

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 210**

51 Int. Cl.:

A61K 35/747 (2015.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

A23L 33/135 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2015** **PCT/EP2015/077642**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.06.2016** **WO16083450**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2015** **E 15813277 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 3223837**

54 Título: **Lactobacillus para usar como probiótico**

30 Prioridad:

25.11.2014 EP 14194729

25.11.2014 EP 14194725

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.06.2020

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TB Heerlen, NL

72 Inventor/es:

DE VOS, PAULUS;

TROOST, FREDERIK JAN;

MUJAGIC, ZLATAN y

FAAS, MARIA MARGARETHA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 764 210 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lactobacillus para usar como probiótico

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un nuevo probiótico con propiedades inmunomoduladoras.

5 Antecedentes de la invención

Durante los últimos años se ha aceptado en general que la función adecuada del sistema inmunitario humano depende de la interacción compleja de la microbiota con la mucosa humana (Belkaid et al., 2014; Cao et al., 2014). En la salud normal, las bacterias no patógenas activan el sistema inmunitario para inducir tolerancia a la microbiota esencial para la captación de energía y desarrollo inmunitario (de Kivit et al., 2014; Geuking et al., 2014; Walker et al., 2014). Sin embargo, en afecciones específicas, se pueden producir respuestas inmunitarias contra microbios que contribuyen al desarrollo de enfermedades tales como la IBD (Meijerink et al., 2010). La salud humana se puede beneficiar de un conocimiento más profundo de cómo contribuyen los microorganismos a la homeostasis de las respuestas inmunitarias y cómo previenen la inflamación. La esperanza es que conducirá al diseño de intervenciones personalizadas.

Especies comensales de *Lactobacillus* pueden tener una función activa en el mantenimiento de la homeostasis de respuestas inmunitarias guiando la polarización de linfocitos T hacia linfocitos T reguladores (Treg) y supresión de respuestas Th2 asociadas a alergia (Smelt et al., 2013). Se considera que esto se lleva a cabo por las interacciones de componentes de la pared de las células bacterianas o productos bacterianos secretados que interaccionan con células inmunitarias o epiteliales en la mucosa humana (Walker et al., 2014). Sin embargo, parece que estas interacciones contribuyen a algo más que solo a la tolerancia a los microbios beneficiosos. En muchos estudios se ha mostrado que *Lactobacillus* tiene un impacto positivo en las respuestas inmunitarias como se muestra en varios estudios de vacunación (Meijerink et al., 2012; Wells et al., 2011). Además, los *Lactobacillus* activan rutas celulares tolerogénicas más generales en seres humanos como se ha mostrado recientemente (van Baarlen et al., 2010; van Baarlen et al., 2009).

Lactobacillus plantarum es una bacteria derivada de alimentos bien conocida (van Baarlen et al., 2009). En estudios previos se ha mostrado que las cepas de *Lactobacillus plantarum* tienen efectos diferentes en células dendríticas humanas y células mononucleares de sangre periférica (Meijerink et al., 2010; Meijerink et al., 2012; Wells et al., 2011; van Baarlen et al., 2010; van Baarlen et al., 2009; Van Hemert et al., 2010). Mediante la aplicación de hibridación de genoma comparativo se ha identificado una serie de componentes de la pared celular en la glicosilación de ácido teicoico de la pared celular que están asociados con estos efectos diferenciales (Meijerink et al., 2010; Meijerink et al., 2012; Wells et al., 2011; van Baarlen et al., 2010; van Baarlen et al., 2009; Van Hemert et al., 2010; Smet et al., 2013). Se supone que esta expresión diferencial de genes de *Lactobacillus plantarum* contribuye a las diferencias observadas en la activación del receptor tipo Toll (TLR)2-4, antígenos CD14 y dominio de oligomerización por unión de nucleótido que contienen la proteína 2 (NOD2) (Meijerink et al., 2010). Como consecuencia de las diferencias en la unión de TLR, las cepas de *Lactobacillus plantarum* inducen tras incubación con monocitos o células dendríticas diferentes cantidades de citoquina proinflamatoria IL12 y la citoquina reguladora IL10 (Meijerink et al., 2010; Meijerink et al., 2012; Wells et al., 2011; van Baarlen et al., 2010; van Baarlen et al., 2009; Van Hemert et al., 2010; Smet et al., 2013; Smelt et al., 2013). La barrera gastrointestinal se puede alterar prácticamente a diario, p. ej., por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), deportes, ingestión de alcohol y como tal produce inflamación (leve) del intestino. Un factor estresante de citoquinas leve que es muy común en la sociedad occidental es el consumo de un AINE tal como la indometacina. Millones usan AINE para el tratamiento del dolor musculoesquelético. Un efecto secundario de estos AINE es la inflamación leve del intestino por alteración de la barrera inmunitaria gastrointestinal (Schoultz et al., 2012). Puesto que los AINE los usan millones de personas en todo el mundo hay una necesidad urgente de tratar dicha inflamación (leve) del intestino.

Otro asunto donde los antígenos derivados de alimentos pueden tener una función es en el mantenimiento de la eficacia de la vacunación. Es bien sabido que la memoria inmunitaria contra un antígeno encontrado en el pasado (hace algunas décadas) puede disminuir a lo largo del tiempo. Cuando el individuo se encuentra otra vez con el antígeno o patógeno asociado con el antígeno, esta memoria inmunitaria disminuida puede dar como resultado una respuesta insuficiente al antígeno o patógeno asociado con el antígeno (Deasy et al., 2013; Kerneis et al., 2014; Poorolajal et al., 2010; Schure et al., 2012). El documento CN-A-102 747 012 describe una formulación probiótica que comprende una cepa de *Lactobacillus plantarum* P8. Por consiguiente, hay una necesidad urgente de conservar, mantener y/o reactivar la memoria inmunitaria. Esto podría, no solo reavivar una respuesta inmunitaria disminuida, sino que también podría hacer al sistema inmunitario más susceptible a protocolos de vacunación, lo cual puede ser específicamente beneficioso para individuos inmunocomprometidos tales como personas mayores. Además, faltan biomarcadores y ensayos adecuados para identificar y demostrar efectos de productos inmunomoduladores. Por consiguiente, hay una necesidad urgente de dicho biomarcador y/o ensayo.

Descripción de la invención

Sorprendentemente, ahora se ha demostrado que un *Lactobacillus* específico tiene propiedades inmunomoduladoras. Dicho *Lactobacillus* específico preferiblemente también tiene propiedades antiinflamatorias.

Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención proporciona una formulación probiótica que comprende al menos una sustancia de calidad alimentaria y al menos una cepa bacteriana probiótica que tiene al menos una identidad de secuencia de 50% con el genoma de *Lactobacillus plantarum* TIFN 101 (depositado con el número CBS 138100 en Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 8, 3584 CT Países Bajos). Dicha formulación probiótica se denomina en la presente memoria una formulación probiótica de acuerdo con la presente invención. Dicha cepa bacteriana probiótica se denomina en la presente memoria una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y tiene propiedades inmunomoduladoras y preferiblemente también tiene propiedades antiinflamatorias.

Fuera del alcance de la invención reivindicada, una cepa bacteriana probiótica preferida comprende al menos un polinucleótido que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 174. Preferiblemente, una cepa bacteriana probiótica comprende al menos dos, más preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, setenta, ochenta, noventa o más preferiblemente cien polinucleótidos que tiene cada uno al menos 50% de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 174.

Una cepa bacteriana probiótica preferida adicional comprende al menos un polinucleótido que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 176 - SEQ ID NO: 256. Preferiblemente, una cepa bacteriana probiótica comprende al menos dos, más preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, setenta, ochenta, noventa o más preferiblemente cien polinucleótidos que tiene cada uno al menos 50% de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 176 - SEQ ID NO: 256.

