecciona del grupo que consiste en el género *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

En la realización preferida, dichas bacterias lácticas y/o dicho medio fermentado por dichas bacterias lácticas son capaces de degradar el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 3 y el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4.

Se describe una mezcla de dos cepas de bacterias lácticas y/o un medio fermentado por una mezcla de dos cepas de bacterias lácticas para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de la enfermedad celíaca, en donde dichas bacterias lácticas y/o dicho medio fermentado por las bacterias lácticas son capaces de degradar el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1, el péptido 20-mérico de SEQ ID NO: 2, el péptido 13-mérico de SEQ ID NO: 3 y/o el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, preferiblemente el péptido de 33-mérico de SEQ ID NO: 3 y el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, y en donde las bacterias lácticas se seleccionan del grupo que consiste en el género *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

La presente invención también proporciona una composición que comprende la cepa *Lactobacillus casei* CNCM 1-4270. También se describe al menos al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus helveticus* CNCM 1-4279, *L. delbrueckii subsp. lactis* CNCM 1-4280, *Lactobacillus casei* CNCM 1-4270, *Streptococcus thermophilus* CNCM 1-4269 y una mezcla de *S. thermophilus* CNCM 1-2776 y *L. bulgaricus* CNCM 1-2787.

La presente invención también proporciona el uso de la cepa *Lactobacillus casei* CNCM 1-4270 como se relata en la reivindicación 13. Se describe el uso de al menos una cepa de bacterias lácticas seleccionada del grupo que consiste en el género *Lactobacillus* y *Streptococcus* que producen un factor de elongación proteico para la degradación del péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1, el péptido 20-mérico de SEQ ID NO: 2, el péptido 13-mérico de SEQ ID NO: 3 y/o el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, preferiblemente el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 3 y el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4.

En la presente memoria, se describe un método para seleccionar cepas de bacterias lácticas para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de la enfermedad celíaca que comprende las etapas de seleccionar las cepas con la capacidad de degradar el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, cuando al menos el 45 %, preferiblemente al menos el 70 %, de dicho péptido se hidroliza en presencia de un sobrenadante de cultivo de dichas cepas.

Enfermedad celíaca:

La enfermedad celíaca o celiacía también se conoce a veces como esprúe celíaco, esprúe no tropical, esprúe endémico, enteropatía del gluten, enteropatía sensible al gluten e intolerancia al gluten. La enfermedad es diagnosticada por un médico como se conoce en la técnica, e implica análisis serológicos de sangre y, normalmente, una endoscopia/gastroscopia y una biopsia.

La enfermedad celíaca es un trastorno del intestino delgado causado por una reacción a las gliadinas, una familia de prolinas ricas en prolina y en glutamina relacionadas de la proteína del gluten, que se encuentran en el trigo, la cebada y el centeno. Al exponerse a la gliadina, el sistema inmunitario provoca una reacción inflamatoria que conduce a la atrofia de las vellosidades e interfiere en la absorción de los nutrientes, incluyendo los minerales y las vitaminas liposolubles. Los pacientes con enfermedad celíaca suelen padecer distensión abdominal, vómitos, diarrea, pérdida de peso (o crecimiento atrofiado en los niños), anemia y fatiga.

Bacterias lácticas:

Una bacteria láctica, una mezcla de bacterias lácticas o un medio fermentado por bacterias lácticas como se describe en la presente memoria es capaz de degradar un péptido como se definió anteriormente cuando al menos el 45 %, y por orden de preferencia creciente al menos el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % y 90 % de dicho péptido se hidroliza en presencia de un sobrenadante de cultivo de una bacteria láctica seleccionada o una mezcla de bacterias lácticas seleccionadas.

El ensayo de degradación de péptidos se puede llevar a cabo mediante la actividad de proteólisis enzimática presente en el sobrenadante de cultivo de una bacteria láctica seleccionada o de una mezcla de bacterias lácticas seleccionadas obtenidas en cultivo en fase logarítmica y estacionaria de la siguiente manera: el ensayo se lleva a cabo con una mezcla que contiene PBS (p.ej., 100 mM, pH 7.3), el péptido (p.ej., 1-2 mM) y el sobrenadante de cultivo (por ejemplo, 20-30 µl) durante 48 horas a 37 °C; luego, la muestra se hierve, se filtra (p.ej., a través de 0,45 µm) y se analiza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Se llevaron a cabo estudios *in vitro* para seleccionar cepas de bacterias lácticas con estas propiedades. Se examinó un gran número de cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium* para determinar la actividad peptidasa en el sobrenadante de cultivo capaz de degradar el péptido 33-mérico LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 1) que participa en la enfermedad celíaca.

Todas las cepas seleccionadas inicialmente con esta capacidad pertenecían al género *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Posteriormente, se examinaron para determinar su capacidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal y la estabilidad de la actividad peptidasa del sobrenadante en el tracto gastrointestinal, es decir, su capacidad para alcanzar y mantener una actividad peptidasa activa degradante del péptido 33-mérico en el sitio de acción de la enfermedad celíaca, que es el intestino delgado.

Posteriormente, las cepas seleccionadas se ensayaron para determinar su capacidad para degradar otros péptidos supuestamente implicados en la enfermedad celíaca, en concreto, un péptido 20-mérico de α -gliadina QQTPQPQQPQQSPFQQQRPF (SEQ ID NO: 2) y 13-mérico de A-gliadina, LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 3).

Sorprendentemente, se descubrió que el péptido 33-mérico se degradó lentamente en condiciones que simulaban el tracto digestivo humano y que surgió un producto de descomposición del péptido 18-mérico PQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 4) que era completamente resistente a la degradación adicional por las enzimas digestivas humanas. Este nuevo hallazgo permitió una mejor selección adicional, al explorar las cepas bacterianas lácticas para determinar su capacidad para degradar el péptido 18-mérico.