Una cepa bacteriana probiótica preferida adicional comprende al menos un polinucleótido que tiene al menos 50% de identidad de secuencia con un polinucleótido que codifica un polipéptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 340. Preferiblemente, una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos, más preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, veinte, treinta, cuarenta, cincuenta, sesenta, setenta, ochenta, noventa o más preferiblemente cien polinucleótidos que tiene cada uno al menos 50% de identidad de secuencia con un polinucleótido que codifica un polipéptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 260 - SEQ ID NO: 340.

Las propiedades inmunomoduladoras se pueden evaluar in vivo e in vitro. Para una evaluación preferida in vitro, se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre y se estimulan con un antígeno y la cepa bacteriana probiótica o una parte o un extracto de la misma.

Una propiedad inmunomoduladora de la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención, preferiblemente es la capacidad para conservar, mantener y/o reactivar la respuesta inmunitaria generada por una inmunización previa y preferiblemente se define como la capacidad para mantener o aumentar la cantidad de una subpoblación de PBMC dentro de una población de PBMC. Preferiblemente dicha subpoblación es una población de CD45RO⁺ específica de antígeno, preferiblemente seleccionada de células CD3⁺/CD4⁺/CD45RO⁺ (linfocitos T auxiliares de memoria), células CD3⁺/CD4⁺/CD45RO⁺/CD69⁺ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), células CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺ (linfocitos T citotóxicos), células CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺/CD69⁺ (linfocitos T de memoria activados), células CD3⁺/CD4⁺/CD45RO⁺/CCR7⁺/CD62L⁺ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3⁺/CD4⁺/CD45RO⁺/CCR7⁻/CD62L⁻ (linfocitos T auxiliares de memoria efectores). Las subpoblaciones más preferidas son células CD3⁺/CD4⁺/Foxp3⁺ (linfocitos T auxiliares Foxp3⁺), y células CD3⁺/CD4⁺/CD45RO⁺ que producen IFN γ y/o IL17 (linfocitos T auxiliares que producen IFN γ y/o IL17). Preferiblemente, la subpoblación de células CD3⁺/CD4⁺/Foxp3⁺ (linfocitos T auxiliares Foxp3⁺) y/o células CD3⁺/CD8⁺/CD45RO⁺/CD69⁺ (linfocitos T de memoria activados) se mantienen en un sujeto al que se le administra una formulación probiótica o la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la subpoblación de células CD3⁺/CD4⁺/CD45RO⁺ que producen IFN γ y/o IL17 (linfocitos T auxiliares de memoria que producen IFN γ y/o IL17) aumenta en un sujeto al que se le administra una formulación probiótica o la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, el antígeno es un antígeno de recuerdo por inmunización intencionada o no intencionada, es decir, un antígeno que el individuo ha recibido previamente; más preferiblemente, el antígeno de recuerdo se selecciona del grupo que consiste en toxina tetánica, antígeno de la hepatitis B y gripe. Preferiblemente, un aumento de la cantidad de la subpoblación específica de PBMC es al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (es decir, un aumento de 1 vez), un aumento de 2 veces, un aumento de 3 veces, un aumento de 4 veces, un aumento de 6 veces, un aumento de 10 veces, un aumento de 50 veces, un aumento de 100 veces, un aumento de

1000 veces, o al menos un aumento de 10.000 veces. Dicho aumento se puede medir por cualquier ensayo conocido por el experto en la técnica y se mide preferiblemente con un ensayo descrito en la presente memoria.

Una propiedad inmunomoduladora adicional preferida es la producción aumentada de citoquinas de linfocitos T auxiliares de memoria, más preferiblemente linfocitos T auxiliares de memoria activados; preferiblemente el porcentaje de células Th de memoria (activadas) que producen IL-17 y/o el porcentaje de células Th de memoria (activadas) que producen IFN γ aumenta/aumentan en comparación con un control al que no se le ha administrado el probiótico de acuerdo con la presente invención. El aumento en porcentaje es preferiblemente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (es decir, un aumento de 1 vez), un aumento de 2 veces, un aumento de 3 veces, un aumento de 4 veces, un aumento de 6 veces, un aumento de 10 veces, un aumento de 50 veces.

Una propiedad inmunomoduladora preferida adicional de una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención es la inducción de un cambio en la relación de IL10/IL12 por células dendríticas cuando se ensaya de acuerdo con Meijerink et al., 2010, preferiblemente un cambio en una relación de IL10/IL12 relativamente alta. El aumento en la relación es preferiblemente al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (es decir, un aumento de 1 vez), un aumento de 2 veces, un aumento de 3 veces, un aumento de 4 veces, un aumento de 6 veces, un aumento de 10 veces, un aumento de 50 veces.

Una propiedad inmunomoduladora preferida adicional es la inducción de una respuesta transcripcional diferencial en la mucosa duodenal. Preferiblemente, un gen que codifica un compuesto seleccionado del grupo que consiste en inmunoglobulina lambda variable 6-57, proteína similar a 6 que contiene dominio de inmunoglobulina y conjunto V putativo, inmunoglobulina lambda variable 7-46, factor regulador de interferón 4, familia de GDNF, CD27, CD79a y activador de plasminógeno, está regulado por aumento. La regulación por aumento preferiblemente es un aumento del nivel de expresión de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (es decir, un aumento de 1 vez), un aumento de 2 veces, un aumento de 3 veces, un aumento de 4 veces, un aumento de 6 veces, un aumento de 10 veces, un aumento de 50 veces.

Una propiedad inmunomoduladora preferida adicional es la regulación por aumento de MHC-II α en la mucosa duodenal. La regulación por aumento preferiblemente es un aumento de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% (es decir, un aumento de 1 vez), un aumento de 2 veces, un aumento de 3 veces, un aumento de 4 veces, un aumento de 6 veces, un aumento de 10 veces, un aumento de 50 veces. Las propiedades inmunomoduladoras pueden ser propiedades combinadas de la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención.

Una formulación probiótica puede comprender al menos una cepa bacteriana adicional, que preferiblemente es una cepa bacteriana probiótica.

Una formulación probiótica de acuerdo con la presente invención comprende al menos la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y al menos una sustancia de calidad alimentaria. Una sustancia de calidad alimentaria se denomina además en la presente memoria una sustancia de calidad alimentaria de acuerdo con la presente invención, y es una sustancia adecuada para que la consuma un sujeto, preferiblemente un ser humano o animal, más preferiblemente un ser humano. Una sustancia de calidad alimentaria puede ser de origen vegetal o animal y puede contener esencialmente nutrientes, tales como hidratos de carbono, grasas, proteínas, vitaminas y/o minerales. Una sustancia de calidad alimentaria puede estar prevista para la ingestión por un organismo y posteriormente asimilación por las células del organismo para producir energía, mantener la vida y/o estimular el crecimiento. Una sustancia de calidad alimentaria de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limita a una sustancia seleccionada del grupo que consiste en un producto lácteo, de cereales, vegetal, de frutas, de pescado o de carne. La expresión "producto de" se define en la presente memoria como la sustancia de calidad alimentaria que se produce a partir de una materia prima específica tal como láctea, cereales, vegetales, fruta, pescado o carne. La sustancia de calidad alimentaria puede ser de una mezcla de diferentes materias primas, p. ej., una mezcla de sustancia láctea y cereales o una mezcla de carne y fruta.

Una cepa bacteriana probiótica puede ser cualquier cepa bacteriana probiótica. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud de un hospedante (FAO/WHO, *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria. Report of FAO/WHO expert consultation* 1-4 de octubre. 2001). Los probióticos más ampliamente aplicados pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Marco et al., 2006). Sus efectos beneficiosos se ejercen a través de varios mecanismos, que incluyen la modulación de la microbiota intestinal, la producción de sustancias antibacterianas, la mejora de la función de barrera epitelial y la reducción de la inflamación intestinal (Corr, et al., 2009; Saulnier et al., 2009; Saxelin et al., 2005). Los probióticos se proporcionan lo más habitualmente mediante la ingestión de alimentos recién fermentados o preparaciones bacterianas secadas. La viabilidad de las cepas bacterianas se considera una característica importante para la funcionalidad probiótica; por lo tanto, se considera que alcanzar su parte de acción en el intestino vivas es una característica importante para las cepas probióticas (Ma et al., 2004; Gobetti et al., 2010). La presente invención usa una cepa bacteriana probiótica adicional. Una cepa bacteriana probiótica adicional preferida de acuerdo con la presente invención es una cepa bacteriana seleccionada del grupo que consiste en los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*,

Bifidobacterium, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus* y *Escherichia*, preferiblemente que consiste en *actobacillus* y *Bifidobacterium*. Las especies preferidas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. son *Lactobacillus reuteri*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. murinus*, *L. jensenii*, *L. salivarius*, *L. minutis*, *L. brevis*, *L. gallinarum*, *L. amylovorus*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus damnosus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. gallinarum*, *B. magnum*, y *B. thermophilum*. La bacteria *Lactobacillus* preferiblemente es *Lactobacillus plantarum*, preferiblemente una *Lactobacillus plantarum* del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum* JDM1, ST-III, F9UP33, EITR17, D7V971 (ATCC14917) y C6VQ24, incluso más preferiblemente *Lactobacillus plantarum* WCFS1.

Se entiende que las replications de la cepa depositada de acuerdo con la presente invención están abarcadas por la invención. El término "replicación" se refiere al material biológico que representa una copia sustancialmente no modificada del material, tal como el material producido por el crecimiento de microorganismos, p. ej., crecimiento de bacterias en medio de cultivo.

Preferiblemente, en una formulación probiótica de acuerdo con la presente invención, la concentración de las cepas bacterianas probióticas está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 99 por ciento en peso, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 por ciento en peso, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 80, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 70, más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, más preferiblemente de aproximadamente 10, 20, 30 o 40 a aproximadamente 50 por ciento en peso con respecto al peso total de la formulación y/o de aproximadamente 1 E+4, 1 E+5 o 1 E+6 a aproximadamente 1 E+8, 1 E+9, 1 E+10, 1 E+11 o 1 E+12 unidades formadoras de colonias/ml de formulación, incluso más preferiblemente de aproximadamente 1x10 E+6 a aproximadamente 1x10 E+12 unidades formadoras de colonias/ml de formulación.

Más preferiblemente, en una formulación probiótica de acuerdo con la presente invención, la concentración de las cepas bacterianas probióticas está en el intervalo de 1 a 99 por ciento en peso, más preferiblemente de 5 a 90 por ciento en peso, más preferiblemente de 5 a 80, más preferiblemente de 5 a 70, más preferiblemente de 5 a 60, más preferiblemente de 10, 20, 30 o 40 a 50 por ciento en peso con respecto al peso total de la formulación, y/o de 1 E+4, 1 E+5 o 1 E+6 a 1 E+8, 1 E+9, 1 E+10, 1 E+11 o 1 E+12 unidades formadoras de colonia/ml de formulación, incluso más preferiblemente de 1x10 E+6 a 1x10 E+12 unidades formadoras de colonia/ml de formulación. Una unidad formadora de colonia es una expresión conocida para el experto en la técnica y una unidad típicamente se refiere a la cantidad de bacteria que forma una colonia en una placa de cultivo; es una expresión para referirse a bacterias viables.

Incluso más preferiblemente, en una formulación probiótica de acuerdo con la presente invención la concentración de las cepas bacterianas probióticas está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento en peso con respecto al peso total de la formulación, y/o de aproximadamente 1 E+6 a aproximadamente 1 E+12 unidades formadoras de colonia/ml de formulación.

La formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención puede estar en cualquier forma o estado de constitución conocido para el experto en la técnica. La formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención puede ser parte de un comprimido (por compresión) o píldora o puede estar contenida en otro vehículo tal como un recipiente o una cápsula, un gel o una gota. Un vehículo preferido es un recipiente con un volumen de líquido entre 0,5 y 50 ml adecuado para comprender, preferiblemente que comprende una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención.

La formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención también puede estar comprendida de forma conveniente en una sustancia alimentaria. Por consiguiente, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un producto alimenticio, una formulación para enriquecer alimentos, un complemento alimenticio, una formulación nutracéutica o una formulación farmacéutica que comprende una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención. Un producto alimenticio de acuerdo con la presente invención preferiblemente es una sustancia de calidad alimentaria como se ha descrito previamente en la presente memoria.

Un alimento, composición alimenticia, formulación nutracéutica, formulación para enriquecer alimentos, complemento alimenticio y formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención se entiende en la presente memoria que incluye líquidos para consumo humano o animal, es decir, una bebida o refresco. El alimento, composición alimenticia, formulación nutracéutica, formulación para enriquecer alimentos, complemento alimenticio y formulación farmacéutica puede ser un alimento o sustancia alimenticia sólida, semisólida, semilíquida y/o líquida, y en particular puede ser un producto lácteo, tal como un producto lácteo fermentado, que incluye, pero no se limita a yogur, una bebida de yogur, una bebida similar a yogur, un queso o un suero de leche. Dichos alimentos se pueden preparar de una forma conocida de por sí, p. ej., añadiendo una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención a un alimento adecuado o sustancia de calidad alimentaria, en una

cantidad adecuada. Al hacerlo así, la formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención se puede usar de una forma conocida de por sí para preparar dicho alimento o sustancia de calidad alimentaria (fermentado), p. ej., de una forma conocida de por sí para preparar productos lácteos fermentados usando una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención. En dichos métodos, se puede usar una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención además del microorganismo usado normalmente y/o puede sustituir a uno o más o parte del microorganismo usado normalmente. Por ejemplo, en la preparación de productos lácteos fermentados tales como yogur o bebidas de yogur, se puede añadir una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención o usar como parte de un cultivo iniciador o se puede añadir de forma adecuada durante dicha fermentación.

Una formulación farmacéutica (o composición farmacéutica) que comprende una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención puede ser para uso humano o animal en medicina humana y veterinaria, en particular para terapia humana, y comprende al menos una formulación probiótica o una cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptado. El excipiente farmacéuticamente aceptado puede ser cualquiera de los excipientes que conoce el experto en la técnica, tales como un vehículo o diluyente farmacéutico o nutricionalmente aceptable. Se pueden encontrar ejemplos de dicho excipiente adecuado para una formulación farmacéutica descrita en la presente memoria en el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 2ª Edición, (1994), Editado por A Wade y PJ Weller y en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen lactosa, almidón, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol y similares. Los ejemplos de diluyentes adecuados incluyen solución salina, glicerol, agua y mezclas de los mismos.

Un alimento, composición alimenticia, formulación nutracéutica, formulación para enriquecer alimentos, complemento alimenticio y formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención, preferiblemente está presente en un recipiente con un volumen de líquido entre 0,5 y 1000 ml. Por consiguiente, la presente invención proporciona un recipiente para un volumen de líquido entre 0,5 y 1000 ml que comprende un alimento, composición alimenticia, formulación nutracéutica, formulación para enriquecer alimentos, complemento alimenticio y formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

La formulación probiótica de acuerdo con la presente invención y/o una cepa bacteriana probiótica que comprende *Lactobacillus plantarum* TIFN 101, se puede usar convenientemente como un medicamento, preferiblemente para el tratamiento o prevención de la inflamación intestinal.