De un gran número de cepas, finalmente se seleccionaron cinco cepas individuales y una mezcla de dos cepas. Estas cepas degradan el péptido de gliadina 33-mérico en la mayor medida (al menos el 45 %, preferiblemente al menos el 70 %, de dicho péptido se hidroliza en presencia de un cultivo de sobrenadante de una cepa bacteriana láctica seleccionada o dicha mezcla como se describió anteriormente). De esta selección, se prefiere una subselección de tres cepas individuales y una mezcla de dos cepas, ya que tienen la mayor resistencia a las condiciones gastrointestinales, producen una alta actividad peptidasa estable en las condiciones gastrointestinales y también degradan los péptidos 20-mérico y 13-mérico implicados en la enfermedad celíaca, degradando también el péptido 18-mérico resistente, que se formó a partir del péptido 33-mérico.

Se encontró el sobrenadante de cultivo (medio fermentado) de las siguientes cepas de bacterias lácticas como el más eficaz para degradar los péptidos relacionados con la enfermedad celíaca:

- cepa DN_114001, siendo *Lactobacillus casei*, depositada según el Tratado de Budapest en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, 25 Rue du Docteur Roux, París) con el número I-1518 el 23 de enero de 1995. Las características detalladas de esta cepa se describen en la solicitud PCT WO 96/20607;

- cepa DN_114077, *Lactobacillus casei*, depositada según el Tratado de Budapest en la CNCM con el número I-4270 el 16 de diciembre de 2009. Esta cepa se identificó como perteneciente a *L. casei* basándose tanto en la tipificación por PCR como en la actividad bioquímica en el kit API 50 CHL (Biomerieux, Francia). Según los resultados de Api 50CHL, la cepa I-4270 fermenta los siguientes azúcares y alcoholes: ribosa, galactosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbosa, ramnosa (reacción débil), manitol, sorbitol, alfa-metil-D-glucósido, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa lactosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melejitosa, almidón (reacción débil), gentiobiosa, turanosa, tagatosa, L-arabitol y gluconato;

- cepa DN_1190118, *Lactobacillus helveticus*, depositada según el Tratado de Budapest en LA CNM con el número I-4279 el 25 de febrero de 2010. Esta cepa se identificó como perteneciente a *L. helveticus* basándose en la tipificación por PCR y la actividad bioquímica en el kit API 50 CHL (Biomerieux, Francia). Según los resultados de Api 50CHL, la cepa I-4279 fermenta los siguientes azúcares y alcoholes: galactosa, glucosa, fructosa, manosa, *N*-acetil-glucosamina y lactosa;

- cepa DN_001343, *Streptococcus thermophilus*, depositada según el Tratado de Budapest en la CNM con el número I-2776 el 24 de enero de 2002. Esta cepa se identificó como perteneciente a *S. thermophilus* basándose tanto en la tipificación por PCR como en la actividad bioquímica en el kit API 50 CHL (Biomerieux, Francia). Según los resultados de Api 50CHL, la cepa I-2776 fermenta los siguientes azúcares y alcoholes: glucosa, lactosa y sacarosa;

- cepa DN_100290, *Lactobacillus bulgaricus*, depositada según el Tratado de Budapest en la CNM con el número I-2787 el 24 de enero de 2002. Esta cepa se identificó como perteneciente a *L. bulgaricus* basándose tanto en la tipificación por PCR como en la actividad bioquímica en el kit API 50 CHL (Biomerieux, Francia). Según los resultados de Api 50CHL, la cepa I-2787 fermenta los siguientes azúcares y alcoholes: glucosa, fructosa, manosa y lactosa;

- cepa DN_001546, *Streptococcus thermophilus*, CNM 1-4269, depositada según el Tratado de Budapest en la CNM el 16 de diciembre de 2009. Esta cepa se identificó como perteneciente a *S. thermophilus* basándose tanto en la tipificación por PCR como en la actividad bioquímica en el kit API 50 CHL (Biomerieux, Francia). Según los resultados de Api 50CHL, la cepa I-4269 fermenta los siguientes azúcares y alcoholes: glucosa, lactosa y sacarosa; y

- cepa DN_1110272, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, depositada según el Tratado de Budapest en la CNM con el número I-4280 el 25 de febrero de 2010. Esta cepa se identificó como perteneciente a *L. delbrueckii subsp. lactis* basándose tanto en la tipificación por PCR como en la actividad bioquímica en el kit API 50 CHL (Biomerieux, Francia). Según los resultados de Api 50CHL, la cepa I-4280 fermenta los siguientes azúcares y alcoholes: galactosa, glucosa, fructosa, manosa, *N*-acetil-glucosamina, maltosa y lactosa.

Preferiblemente, se usan juntas en una mezcla, tal como en un cultivo iniciador de yogur, *S. thermophilus* CNM I-2776 y *L. bulgaricus* CNM I-2787.

En una realización preferida, la bacteria láctica se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* y *Streptococcus thermophilus*.

En otra realización preferida, dicha cepa de bacteria láctica o mezcla de dos cepas se selecciona del grupo que consiste en *Lactobacillus casei* CNM I-1518, *Lactobacillus casei* CNM I-4270, *Lactobacillus helveticus* CNM I-4279, *Streptococcus thermophilus* CNM I-4269, *L. delbrueckii subsp. lactis* CNM I-4280 y una mezcla de *Streptococcus thermophilus* CNM I-2776 y *Lactobacillus bulgaricus* CNM I-2787.

Las cepas más eficaces en las condiciones gastrointestinales y, por lo tanto, preferidas, se seleccionan entre *Lactobacillus casei* CNM I-1518 (cepa DN_114001), *L. helveticus* CNM I-4279 (cepa DN_1190118), *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* CNM I-4280 (cepa DN_1110272); y *S. thermophilus* CNM I-2776 (cepa DN_001343) mezclada con *Lactobacillus bulgaricus* CNM I-2787 (cepa DN_100290).