Por consiguiente, en un tercer aspecto la presente invención proporciona la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y/o una formulación probiótica o una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención, preferiblemente como se define en el primer y/o segundo aspecto de la presente invención, para usar como un medicamento, preferiblemente en el tratamiento o prevención de la inflamación intestinal.

La presente descripción también proporciona un método para el tratamiento de la inflamación intestinal o un método para prevenir la inflamación intestinal, que comprende la administración de la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y/o una formulación probiótica o una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención, preferiblemente como se define en el primer y/o segundo aspecto de la presente invención.

La inflamación intestinal dentro del alcance de la presente invención puede ser cualquier inflamación intestinal conocida por el experto en la técnica, tal como, pero no limitada a la inflamación causada por fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), deportes, ingestión de alcohol, síndrome del intestino irritable, alergia, enfermedad celiaca, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunitarias relacionadas con gastrointestinales tales como la diabetes tipo I.

La formulación probiótica de acuerdo con la presente invención y/o la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención, se pueden usar de forma conveniente para la modulación del sistema inmunitario, en donde la modulación del sistema inmunitario preferiblemente es como se ha descrito previamente en la presente memoria. Por consiguiente, en un cuarto aspecto, la presente invención proporciona la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y/o una formulación probiótica de acuerdo con la presente invención o una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención para usar como un medicamento, que comprende la administración de una cantidad eficaz de la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y/o de la formulación probiótica o una formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención para modular el sistema inmunitario, en donde la modulación del sistema inmunitario preferiblemente es como se ha descrito antes.

La presente descripción también proporciona un método de modulación del sistema inmunitario de un sujeto que padece inflamación intestinal, que comprende la administración a dicho sujeto de una cantidad eficaz de la cepa bacteriana probiótica de acuerdo con la presente invención y/o una cantidad eficaz de una formulación probiótica de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Preferiblemente, en este aspecto de la presente invención, una cantidad eficaz es de aproximadamente $1 \text{ E}+4$, $1 \text{ E}+5$ o $1 \text{ E}+6$ a aproximadamente $1 \text{ E}+8$, $1 \text{ E}+9$, $1 \text{ E}+10$, $1 \text{ E}+11$ o $1 \text{ E}+12$ unidades formadoras de colonia/ml de formulación, más preferiblemente de aproximadamente $1 \times 10 \text{ E}+6$ a aproximadamente $1 \times 10 \text{ E}+12$ unidades formadoras de colonia/ml de formulación. Más preferiblemente, una cantidad eficaz es de $1 \text{ E}+4$, $1 \text{ E}+5$ o $1 \text{ E}+6$ a $1 \text{ E}+8$, $1 \text{ E}+9$, $1 \text{ E}+10$, $1 \text{ E}+11$ o $1 \text{ E}+12$ unidades formadoras de colonia/ml de formulación, incluso más preferiblemente de $1 \times 10 \text{ E}+6$ a $1 \times 10 \text{ E}+12$ unidades formadoras de colonia/ml de formulación.

Preferiblemente, la modulación del sistema inmunitario de acuerdo con este aspecto comprende el mantenimiento y/o reactivación de una respuesta inmunitaria surgida por una inmunización previa y/o potenciar los linfocitos T de memoria generadas previamente por inmunización, como se ha descrito previamente en la presente memoria.

- 10 Para identificar y demostrar los efectos de productos inmunomoduladores como se describen en los aspectos previos de la presente invención, se presentan en la presente memoria biomarcadores y ensayos adecuados.

Se proporciona un método para detectar una respuesta a un agente que comprende:

a. estimular PBMC de una muestra de un sujeto con al menos un antígeno,

b. identificar una subpoblación de PBMC,

- 15 c. comparar los datos de (b) con los datos de una muestra de referencia, por lo demás preferiblemente ensayada de modo idéntico, cuya muestra de referencia no se ha estimulado con al menos un antígeno de (a),

en donde una diferencia en los datos identificados en (c) es una medición para una respuesta al agente. El método se menciona en la presente memoria como un ensayo o un método como se presenta en la presente memoria. Un ensayo como se presenta en la presente memoria preferiblemente implica citometría de flujo y preferiblemente es un ensayo de separación o barrido de células activadas por fluorescencia (FACS). FACS (véase, p. ej., The Molecular Probes Handbook. A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies (I. Johnson y M. Spence (eds.) 11^a Edición, Life Technologies, 2010) es un método por el cual las células individuales de una muestra se analizan y separan según sus propiedades ópticas (es decir, absorbancia de la luz, dispersión de la luz, propiedades de fluorescencia, etc.) cuando pasan en una corriente estrecha en una sola fila a través de un haz láser. El separador de células activadas por fluorescencia se inventó a finales de la década de 1960 por Bonner, Sweet, Hulett, Herzenberg, y otros para llevar a cabo la citometría de flujo y separación celular de células viables. Becton Dickinson Immunocytometry Systems introdujo las máquinas comerciales a principios de la década de 1970. La separación de células activadas por fluorescencia (FACS) es un tipo especializado de citometría de flujo. Proporciona un método para la separación de una mezcla heterogénea de células biológicas en dos o más recipientes, una célula cada vez, basado en características de dispersión de la luz y fluorescentes específicas de cada célula. Es un instrumento científico útil, puesto que proporciona el registro rápido, objetivo y cuantitativo de señales fluorescentes de células individuales, así como la separación física de células de interés particular.

La suspensión de células es arrastrada al centro de una corriente de líquido estrecha que fluye rápidamente. El flujo se dispone de modo que hay una gran separación entre células con respecto a su diámetro. Un mecanismo de vibración hace que la corriente de células se rompa en gotitas individuales. El sistema se ajusta de modo que hay una probabilidad baja de más de una célula por gotita. Justo antes de que la corriente se rompa en gotitas, el flujo pasa a través de una estación que mide la fluorescencia donde se mide el carácter fluorescente de interés de cada célula. Se coloca un anillo de carga eléctrica justo en el punto donde la corriente se rompe en gotitas. Se pone una carga en el anillo basado en la medición de intensidad de fluorescencia inmediatamente anterior, y se atrapa la carga opuesta en la gotita cuando se rompe de la corriente. Después las gotitas cargadas caen a través de un sistema de desviación electrostática que desvía las gotitas en recipientes en función de su carga. En algunos sistemas, la carga se aplica directamente a la corriente, y la gotita que se rompe retiene la carga del mismo signo que la corriente. Después la corriente se devuelve a la neutralidad después de que las gotitas se rompan.

Se puede usar una amplia variedad de fluoróforos como marcadores para citometría de flujo. Los fluoróforos, o simplemente "fluoros", típicamente se unen a un anticuerpo que reconoce una característica objetivo sobre o en la célula; también se pueden unir a una entidad química con afinidad por la membrana celular u otra estructura celular. Cada fluoróforo tiene una longitud de onda de excitación y emisión máxima características, y los espectros de emisión a menudo se solapan. Por consiguiente, la combinación de marcadores que se puede usar depende de la longitud de onda de la o las lámparas o láseres para excitar los fluorocromos y en los detectores disponibles. La separación de células activada por fluorescencia proporciona un medio rápido de aislamiento de números grandes de células marcadas por fluorescencia de una mezcla heterogénea de células.

La detección positiva de una respuesta a un agente en un ensayo de citometría de flujo como se ha descrito aquí antes, preferiblemente se basa en la diferencia, preferiblemente diferencia cuantitativa, de una subpoblación específica de PBMC entre una muestra estimulada con un antígeno comparado con una muestra de referencia no estimulada con dicho antígeno, como se ha descrito aquí antes.

Un experto en la técnica conoce bien los ensayos de estimulación y el uso de FACS como herramienta para la lectura. Preferiblemente, los ensayos descritos en los ejemplos se usan en un método como se presenta en la presente memoria.

5 Preferiblemente, la diferencia es un aumento o mantenimiento de la cantidad de la subpoblación de PBMC específica. En el caso de que la subpoblación no cambie en una muestra de referencia no estimulada, la diferencia preferiblemente es un aumento en la cantidad de la subpoblación específica de PBMC en la muestra estimulada. En el caso de que la subpoblación no cambie en la muestra de referencia no estimulada, la diferencia es preferiblemente el mantenimiento (sin cambio) o un aumento en la cantidad de la subpoblación de PBMC específica en la muestra estimulada.

10 Preferiblemente, la subpoblación es una población seleccionada del grupo que consiste en células CD3+/CD4+ (linfocitos T auxiliares), CD3+/CD4+/CD45RO- (linfocitos T auxiliares naïve), células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), CD3+/CD8+/CD45RO- (células CD8+ naïve), CD3+/CD8+/CD45RO+ (linfocitos T CD8+ de memoria), CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria CD8+ activados), células
15 CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores).

Más preferiblemente la subpoblación es una población de CD45RO+ específica de antígeno, preferiblemente seleccionada de células CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), células CD3+/CD8+/CD45RO+ (linfocitos T de memoria CD8+), células CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria activados), células
20 CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores). Las subpoblaciones más preferidas son células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), y células CD3+/CD4+/CD45RO+ que producen IFN γ y/o IL17 (linfocitos T auxiliares de memoria que producen IFN γ y/o IL17).

25 Preferiblemente, en un ensayo como se presenta en la presente memoria, la respuesta es una respuesta inmunitaria, preferiblemente la modulación de una respuesta inmunitaria existente, más preferiblemente un aumento de una respuesta inmunitaria existente, siendo dicha respuesta inmunitaria existente preferiblemente como se ha descrito previamente en la presente memoria.

30 Preferiblemente, en un método como se presenta en la presente memoria, el agente es un producto alimenticio, preferiblemente un probiótico, más preferiblemente el agente o parte del mismo comprende una membrana de un probiótico. Preferiblemente, en un método como se presenta en la presente memoria, la muestra comprende un fluido corporal; preferiblemente la muestra es una muestra de sangre.

Una muestra de sangre en el contexto de la presente descripción preferiblemente es una muestra de sangre entera o una subpoblación de células de sangre entera. Las subpoblaciones de células de sangre entera incluyen, pero no se limitan a PBMC o una subpoblación de las mismas tales como linfocitos, monocitos o macrófagos. Las PBMC son
35 un componente crítico del sistema inmunitario para luchar contra la infección y adaptarse a intrusos.

Preferiblemente, en un método como se presenta en la presente memoria, el al menos un antígeno en (a) se selecciona del grupo que consiste en un estimulador de linfocitos T general tal como un superantígeno, un estimulador de proteína quinasa A (PKA) tal como una lectina, un antígeno de recuerdo, es decir, un antígeno que el individuo obtuvo previamente, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en toxina tetánica, antígeno de la hepatitis B y gripe, o el agente o una parte del mismo.
40

Preferiblemente, en un método como se presenta en la presente memoria, el al menos un antígeno de (a) comprende al menos:

a. un antígeno de recuerdo tal como una toxina tetánica, un antígeno de la hepatitis B o un antígeno de la gripe, y

45 b. el agente o una parte del mismo.

Preferiblemente, en un método presentado en la presente memoria, la subpoblación es una población seleccionada del grupo que consiste en CD3+/CD4+ (linfocitos T auxiliares), CD3+/CD4+/CD45RO- (linfocitos T auxiliares naïve), células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), CD3+/CD8+/CD45RO- (células CD8+ naïve), CD3+/CD8+/CD45RO+ (linfocitos T CD8+ de memoria), CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria CD8+ activados), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores).
50

Más preferiblemente la subpoblación es una población de CD45RO+ específica de antígeno, preferiblemente seleccionada de células CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), células CD3+/CD8+/CD45RO+
55

(linfocitos T de memoria CD8+), células CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria activados), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores). Las subpoblaciones más preferidas son células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), y células CD3+/CD4+/CD45RO+ que producen IFN γ y/o IL17 (linfocitos T auxiliares que producen IFN γ y/o IL17).

Preferiblemente, en un método como se presenta en la presente memoria, la identificación de la subpoblación de PBMC comprende análisis por citometría de flujo como se ha descrito aquí antes; preferiblemente la identificación de la subpoblación de PBMC comprende cuantificación. La cuantificación en un ensayo como se presenta en la presente memoria, preferiblemente se refiere a determinar el porcentaje de una o más subpoblaciones de PBMC, preferiblemente de al menos una subpoblación seleccionada del grupo que consiste en CD3+/CD4+ (linfocitos T auxiliares), CD3+/CD4+/CD45RO- (linfocitos T auxiliares naïve), células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), CD3+/CD8+/CD45RO- (células CD8+ naïve), CD3+/CD8+/CD45RO+ (linfocitos T de memoria CD8+), CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria CD8+ activados), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores).

Más preferiblemente la subpoblación es una población de CD45RO+ específica de antígeno, preferiblemente seleccionada de células CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), células CD3+/CD8+/CD45RO+ (linfocitos T de memoria CD8+), células CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria activados), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores). Las subpoblaciones más preferidas son células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), y células CD3+/CD4+/CD45RO+ que producen IFN γ y/o IL17 (linfocitos T auxiliares que producen IFN γ y/o IL17).

Se proporciona además el uso de una subpoblación de PBMC como un biomarcador para ensayar la eficacia de agentes inmunomoduladores. El término biomarcador (o marcador biológico) se refiere a una característica bioquímica, genética o molecular o sustancia que es un indicador de una condición o proceso biológico. En el contexto de la presente descripción se usa una subpoblación de PBMC como se define en la presente memoria como biomarcador.

Preferiblemente, el agente inmunomodulador es un producto alimenticio, preferiblemente un probiótico tal como se ha descrito previamente en la presente memoria. Preferiblemente, la subpoblación de PBMC es una como se ha descrito previamente en la presente memoria; preferiblemente, la subpoblación es una población seleccionada del grupo que consiste en CD3+/CD4+ (linfocitos T auxiliares), CD3+/CD4+/CD45RO- (linfocitos T auxiliares naïve), células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), CD3+/CD8+/CD45RO- (células CD8+ naïve), CD3+/CD8+/CD45RO+ (linfocitos T CD8+ de memoria), CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria CD8+ activados), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores).

Más preferiblemente la subpoblación es una población de CD45RO+ específica de antígeno, preferiblemente seleccionada de células CD3+/CD4+/CD45RO+ (linfocitos T auxiliares de memoria), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T auxiliares de memoria activados), células CD3+/CD8+/CD45RO+ (linfocitos T de memoria CD8+), células CD3+/CD8+/CD45RO+/CD69+ (linfocitos T de memoria activados), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7+/CD62L+ (linfocitos T auxiliares de memoria centrales), células CD3+/CD4+/CD45RO+/CCR7-/CD62L- (linfocitos T auxiliares de memoria efectores). Las subpoblaciones más preferidas son células CD3+/CD4+/Foxp3+ (linfocitos T auxiliares Foxp3+), y células CD3+/CD4+/CD45RO+ que producen IFN γ y/o IL17 (linfocitos T auxiliares que producen IFN γ y/o IL17).

Definiciones

El genoma de *Lactobacillus plantarum* TIFN 101 es el genoma de la cepa depositada con el número CBS 138100 en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 8, 3584 CT Países Bajos. La SEQ ID NO: 175 representa un armazón de 174 cóntigos de TIFN 101 y para el contexto de la presente invención está construido como el genoma preferido de TIFN 101.