También se describe el uso de las cepas mencionadas anteriormente, pero también de cepas mutantes o cepas transformadas genéticamente derivadas de una cualquiera de las cepas parentales que todavía tienen actividad peptidasa contra los péptidos del gluten, para combatir la enfermedad celíaca. Estas cepas mutantes o transformadas genéticamente pueden ser cepas en donde uno o más genes endógenos de la cepa parental han sido mutados, por ejemplo, para modificar algunas de sus propiedades metabólicas (p. ej., su capacidad para fermentar los azúcares, su resistencia a la acidez), su supervivencia al transporte en el tracto gastrointestinal, su post-acidificación o su producción de metabolitos). También pueden ser cepas resultantes de la transformación genética de la cepa parental por uno o más genes de interés, por ejemplo, para dar a dicha cepa características fisiológicas adicionales, o para permitirle expresar proteínas de interés terapéutico o de vacunación que se deseen administrar a través de dichas cepas.

Sin embargo, la presente invención no engloba las cepas de *Lactobacillus plantarum* LB931 (DSM 11918), LB7c (DSM 17853) y LB3e (DSM 17852) y la cepa de *Lactobacillus rhamnosus* LB21 (NCIMB 40564) descritas en la solicitud PCT WO 2007/108763.

Actividad peptidasa del sobrenadante de cultivo contra péptidos del gluten:

La actividad peptidasa, que estaba ubicada en el exterior de las células, fue la más alta en los cultivos en donde las células crecieron hasta la fase logarítmica media. Esto es indicativo de que la actividad peptidasa forma parte del metabolismo primario. La actividad peptidasa de algunas cepas fue altamente estable (de al menos el 25 %, preferiblemente de al menos el 30 %, degradación de péptidos), en las circunstancias que imitaban el tracto

gastrointestinal humano. La actividad peptidasa produce la escisión de LQLQPFPQPLPYPQPLPYPQPLPYPQPPF (SEQ ID NO: 1), QQLPQQPQQSPFQQRPF (SEQ ID NO: 2), LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 3) y del producto de descomposición del péptido 18-mérico resistente a la degradación QPLPYPQPLPYPQPPF (SEQ ID NO: 4), preferiblemente el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 3 y el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, como se definió anteriormente.

La actividad peptidasa se aisló, se purificó y se secuenció a partir de la cepa DN_114001, *Lactobacillus casei*, CNCM I-1518 y la cepa DN_001343, *S. thermophilus*, CNCM I-2776, y sorprendentemente resultaron ser factores de elongación. El factor de elongación Tu, en caso de *Lactobacillus*, y el factor de elongación G, en caso de *S. thermophilus*. Los factores de elongación Tu y G son genes/proteínas ortólogos. Los factores de elongación son proteínas que facilitan las elongaciones de la traducción, las etapas de la síntesis de proteínas desde la formación del primer enlace peptídico hasta la formación del último. El factor de elongación bacteriano Tu puede degradar las proteínas bloqueadas en el extremo N. Además, los factores de elongación son proteínas superficiales que poseen características de un factor de adhesión. Dichos factores desempeñan un papel en la capacidad de unión de la mucina.

Composición:

También se describe una composición que comprende una bacteria láctica o una mezcla de dos cepas de bacterias lácticas y/o un medio fermentado por al menos una bacteria láctica o una mezcla de dos cepas de bacterias lácticas, en donde las bacterias lácticas se seleccionan del grupo que consiste en el género *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Dichas bacterias lácticas, mezcla de dos cepas de bacterias lácticas y/o medio fermentado son capaces de degradar el péptido 33-mérico LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 1), el péptido 20-mérico QQLPQPQPQSPFQQRP (SEQ ID NO: 2), el péptido 13-mérico LGQQQPFPPQPY (SEQ ID NO: 3) y/o el péptido 18-mérico PQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 4), preferiblemente, el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 3 y el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, como se definió anteriormente.

Preferiblemente, las bacterias lácticas descritas en la presente memoria con la capacidad de degradar péptidos del gluten se usan para preparar composiciones adecuadas para la administración enteral.

En una realización, las composiciones comprenden células de las bacterias lácticas como se definieron anteriormente.

Preferiblemente, la composición comprende al menos una cepa seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus helveticus* CNCM I-4279, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNCM I-4280, *Lactobacillus casei* CNCM I-4270, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-4269 y una mezcla de *S. thermophilus* CNCM I-2776 y *L. bulgaricus* CNCM I-2787, preferiblemente *Lactobacillus helveticus* CNCM I-4279, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CNCM I-4280, y una mezcla de *S. thermophilus* CNCM I-2776 y *L. bulgaricus* CNCM I-2787.

Preferiblemente dichas células son viables. Como alternativa, las células pueden inactivarse, pero la inactivación debe producirse de manera suave, para no destruir la actividad de la enzima en un grado demasiado alto. Si hay células viables presentes en dicha composición, preferiblemente están presentes en una cantidad de 10^5 a 10^{13} unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente de al menos 10^6 ufc, más preferiblemente de al menos 10^7 ufc, aún más preferiblemente de al menos 10^8 ufc, y lo más preferiblemente de al menos 10^9 ufc por g de peso seco de la composición. En el caso de una composición líquida, en general, esto corresponde a de 10^4 a 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc), preferiblemente de al menos 10^5 ufc, más preferiblemente de al menos 10^6 ufc, aún más preferiblemente de al menos 10^7 ufc y lo más preferiblemente de al menos 10^8 ufc/ml.

Las células viables pueden estar presentes opcionalmente en una composición sin el sobrenadante que comprende la actividad peptidasa. Tras la propagación de las células en el tracto gastrointestinal, la nueva actividad peptidasa será *in situ*. Por lo tanto, las composiciones con células solo tienen una actividad contra el gluten. Preferiblemente, las células bacterianas pueden aislarse y añadirse a una composición, por ejemplo, en forma de células bacterianas secas, congeladas o liofilizadas.

En una realización, las células bacterianas se retiran de la composición, pero el sobrenadante que comprende la actividad peptidasa está presente en el producto. Dicha composición es preferiblemente un producto fermentado del que se han retirado las células bacterianas. Las formas adecuadas para retirar las células bacterianas son la filtración o la centrifugación.

En una realización preferida, están presentes en la composición tanto las células como el sobrenadante que comprende la actividad peptidasa. Por lo tanto, preferiblemente, las bacterias lácticas descritas en la presente memoria se usan para preparar un producto fermentado. El producto fermentado normalmente tiene presentes todos los metabolitos extracelulares de las bacterias producidas durante la fermentación, incluyendo la actividad peptidasa del gluten. Opcionalmente, pueden estar presentes otras cepas de bacterias lácticas. El producto fermentado puede estar presente en forma de un líquido o presente en forma de un polvo seco obtenido mediante el secado del líquido fermentado.

Preferiblemente, el producto fermentado es un producto fresco. Un producto fresco, que no se ha sometido a etapas intensas de tratamiento térmico, tiene la mayor actividad peptidasa (al menos el 45 %, preferiblemente al menos el 70 %, de un péptido como se definió anteriormente está hidrolizado).

5 Preferiblemente, el producto fermentado es un producto lácteo, más preferiblemente leche fermentada y/o suero de leche fermentado. Preferiblemente, la composición nutricional es yogur, o una leche fermentada en forma cuajada, agitada o bebible. Preferiblemente el producto fermentado es un queso.

Preferiblemente, el producto fermentado es un vegetal fermentado, tal como soja fermentada, cereales y/o frutas en forma de cuajada, agitada o bebible.

10 Preferiblemente, la composición nutricional presente es una comida para bebés, una fórmula de leche para bebés o una fórmula de continuación para bebés. Preferiblemente, la presente composición es un producto nutracéutico o farmacéutico, un suplemento nutricional o alimento médico.

La composición puede comprender opcionalmente otras cepas de bacterias lácticas. Estas otras cepas de bacterias pueden usarse para fermentar un producto, preferiblemente un producto lácteo.

Método:

15 También se describe un método para seleccionar cepas de bacterias lácticas para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de la enfermedad celíaca que comprende las etapas de seleccionar las cepas con la capacidad de degradar el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1, el péptido 20-mérico de SEQ ID NO: 2, el péptido 13-mérico de SEQ ID NO: 3 y/o el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, preferiblemente el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4, cuando al menos el 45 %, preferiblemente al menos el 70 % de dichos péptidos se hidroliza en presencia de un sobrenadante de cultivo de dichas cepas.

20 En una realización de dicho método, comprende además la etapa de seleccionar las cepas en donde la capacidad de degradar el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1, el péptido 20-mérico de SEQ ID NO: 2, el péptido 13-mérico de SEQ ID NO: 3 y/o el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4 es estable (es decir, más del 25 %, preferiblemente más del 30 %, de dicho péptido se degrada) a pH entre 4 y 6, preferiblemente a pH 5 y/o estable (es decir, más del 25 %, preferiblemente más del 35 % de dichos péptidos se degradan) en presencia de enzimas digestivas seleccionadas del grupo que consiste en lisozima, pepsina, quimotripsina y tripsina.

EJEMPLO 1: EXPLORACIÓN DE SOBRENADANTES DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE DEGRADAR EL PÉPTIDO 33-MÉRICO DE SEQ ID NO: 1.

30 Se seleccionaron 34 cepas de *Lactobacillus*, 10 cepas de *Streptococcus* y 3 cepas de *Bifidobacterium*, y se evaluó su capacidad para producir una actividad proteolítica con la capacidad de degradar el péptido 33-mérico LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 1) de α 2-gliadina (supuesta responsable de la enfermedad celíaca).

Todos los microorganismos incluidos se cultivaron tanto en un medio general como específico.

35 Para las cepas de *Lactobacillus*, se usó el medio general MRS (20 g/l de dextrosa, 10 g/l de peptona, 8 g/l de extracto de carne, 5 g/l de acetato de sodio, 2 g/l de fosfato dipotásico, 2 g/l de citrato de amonio, 1 ml de Tween 80, 0,2 g/l de sulfato de magnesio, 0,05 g/l de sulfato de manganeso) y se usó el medio específico YGBLP (10 g/l de peptona, 8 g/l de extracto de carne, 3 g/l de extracto de levadura, 2,5 g/l de sulfato monopotásico, 2,5 g/l de fosfato dipotásico, 0,2 g/l de sulfato de magnesio, 0,05 g/l de sulfato de manganeso, 5 g/l de glucosa, 5 g/l de lactosa).

40 Para las cepas de *Streptococcus*, se usó el medio general Elliker (5 g/l de dextrosa, 20 g/l de triptona, 5 g/l de sacarosa, 1,5 g/l de acetato de sodio, 2,5 g/l de gelatina, 0,5 g/l de ácido ascórbico, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de lactosa, 4 g/l de cloruro de sodio) y se usó el medio específico BHI (12,5 g/l de sólidos de infusión de cerebro de ternera, 5 g/l de sólidos de infusión de corazón de ternera, 10 g/l de proteasa peptona, 2 g/l de glucosa, 5 g/l de cloruro de sodio, 2,5 g/l de fosfato disódico).

45 Para *Bifidobacterium*, las cepas se cultivaron en un medio general que consistía en MRS con cisteína (0,5 g/l) y en el medio específico de la especie *Bifidobacterium* (10 g/l de caseína peptona, 5 g/l de extracto de carne, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de glucosa, 1 ml de Tween 80, 3 g/l de fosfato dipotásico y 0,5 g/l de cisteína).

50 La temperatura del cultivo escogida fue de 25 °C y 37 °C para las cepas de *Lactobacillus* y de 37 °C para las cepas de *Streptococcus* y *Bifidobacterium*. El crecimiento fue en condiciones aeróbicas y en condiciones anaeróbicas. Los sobrenadantes obtenidos tras 5 minutos de centrifugación a 10.000 rpm se usaron para el ensayo de degradación del péptido 33-mérico *in vitro*. Se obtuvieron sobrenadantes del crecimiento en medio general y específico en cultivos en fase logarítmica y estacionaria para detectar la actividad degradante como resultado del metabolismo primario y secundario.