La "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico, en la presente memoria se define como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (péptido, polipéptido o proteína) o dos o más secuencias de ácido nucleico (nucleótido, polinucleótido), determinado por comparación de secuencias. En la técnica "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de aminoácidos o nucleótidos, como puede ser el caso cuando se determina la correspondencia entre cadenas de dichas secuencias. Al menos 50% de identidad de secuencia debe ser interpretado como preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y lo más preferiblemente al menos 100% de identidad de secuencia con el genoma de *Lactobacillus plantarum* TIFN 101, o con una secuencia de polinucleótido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 174 o con un polinucleótido que codifica un polipéptido con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 245 - SEQ ID NO: 327. Identidad de

secuencia con una secuencia particular significa preferiblemente identidad de secuencia a lo largo de la longitud entera de dicha secuencia de polipéptido o polinucleótido particular. La información de secuencia proporcionada en la presente memoria no debe interpretarse tan estrechamente como para requerir la inclusión de bases identificadas de forma errónea. El experto en la técnica puede identificar dichas bases identificadas de forma errónea y sabe cómo corregir dichos errores.

La "similitud" entre dos secuencias de aminoácidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un péptido o polipéptido con la secuencia de un segundo péptido o polipéptido. La identidad o similitud se calcula a lo largo de toda la SEQ ID NO como se identifica en la presente memoria. La "identidad" y "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988). Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la mayor correspondencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, p. ej., el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., *Nucleic Acids Research* 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El programa BLAST X está disponible al público en NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). También se puede usar el algoritmo bien conocido de Smith Waterman para determinar la identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Hentikoff y Hentikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919 (1992); Penalización por hueco: 12; y penalización por longitud de hueco: 4. Un programa útil con estos parámetros está disponible al público como el programa "Ogap" de Genetics Computer Group, que se encuentra en Madison, WI. Los parámetros mencionados antes son parámetros por defecto para comparaciones de aminoácidos (junto con no penalización por huecos terminales). Los parámetros preferidos para comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: apareamientos correctos=+10, apareamientos erróneos=0; Penalización por hueco: 50; Penalización por longitud de hueco: 3. Disponible como el programa Gap de Genetics Computer Group, que se encuentra en Madison, Wis. Se han dado antes los parámetros por defecto para comparaciones de ácidos nucleicos.

Opcionalmente, cuando se determina el grado de similitud de aminoácidos, el experto en la técnica puede tener en cuenta también las llamadas sustituciones de aminoácidos "conservadoras", como estará claro para el experto en la técnica. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales con hidroxilo alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones de aminoácidos conservadoras preferidas son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina. Las variantes de sustitución de la secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria son aquellas en las que al menos un resto en las secuencias descritas se ha eliminado y se ha insertado en su lugar un resto diferente. Preferiblemente, el cambio de aminoácido es conservador. Las sustituciones conservadoras preferidas para cada uno de los aminoácidos naturales son como siguen: Ala a ser; Arg a lys; Asn a gln o his; Asp a glu; Cys a ser o ala; Gln a asn; Glu a asp; Gly a pro; His a asn o gln; Ile a leu o val; Leu a ile o val; Lys a arg; gln o glu; Met a leu o ile; Phe a met, leu o tyr; Ser a thr; Thr a ser; Trp a tyr; Tyr a trp o phe; y, Val a ile o leu.

Un polinucleótido se representa por una secuencia de nucleótidos. Un polipéptido se representa por una secuencia de aminoácidos.

En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitante para significar que los ítems que siguen a la palabra están incluidos, pero los ítems no mencionados específicamente no están excluidos. Además, la referencia a un elemento mediante un artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno del elemento, salvo que el contexto requiera

claramente que hay uno y solo uno de los elementos. Por lo tanto, el artículo indefinido "un" o "una" normalmente significa "al menos uno".

La palabra "aproximadamente" o "alrededor" cuando se usa asociado con un valor numérico (p. ej., aproximadamente 10) preferiblemente significa que el valor puede ser el valor dado (de 10) más o menos 0,1% de ese valor.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Efectos de tres cepas de *L. plantarum* en la frecuencia de diferentes poblaciones de linfocitos T CD4+ (a-f) y CD8+ (g-j) en la circulación sistémica (n=9). La significación estadística se calculó usando la prueba t de Student.

Figura 2. Efectos de tres cepas de *L. plantarum* en la frecuencia de linfocitos Th de memoria que producen IL21 (a), IL17 (b), IL4 (c) e IFN γ (d) estimulados con superantígeno (SEB) (n=9). La significación estadística se calculó usando la prueba t de Student.

Figura 3. Efectos de tres cepas de *L. plantarum* en la frecuencia de linfocitos Th de memoria CD45RO+ que producen IL21 (a), IL17 (b), IL4 (c) e IFN γ (d) estimulados con superantígeno B (SEB) de enterotoxina de *Staphylococcus aureus* (n=9). La significación estadística se calculó usando la prueba t de Student.

Figura 4. Efectos de tres cepas de *L. plantarum* en la frecuencia de linfocitos Th CD45RO+ de memoria que produce IL21 (a), IL17(b), IL4(c) e IFN γ (d) estimulados con toxoide tetánico (TT) (n=9). La significación estadística se calculó usando la prueba t de Student.

Figura 5. El diagrama de flujo de análisis de micromatrices (a) y el número de genes únicos que son regulados en la biopsia intestinal de consumidores humanos de tres cepas diferentes de *L. plantarum* (*L. plantarum* WCFS1 (WCFS1), *L. plantarum* CIP104448 (CIP48), *L. plantarum* TIFN 101. Intensidad >20 en al menos 5 matrices, recorrido intercuartílico >0,2, al menos 7 sondas por gen. (b) Diagrama de Venn del número de genes regulados por aumento y (c) regulados por disminución en las biopsias intestinales después de consumir *L. plantarum* e indometacina.

Ejemplos

La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

Salvo que se exponga lo contrario, la práctica de la invención usará métodos convencionales estándar de biología molecular, virología, microbiología o bioquímica. Dichas técnicas se describen en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press; en Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; en Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA*; y en Volúmenes I y II de Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Segunda edición, Academic Press (UK); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait editor); *Nucleic Acid Hybridization* (Hames and Higgins, eds.).

Ejemplo 1 Respuestas inmunitaria y transcriptómica de mucosa humana diferencial a tres cepas probióticas; comprensión de cómo los probióticos contribuyen a la inmunidad en individuos sanos.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Lactobacillus plantarum WCFS1 (Kleerebezem et al., 2003), *Lactobacillus plantarum* CIP104448 (CIP48), y *Lactobacillus plantarum* TIFN 101 se cultivaron a 37°C en medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (Merck). Para obtener cultivos en fase estacionaria, las bacterias se cultivaron durante la noche. Se añadieron maltodextrina y glucosa en una concentración final de 20% y 2% (peso/vol), respectivamente, para obtener las preparaciones bacterianas (WCFS1, 2,6 x 10⁹ UFC; CIP48, 2,4 x 10⁹ UFC; TIFN 101, 5,6 x 10⁹ UFC); los controles de placebo solo contenían los dos azúcares. Los materiales bacterianos y de placebo se prepararon de modo que contenían concentraciones finales de azúcar similares. Se pueden encontrar protocolos detallados para cultivo, recogida, liofilización, almacenamiento y determinación de recuento viable de especies de *Lactobacillus* en Smelt et al. 2012.