El ensayo de degradación del péptido 33-mérico se llevó a cabo mediante la actividad de proteólisis enzimática presente en los sobrenadantes de cultivo de los microorganismos seleccionados. La reacción se llevó a cabo con

114 µl de PBS (100 mM, pH 7,3), 12 µl de péptido 33-mérico (1,7 mM) que se sintetizó y se obtuvo mediante el GENSCRIPT (Pscataway, EE. UU.) y 24 µl de sobrenadante de cultivo durante 48 horas a 37 °C. Posteriormente, las muestras se hirvieron, se filtraron a través de 0,45 µm y se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento dotada de un detector de matriz de fotodiodos.

- 5 La cuantificación del péptido 33-mérico residual se evaluó mediante HPLC con una columna C₁₈ de Waters. La detección del péptido se realizó a 220 nm y 35 °C. Los disolventes usados fueron agua mili-Q con TFA (0,1 %) y acetonitrilo con TFA (0,1 %).

- 10 La siguiente Tabla 1 describe los resultados de la exploración de los sobrenadantes. Resultó que, en especial, los sobrenadantes de las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* fueron capaces de degradar el péptido y que las células cultivadas en la fase logarítmica fueron más eficaces en la degradación del péptido que las células cultivadas en la fase estacionaria. Además, las células cultivadas en el medio general, en la mayoría de los casos, fueron más capaces de degradar el péptido 33-mérico que las células cultivadas en un medio específico.

15 **Tabla 1:** Porcentaje de la degradación del péptido 33-mérico LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP (SEQ ID NO: 1) por sobrenadantes de cultivo de las cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* cultivadas hasta la fase logarítmica y la fase estacionaria del cultivo en medio específico o general.

Fase de crecimiento		logarítmica		estacionaria	
Medio de crecimiento		general	específico	general	específico
Cepa					
<i>Lactobacillus</i>					
P02431	C3	-	-	52,4 ± 1,5	30,3 ± 9,6
	F2	-	-	58,5 ± 2,0	38,8 ± 12,4
	A3	-	-	43,3 ± 2,4	53,6 ± 10,8
	G2	-	-	3,9 ± 10,1	0,0 ± 0,0
	E1	76,5 ± 1,9	15,6 ± 2,3	32,1 ± 10,4	0,0 ± 0,0
	C7	74,6 ± 1,4	15,6 ± 3,0	39,7 ± 3,3	9,6 ± 1,6
	C1	81,9 ± 1,1	33,1 ± 15,0	43,7 ± 1,1	14,3 ± 4,9
	D1	36,5 ± 3,3	22,6 ± 3,0	45,9 ± 0,3	7,4 ± 8,6
	F1	78,0 ± 0,2	10,5 ± 3,8	47,0 ± 2,6	10,0 ± 1,2
	G1	80,9 ± 0,5	17,2 ± 1,4	44,2 ± 2,0	6,5 ± 5,1
	A2	77,4 ± 1,2	12,4 ± 3,2	32,8 ± 1,0	0,0 ± 0,0
P02503	A1	72,5 ± 0,0	19,3 ± 4,1	25,6 ± 5,7	8,3 ± 2,0
	H3	81,6 ± 3,7	16,9 ± 6,9	39,7 ± 3,0	0,0 ± 0,0
	C4	66,1 ± 4,2	10,1 ± 1,3	27,8 ± 3,1	0,3 ± 0,9

ES 2 691 301 T3

Fase de crecimiento		logarítmica		estacionaria	
Medio de crecimiento		general	específico	general	específico
	C2	76,9 ± 2,4	19,3 ± 4,4	7,6 ± 3,1	0,0 ± 0,0
	A3	87,5 ± 1,0	15,9 ± 1,4	18,3 ± 1,1	0,0 ± 0,0
	B3	58,7 ± 2,7	17,3 ± 3,9	14,1 ± 1,2	0,0 ± 0,0
	E1	74,9 ± 0,8	10,1 ± 2,9	11,0 ± 2,5	0,0 ± 0,0
	A2	55,1 ± 1,9	17,1 ± 5,5	19,2 ± 2,1	2,9 ± 7,3
	F2	59,2 ± 1,3	11,6 ± 0,4	34,7 ± 2,3	2,0 ± 3,5
	H2	73,7 ± 0,4	19,0 ± 2,7	35,6 ± 2,6	0,5 ± 4,4
P02535	G1	49,4 ± 1,4	-	34,7 ± 2,3	2,0 ± 3,5
	D5	10,7 ± 1,5	0,7 ± 12,5	35,6 ± 2,6	0,5 ± 4,4
	H3	-	-	0,0 ± 1,4	8,4 ± 0,7
	A1	5,0 ± 8,0	5,9 ± 2,3	29,7 ± 3,2	11,5 ± 3,2
P02523	H3	64,9 ± 6,9	18,2 ± 7,0	27,8 ± 1,3	-
	B3	65,3 ± 1,7	28,7 ± 3,3	32,3 ± 2,1	4,2 ± 0,2
	F3	63,6 ± 5,5	35,8 ± 0,0	28,9 ± 0,1	0,1 ± 1,5
	A4	71,7 ± 0,0	24,4 ± 2,6	25,8 ± 1,1	0,0 ± 3,2
	B7	3,6 ± 15,4	11,5 ± 0,9	24,5 ± 0,1	0,2 ± 4,8
P02445	B1	71,9 ± 1,9	27,1 ± 5,1	28,7 ± 3,9	9,0 ± 2,5
	H7	73,2 ± 0,0	8,2 ± 1,9	73,5 ± 0,6	3,0 ± 5,7
	A8	56,4 ± 22,3	10,3 ± 6,6	43,1 ± 2,9	0,7 ± 4,1
	C8	54,2 ± 26,3	2,1 ± 3,4	42,9 ± 1,9	6,5 ± 5,3
	E10	62,6 ± 1,0	27,7 ± 3,6	0,0 ± 3,1	27,0 ± 4,9
	B9	0,0 ± 0,0	26,3 ± 3,0	0,0 ± 1,9	22,4 ± 2,3
	F8	27,4 ± 5,4	0,0 ± 0,2	0,0 ± 2,3	22,7 ± 4,5
	G8	0,0 ± 4,1	19,0 ± 2,4	4,3 ± 12,7	21,6 ± 4,5
<i>Bifidobacterium</i>					

Fase de crecimiento		logarítmica		estacionaria	
Medio de crecimiento		general	específico	general	específico
P02495	D1	64,2 ± 6,9	-	-	-
	H1	65,9 ± 7,4	-	-	-
	F5	48,6 ± 8,4	21,32 ± 4,22	26,1 ± 2,9	64,5 ± 12,2
	A4	32,2 ± 7,8	23,56 ± 8,59	2,9 ± 23,1	1,6 ± 14,9
	G5	15,8 ± 16,3	15,65 ± 1,21	24,8 ± 5,0	25,1 ± 4,7
<i>Streptococcus</i>					
P02654	G1	81,1 ± 3,5	53,4 ± 15,3	73,7 ± 0,4	71,8 ± 7,5
P02646	A7	80,9 ± 21,2	45,2 ± 3,2	78,6 ± 2,5	50,4 ± 15,6
	A9	93,8 ± 0,9	44,6 ± 3,3	78,4 ± 1,1	76,9 ± 20,5
	E1	84,6 ± 0,0	44,0 ± 1,9	77,9 ± 2,9	62,7 ± 0,9
	B3	85,3 ± 0,7	47,4 ± 2,2	79,8 ± 0,3	40,9 ± 3,0
P02638	H7	87,5 ± 2,0	49,7 ± 2,8	62,9 ± 0,7	86,7 ± 3,2
	F9	82,4 ± 3,7	93,6 ± 9,1	57,3 ± 3,0	58,1 ± 6,3
	B10	82,9 ± 1,2	70,4 ± 0,3	58,5 ± 0,9	46,0 ± 5,4
	D10	82,1 ± 1,7	66,3 ± 0,2	51,2 ± 5,4	35,3 ± 4,4
	G10	76,6 ± 3,3	83,1 ± 1,0	59,3 ± 0,7	49,9 ± 1,6

EJEMPLO 2: EXPLORACIÓN DE CÉLULAS Y SOBRENADANTES SELECCIONADOS DE ÁCIDO LÁCTICO PARA DETERMINAR LA RESISTENCIA AL TRACTO GASTROINTESTINAL

- 5 Se seleccionaron las cepas más eficaces en la degradación del péptido 33-mérico, la cepa P02503 A1, P02503 A3, P02431 C1, P02445 H7, P02638 H7, P 02646 A9, y también se seleccionó una mezcla de P 02638 F9/P02523 A4 como la simbiosis típica del yogur. La identificación se realizó basándose en la tipificación por PCR y en la actividad bioquímica en el kit API 50 CHL (Biomérieux, Francia).

P02503 A1 es la cepa DN_114001, *Lactobacillus casei*, depositada en la CNCM con el número I-1518 el 23 de enero de 1995.

- 10 P02431 C1 es la cepa DN_1190118, *Lactobacillus helveticus*, depositada en la CNCM con el número I-4279 el 25 de febrero de 2010.

P02445 H7 es la cepa DN_1110272, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, depositada en la CNCM con el número I-4280 el 25 de febrero de 2010.

- 15 P02638 F9 es la cepa DN_001343, *Streptococcus thermophilus*, depositada en la CNCM con el número I-2776 el 24 de enero de 2002.

P02523 A4 es la cepa *Lactobacillus bulgaricus* DN_100290 depositada en la CNCM con el número I-2787 al 24 de enero de 2002. Estas dos cepas se usan en una mezcla como cultivo iniciador del yogur.

P02503 A3 es la cepa DN_114077, *Lactobacillus casei*, depositada en la CNCM con el número I-4270 el 16 de diciembre de 2009.

- 20 P02646 A9 es la cepa DN_001546, *Streptococcus thermophilus*, depositada en la CNCM con el número I-4269 el 16 de diciembre de 2009.

Se ensayó la resistencia de estas cepas a un pH bajo y a las enzimas digestivas. Se han de seleccionar las cepas que sean resistentes a un pH bajo y resistentes a las enzimas digestivas, ya que dichas cepas pueden sobrevivir a su paso a través de la boca, del estómago y del tracto intestinal, lo que es un requisito previo para ejercer los efectos contra la enfermedad celiaca *in vivo*. No solo se ensayaron las células, sino también los sobrenadantes que comprendían la actividad peptidasa contra el péptido 33-mérico, para determinar su resistencia al bajo pH y a las enzimas digestivas. Las células se cultivaron durante 17 h y se recogieron por centrifugación (4000 rpm, 5 min), y se volvieron a suspender en tampón PBS. Para el ensayo de resistencia al pH, el tampón tenía pH 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Solo se muestran los resultados de pH 3 y 5, que son típicos de la resistencia al pH. Para la resistencia a las enzimas digestivas, se volvieron a suspender las células en tampón PBS a pH 3 (pepsina), a pH 7 (quimotripsina y tripsina) y a pH 6 (lisozima). Las células se incubaron durante 2 horas a 37 °C, excepto en el caso de la lisozima. Cuando se ensayó la lisozima, las células se incubaron durante 5 min.

En el caso de los ensayos del sobrenadante, las células se cultivaron durante 17 h, y las células se retiraron mediante centrifugación (4000 rpm). El sobrenadante se liofilizó y se volvió a suspender en las mismas condiciones descritas anteriormente para las células.