Voluntarios e intervenciones

Este estudio fue aprobado por el Comité ético del Hospital Universitario de Maastricht y se llevó a cabo de acuerdo con los principios de la declaración de Helsinki. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito antes de la inclusión en el estudio. Diez voluntarios sanos, 7 mujeres y 3 varones (26,3±10,1 años, BMI de 21,8±2,40 kg/m²), sin antecedentes de síntomas gastrointestinales y sin ninguna forma de medicación, se ensayaron en cuatro ocasiones separadas (tres intervenciones bacterianas y un control de placebo elegidos aleatoriamente) en un estudio cruzado controlado por placebo aleatorizado. Los voluntarios consumieron la dieta habitual durante el

periodo de estudio y se les pidió que cumplimentaran un diario de los síntomas gastrointestinales. Tres días antes de la intervención se tomaron muestras de sangre para obtener los valores iniciales. La noche antes del inicio del periodo de toma de suplementos, los voluntarios ingirieron 75 mg de indometacina. El día de inicio los voluntarios ingirieron otra dosis de 50 mg de indometacina conforme al protocolo establecido previamente para establecer estrés gastrointestinal leve (Troost et al., 2003). Posteriormente, los voluntarios consumieron los suplementos de probiótico o placebo durante un periodo de 7 días durante la comida y durante la cena; *L. plantarum* WCFS1 (2,6¹⁰ unidades formadoras de colonia (ufc) por toma), *L. plantarum* CIP104448 (2,4¹⁰ ufc/toma), *L. plantarum* TIFN 101 (5,9¹⁰ ufc/toma) o placebo. Ninguno de los voluntarios ni de los investigadores sabía que sujeto recibía las cepas de *L. plantarum* o el placebo (estudio con ocultación doble); los viales que contenían bacterias o el control de placebo no eran transparentes. El 7º día, se obtuvieron muestras de tejido de la parte horizontal del duodeno por gastroduodenoscopia flexible estándar a aproximadamente 15 cm distal del píloro. Se eligió la mucosa duodenal ya que esta es el primer segmento intestinal que entra en contacto con las bacterias, minimizando los cambios adaptativos por los cuales pueden pasar los microbios durante el paso por el tracto intestinal. También, el duodeno es fácilmente accesible para la toma de muestra de tejido de mucosa. Finalmente, el duodeno contiene el menor nivel de colonización de microbiota endógena, asegurando que las respuestas medidas son tan específicas como se puedan conseguir. Las intervenciones se llevaron a cabo con un intervalo de 4 semanas para permitir el periodo de lavado y permitir la cicatrización de la región de toma de muestra de la biopsia.

Tinción de células

Las diferentes diluciones de los anticuerpos y otros reactivos usados para la tinción de células se dan en la Tabla 1.

Se recogió sangre en tubos que contenían EDTA y se procesaron para el análisis de FACS. Se usaron los siguientes anticuerpos para la tinción de las subpoblaciones de linfocitos T: anti-CD3 conjugado con Pacific Blue (clon UCHT1; BD Pharmingen), anti-CD8 conjugado con PerCP (clon SK1, Biolegend), anti-CD69 conjugado con APC-Cy7 (clon FN50, BD Pharmingen), anti-FoxP3 conjugado con APC (clon 206D, eBioscience), anti-CD45RO conjugado con biotina (UCHL1, Biolegend) con estreptavidina conjugada con Pacific orange (Invitrogen). Los controles de isotipo se adquirieron en la misma empresa que los anticuerpos y se usaron en la misma dilución que el anticuerpo.

Para la tinción de citoquinas intracelulares de linfocitos T se usó: anti-IL-4 conjugado con PE-Cy7 (MP4-25D2, Biolegend), anti-IL-17A conjugado con Alexa488 (clon eBio64DEC17; eBioscience), anti-IL-21 conjugado con PE (clon eBio3A3-N2; eBioscience), anti-IFN γ conjugado con Alexa700 (clon B27; BD Pharmingen),

Para la tinción de las poblaciones de células NK se usó: anti-CD56 conjugado con APC (clon MEM-188, eBioscience), anti-CD16 conjugado con EFluor450 (clon CB16, eBioscience), anti-CD335 conjugado con PE (clon 9E2, Biolegend), anti-CD161 conjugado con PE-Cy7 (clon HP-3G10, eBioscience) la polarización de linfocitos T se estudió después de tres tipos de estimulaciones de los linfocitos T. Se hizo por (i) estimulación no específica con PMA/Ca²⁺ o superantígeno (SEB) para estudiar si el tratamiento con probióticos influía en la sensibilidad total, por (ii) estimulación con extractos celulares de las cepas específicas de *L. plantarum* con el fin de investigar si eran estimuladas las respuestas inmunitarias específicas contra el probiótico, y (iii) por estimulación con un antígeno contra el cual estaban vacunados todos los voluntarios, el toxoide tetánico (TT) para estudiar la posible estimulación de respuestas de memoria específicas.

Después de la toma de muestra de sangre, se diluyeron 200 μ l de sangre con 200 μ l de RPMI1640 complementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS) y se incubaron con PMA (miristato acetato de forbol; 80 nM Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y Ca²⁺ (4 μ M) (4 h), enterotoxina B de *Staphylococcus aureus* SEB (5 μ g/ml Sigma, Deisenhofen, Alemania) (24 h), TT (toxidoide tetánico; 1,5 Lf/ml) (24 h) o lisados bacterianos (30 μ g/ml) (24 h). La estimulación con lisados bacterianos estaba de acuerdo con la cepa administrada y se llevó a cabo una semana después de tratamiento. Después de la semana de tratamiento con *L. plantarum* WCFS1, las muestras se estimularon con extractos celulares de *L. plantarum* WCFS1; después de la semana de tratamiento con *L. plantarum* CIP104448, las muestras se estimularon con extractos celulares de *L. plantarum* CIP104448; después de la semana de tratamiento con *L. plantarum* TIFN 101, las muestras se estimularon con extractos celulares de *L. plantarum* TIFN 101. Estos extractos celulares se hicieron por congelación-descongelación repetida de los probióticos.

Después de estimulación, los glóbulos rojos se lisaron con cloruro de amonio. Después de lavado (PBS con FCS al 2%), las células se incubaron con diferentes cócteles de anticuerpos.

Tinción para linfocitos T y subconjuntos de linfocitos T: Las células se incubaron con un cóctel de anticuerpos que consistía en anti-CD3, anti-CD8 y anti-CD45RO durante 30 minutos en la oscuridad sobre hielo. Después de lavado con tampón de lavado, las células se incubaron con estreptavidina-Pacific Orange (1:100 Invitrogen) durante 15 minutos sobre hielo. Después de lavado y centrifugación, las células sedimentadas se volvieron a suspender en disolución de fijación/permeabilización (eBioscience, saponina al 0,1% y azida sódica al 0,009%) durante 45 minutos sobre hielo. Después de lavado en disolución Perm (eBioscience), las células se incubaron en suero de ratón durante 15 minutos para evitar la unión no específica, seguido de incubación con la mezcla de anticuerpos contra citoquinas (anti-IL-4, anti-IFN γ , anti-IL-17 y anti-IL21) o una mezcla de citoquinas de isotipo durante 30 minutos sobre

hielo. Después de lavar con la disolución de permeabilización (3 veces) las células se volvieron a suspender en tampón de lavado y se midieron por citometría de flujo en el plazo de 24 h.

Tinción para las células NK: Las células se incubaron con un cóctel de anticuerpos que consistía en anti-CD3, anti-CD16, anti-CD56, anti-CD335 y anti-CD161 (tinción de células NK), o con cóctel de control de isotipos para células NK que consistía en anti-CD3, anti-CD16, anti-CD56 y controles de isotipos para anti-CD335 y CD161 durante 30 minutos en la oscuridad sobre hielo. Después de lavado con tampón de lavado, las células se fijaron en disolución de lisis FACS (BD Biosciences, disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene suero bovino fetal inactivado (FCS) por calor al 2%) durante 30 minutos sobre hielo. Después de lavado, las células se suspendieron en tampón de lavado y se midieron por citometría de flujo en un Becton y Dickinson LSRII en el plazo de 24 h; se registraron al menos 500,000 sucesos por muestra.