Tabla 2: Resistencia de las células de bacterias lácticas y de la actividad peptidasa de los sobrenadantes del cultivo al pH bajo y a la presencia de enzimas digestivas

		pH		Enzimas digestivas			
Cepa		pH 5	pH 3	Lisozima	Pepsina	Quimio-tripsina	Tripsina
P02503 A1	Células ^a	100	91	100	100	100	95
	Sobrenadante ^b	34,9	42,7	36,7	63,2	47,1	56,2
P02503 A3	Células	100	100	100	26,2	42,6	24,9
	Sobrenadante	nd ^c	nd	nd	nd	nd	nd
P02431 C1	Células	86	81	65,9	101	63,8	38,2
	Sobrenadante	36,1	33,1	69,9	67,8	59,1	56,2
P02445 H7	Células	80	47	4,5	62	88,1	99,1
	Sobrenadante	32,6	35,7	61,2	60,1	37,4	86,4
P02638 H7	Células	3	4	42,6	3,0	3,3	4,0
	Sobrenadante	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P 02646 A9	Células	3	3	2,0	100	4,3	52,9
	Sobrenadante	nd	nd	nd	nd	nd	nd
P 02638 F9 / P02523 A4	Células	100	97	29,1	66,7	82,7	100
	Sobrenadante	39,2	39,3	85,6	55,5	54,0	81,8

a: % de viabilidad. b: % de actividad de degradación del péptido 33-mérico residual. c: nd: no determinado.

La mayoría de las células y de los sobrenadantes seleccionados muestran un alto porcentaje de supervivencia en condiciones de pH bajo y en presencia de enzimas digestivas. Con respecto a los sobrenadantes del cultivo, la mayoría de ellos pudieron degradar el péptido de 33-mérico *in vitro*.

EJEMPLO 3: EXPLORACIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE CEPAS SELECCIONADAS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD DE DEGRADAR EL PÉPTIDO 20-MÉRICO DE SEQ ID NO: 2 Y EL PÉPTIDO 13-MÉRICO DE SEQ ID NO: 3.

Posteriormente, se realizó una exploración para determinar la capacidad de degradación de otros péptidos relacionados con la enfermedad celiaca, en concreto, del péptido 20-mérico y del péptido 13-mérico.

De la misma manera que en el Ejemplo 1, se ensayó la capacidad de diferentes sobrenadantes (P02503 A1, P02431 C1, P02445 H7 y la mezcla P02523 A4 - P02638 F9 para degradar otros péptidos implicados en la enfermedad celíaca como el péptido 20-mérico de α -gliadina (QLLPQPQQPQQSPFQQRP) y el péptido 13-mérico de A-gliadina (LGQQPFPQQPY). Se detectó una alta degradación de ambas muestras con las cepas seleccionadas (Tabla 3). Estos datos subrayan el importante papel de la actividad proteolítica de los sobrenadantes de cultivo de las cepas seleccionadas, no solo del péptido principal relacionado con la enfermedad celíaca, sino también de otros péptidos implicados en este trastorno.

Tabla 3: Porcentaje de degradación del péptido 13-mérico y 20-mérico por las cepas seleccionadas

Cepa	Péptido 13-mérico	Péptido 20-mérico
P02503 A1	74,86 $\pm$ 1,31	61,08 $\pm$ 2,22
P02431 C1	52,46 $\pm$ 0,00	50,54 $\pm$ 0,87
P02445 H7	72,05 $\pm$ 1,93	47,06 $\pm$ 0,36
P02523 A4 - P02638 F9	71,38 $\pm$ 1,10	63,13 $\pm$ 5,22

EJEMPLO 4: IDENTIFICACIÓN DE OTROS PÉPTIDOS MÁS RESISTENTES POTENCIALMENTE IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD CELÍACA

Aunque el péptido 33-mérico de α -gliadina es un contribuyente principal a la inmunotoxicidad del gluten y es responsable de la enfermedad celíaca, se desarrolló un modelo de digestión enzimática *in vitro* de un tracto digestivo *in vivo* para imitar las condiciones fisiológicas con el fin de verificar y certificar que el péptido no era degradado a su paso por el tracto gastrointestinal por el proceso digestivo. Las concentraciones de pepsina, pancreatina y bilis se optimizaron usando un diseño experimental (Granato-Lorencio, *et al.*, (2007). *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6387-6394).

Por medio de una cromatografía líquida de alto rendimiento, se observó que el péptido 33-mérico LQLPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQP se había degradado completamente al final del proceso, lo que es representativo de la parte distal del intestino delgado. Sorprendentemente, mediante espectrometría de masa/masa (MS/MS), se identificó la presencia de un péptido 18-mérico (PQLPYPQPQLPYPQPQP) como producto de degradación principal, que tenía la capacidad de atravesar el tracto digestivo sin cambios, sin degradación adicional.

Por esta razón, también se seleccionaron los sobrenadantes para determinar su capacidad para degradar el péptido 18-mérico.

Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Capacidad para degradar el péptido 18-mérico

Cepa	% de degradación del péptido 18-mérico
P02503 A1	100
P02638 F9	100

EJEMPLO 5: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEASA CAPAZ DE DEGRADAR EL PÉPTIDO 33-MÉRICO DE SEQ ID NO: 1 Y EL PÉPTIDO 18-MÉRICO DE SEQ ID NO: 4) IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD CELÍACA

Se purificó la proteasa capaz de degradar *in vitro* el péptido 33-mérico, así como el péptido 18-mérico, de dos cepas seleccionadas de *Lactobacillus* (P02503 A1) y *Streptococcus* (P02638 F9).

Se cultivaron cuatro litros de las cepas seleccionadas de *Lactobacillus* A1 y *Streptococcus* F9 sin agitación en los medios MRS con cisteína y BHI, respectivamente, y se purificó la enzima sobrenadante que tenía la actividad proteolítica hasta la homogeneidad mediante precipitación con sulfato de amonio. Se sometió a diálisis el sulfato de amonio residual que se unió a la proteína frente a un tampón de baja concentración de sal.

La purificación de las proteasas A1 y F9 se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico con una columna HiPrep 16/10 Q XL en un sistema de cromatografía AKTA Explorer. Se sometieron las fracciones a desorción con tampón de Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, CaCl₂ 5 mM con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M, y luego se analizaron *in*

vitro a 37 °C durante 48 horas para evaluar la actividad proteasa frente a los péptidos 33-mérico y 18-mérico.

Las fracciones con actividad de proteasa frente al péptido 33-mérico y 18-mérico se purificaron adicionalmente en una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) con una columna HiPrep™ 16/10 Phenyl FF (high sub), y las fracciones se sometieron a desorción con tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 7, con un gradiente lineal de (NH₄)₂SO₄ de 1,5 a 0 M. Se ensayaron *in vitro* todas las fracciones de la cromatografía de interacción hidrófoba, y las que contenían actividad proteasa se agruparon y aislaron usando una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa (Amicon Ultra, Millipore). Se usó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico nativa 1-D (SDS-PAGE) para la separación de las proteínas individuales, y se secuenciaron las enzimas de *Lactobacillus* A1 y *Streptococcus* F9 purificadas, y se identificaron como el "factor de elongación Tu" de *Lactobacillus casei* y el "factor de elongación G" de *Streptococcus thermophilus* con una masa molecular de 45,3 kDa y 76,6 kDa, respectivamente. En la caracterización y los parámetros cinéticos de la enzima "factor de elongación Tu" de *Lactobacillus* A1 y la enzima "factor de elongación G" de *Streptococcus* F9, se encontró que su actividad proteasa máxima contra el péptido 18-mérico se produjo a pH 7,3 y a 37 °C, y las concentraciones micromolares de Zn²⁺ produjeron la inhibición de la proteólisis del péptido 18-mérico. Los valores de K_m y V_{máx} para la proteasa de *Lactobacillus* A1 fueron de 0,643 mg de péptido 18-mérico/ml y 1,272 mg de péptido 18-mérico/ml respectivamente, y los valores de K_m y V_{máx} para la proteasa de *Streptococcus* F9 fueron de 0,794 mg de péptido 18-mérico/ml y de 1,5022 mg de péptido 18-mérico/ml respectivamente.

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> COMPAGNIE GERVAIS DANONE
MONTSERRAT CARRERAS, Agusti
ANDREU COROMINAS, Montserrat
RAMON VIDAL, Daniel
GENOVES MARTINEZ, Salvador
BATALLER LEIVA, Esther
- 10 <120> BACTERIAS DE ÁCIDO LÁCTICO PARA LA ENFERMEDAD CELÍACA
<130> MJP/XRN/ah-F0191CAS241
<160> 4
- 15 <170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 33
<212> PRT
20 <213> Artificial
<220>
<223> péptido 33-mérico
- 25 <400> 1
Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro
1 5 10 15
Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro
20 25 30
Phe
<210> 2
<211> 20
30 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> péptido 20-mérico
- 35 <400> 2
Gln Gln Leu Pro Gln Pro Gln Gln Pro Gln Gln Ser Pro Phe Gln Gln
1 5 10 15
Gln Arg Pro Phe
20
<210> 3
40 <211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
45 <223> péptido 13-mérico
<400> 3

ES 2 691 301 T3

Leu Gly Gln Gln Gln Pro Phe Pro Pro Gln Gln Pro Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> péptido 18-mérico

10

<400> 4

Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln

1 5 10 15

Pro Phe

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de bacteria láctica para su uso en el tratamiento y/o en la prevención de la enfermedad celíaca, en donde dicha bacteria láctica es capaz de degradar el péptido 33-mérico LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 1), el péptido 20-mérico QQLPQPQPQQSPFQQRPF (SEQ ID NO: 2), el péptido 13-mérico LGQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 3) y/o el péptido 18-mérico PQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 4), y en donde la bacteria láctica es *Lactobacillus casei* CNCM I-4270.
2. Una cepa de bacteria láctica para su uso según la reivindicación 1, en donde dicha bacteria láctica es capaz de degradar el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1 y el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4.
3. Una cepa de bacteria láctica para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha bacteria láctica produce factores de elongación proteicos, y en donde dichos factores de elongación proteicos tienen una actividad peptidasa capaz de degradar el péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1, el péptido 20-mérico de SEQ ID NO: 2, el péptido 13-mérico de SEQ ID NO: 3 y/o el péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4.
4. Una cepa de bacteria láctica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la degradación de dichos péptidos se produce en el intestino delgado de un sujeto.
5. Una cepa de bacteria láctica para su uso según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde al menos el 45 % del péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1, del péptido 20-mérico de SEQ ID NO: 2, del péptido 13-mérico de SEQ ID NO: 3 y/o del péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4 se hidroliza en presencia de un sobrenadante de cultivo de dichas cepas.
6. Una composición que comprende la cepa *Lactobacillus casei* CNCM I-4270.
7. Una composición según la reivindicación 6 para su uso en la prevención y/o en el tratamiento de la enfermedad celíaca.
8. Una composición según la reivindicación 6 o para su uso según la reivindicación 7, en donde la composición es un producto líquido.
9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8, o para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde la composición es un producto lácteo.
10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 8 a 9, o para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde la composición es un producto fermentado.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 8 a 10, o para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la composición comprende de 10^5 a 10^{13} ufc por g de peso seco.
12. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 8 a 11, o para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, en donde las bacterias lácticas se administran a un sujeto a una dosis de al menos 10^{10} ufc/día.
13. Uso de la cepa *Lactobacillus casei* CNCM I-4270 que produce un factor de elongación proteico para la degradación *in vitro* del péptido 33-mérico de SEQ ID NO: 1, del péptido 20-mérico de SEQ ID NO: 2, del péptido 13-mérico de SEQ ID NO: 3 y/o del péptido 18-mérico de SEQ ID NO: 4.
14. Una bacteria láctica que es *Lactobacillus casei* CNCM I-4270.