Tabla 1 Diluciones de anticuerpos

nº	Reactividad	Isotipo	Marcador	Dilución	Empresa
1A	CD3	mIgG1 (UCTH1)	Pac Blue	1:25	BD 558117
2	CD8	mIgG1 (SK1)	PerCP	1:25	BD 345774
4	IL17A	mIgG1 (eBio64DEC17)	Alexa488	1:25	eBio 53-7179
5	IL21	mIgG1 (eBio3A3-N2)	PE	1:25	eBio 12-7219
6	IFNg	mIgG1 (B27)	Alexa700	1:100	BD 557995
7	CD69	mIgG1 (FN50)	APC-Cy7	1:25	BD 557756
8	FoxP3	mIgG1 (206D)	APC	1:25	eBio 9017-4776-220
9	CD45RO	mIgG2a (UCHL1)	Biotin	1:25	BioLegend 304220
10	Estreptavidina		Pac Orange	1:100	Invitrogen
11	CD3	mIgG1 (UCHT1)	PerCP	1:30	BioLegend 300428
12	CD16	mIgG1 (CB16)	eFluor450	1:10	eBio 48-0168-42
13	CD56	mIgG2a (MEM-188)	APC	1:25	eBio 17-0569-42
14	CD335	mIgG1 (9E2)	PE	1:7.5	BioLegend 331908
15	CD161	mIgG1 (HP-3G10)	PE-Cy7	1:20	eBio 25-1619-42
17	-	IgG1 de ratón	PE	1:62.5	BioLegend 400112
18	-	IgG1 de ratón	PE-Cy7	1:20	eBio 25-4714
20	IL4	rlgG1 (MP4-25D2)	PE-Cy7	1:25	BioLegend 500824

Aislamiento de ARN y micromatriz

El ARN total se aisló de las biopsias de duodeno usando el reactivo Trizol (1 ml) (Invitrogen, Breda, NL). Después el ARN se purificó usando el kit Qiagen RNeasy Micro (Qiagen, Venlo, NL). El ARN se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Isogen Life Science, De Meer, Países Bajos), la calidad del ARN se comprobó usando un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Amsterdam, NL). El ARN se consideró adecuado para la hibridación con matrices solo si las muestras presentaban bandas intactas que correspondían a las subunidades ribosómicas 18S y 28S y no presentaban picos cromosómicos o productos de degradación de ARN.

El ARN total (100 ng) se usó para la síntesis del ADNc transcrito completo usando el kit de expresión Ambion WT (Life Technologies, Bleiswijk, Países Bajos) y posteriormente se marcó usando el kit de marcaje terminal Affymetrix GeneChip WT (Affymetrix, Santa Clara CA). Las muestras se hibridaron con las matrices de genoma completo Affymetrix GeneChip Human Gene 1.1 ST, se lavaron, se tiñeron y se hizo barrido con el instrumento Affymetrix GeneTitan instrument. Se pueden encontrar detalles en el manejo de la matriz en la Guía del Usuario de Affymetrix GeneTitan Instrument para placas de matrices de expresión (P/N 702933 Rev.2).

Análisis de datos de micromatrices

El análisis de las micromatrices se llevó a cabo aplicando MADMAX para el análisis estadístico (Lin et al 2011, *J Integr Bioinform*, PMID 21778530). Se llevó a cabo el control de calidad. Todas las matrices cumplían los criterios. Las sondas en las matrices de Human Gene 1.1 ST se volvieron a definir de acuerdo con Dai et al (2005, *Nucleic Acids Res* PMID 16284200) basado en la base de datos de NCBI Entrez (CDF versión 15.1). De esta forma la matriz de Human Gene 1.1 ST se dirige a 19.682 genes únicos. Los valores de expresión normalizados se obtuvieron de los valores de intensidad brutos usando el algoritmo de procesamiento de análisis de multimatrices robusto disponible en la biblioteca AffyPLM usando los ajustes por defecto (Irizarry et al, *Biostatistics*, 2003, PMID 12925520). Los datos de las micromatrices se filtraron, y se seleccionaron conjuntos de sondas con al menos 5 sondas y valores de expresión mayores de 20 en al menos 5 matrices, y un recorrido intercuartílico >0,2 (escala de log2) a lo largo de las muestras, para el análisis estadístico adicional. Además, se usó un corte de exclusión del recorrido intercuartílico (IQR) de 0,2 para filtrar los genes que no mostraban variación entre las condiciones. Los genes expresados diferencialmente se identificaron usando modelos lineales, aplicando pruebas estadísticas t que implementaban la regularización de Bayes empírica de los errores estándar en la biblioteca limma (Smyth et al.,

2004)). Para ajustar tanto el grado de independencia de varianzas respecto al grado de identidad como la relación entre la varianza y la intensidad de la señal, la prueba estadística t moderada se extendió por un modelo jerárquico Bayesiano para definir una prueba estadística t moderada basada en intensidad (Sartor et al, 2006, BMC Bioinformatics PMID 17177995). Los genes se definieron como significativamente cambiados cuando el valor P era <0,05 para comparaciones de datos emparejados.

Análisis de rutas

Se llevó a cabo el análisis de enriquecimiento para grupos de genes (GSEA; en world wide web: broad.mit.edu/gsea/) usando MADMAX y los grupos de genes con una tasa de descubrimiento falsa (FDR)<0.2 se consideraron significativamente enriquecidos. El GSEA tiene en cuenta el contexto más amplio en el que funcionan los productos génicos, en concreto en redes que interaccionan físicamente tales como rutas bioquímicas, metabólicas o de transducción de señales, y tiene la ventaja de no estar sesgado, porque no se usa etapa de selección de genes (Subramanian et al., 2005. Se identificaron posibles factores de transcripción que tienen una función en la activación e inhibición de genes usando el análisis regulador secuencia arriba en Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

Secuenciación y anotación del genoma

La cepa de *L. plantarum* CIP104448 se obtuvo de la colección de cultivos NIZO (Meijerink et al., 2010). Para la preparación de ADN, se sedimentaron 2 ml de cultivo de toda la noche, se lavaron y se volvieron a suspender en tampón de TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico). Las células se lisaron con lisozima (360 mg/ml) y mutanolisina (140 U/ml) por incubación durante 2 h a 37°C. Posteriormente se añadieron 300 µl de agua y 80 µl de disolución de SDS al 20%. La extracción de ADN se hizo usando fenol/cloroformo (3x). El ADN se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%. Las muestras se trataron con 100 µg/ml de RNasa (Sigma) durante 1 hora a 37°C. Se hicieron bibliotecas de extremos emparejados de ADN con código de barras y se secuenciaron usando la tecnología Illumina (Baseclear Leiden, NL). Las secuencias de cóntigos se sometieron al servidor de anotación automático RAST, que proporcionó el ORF objetivo y anotación automática. Los cóntigos anotados de CIP48 y TIFN 101 se ordenaron comparándolos con el genoma del molde circular de *L. plantarum* WCFS1, y se compararon entre ellos. Los cóntigos/genes que no se correspondían con el genoma de WCFS1 se anotaron con más detalle usando BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Se determinaron grupos ortólogos (OG) en los 3 genomas usando OrthoMCL (www.orthomcl.org/).

Estadística

Los resultados de datos de citometría de flujo se expresan como la media ± error estándar de la media (EEM). La distribución normal de los conjuntos de datos se confirmó por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se usó la prueba t de Student bilateral para determinar cambios en poblaciones de células inmunitarias después del tratamiento con probiótico. Los datos de expresión génica se representan como la media (intervalo). Se usó la prueba U de Mann Whitney bilateral para determinar cambios en perfiles de expresión después del tratamiento probiótico in vivo. Los valores p < 0,05 (*) se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Ensayo humano

Ninguno de los voluntarios experimentó ninguna molestia durante o después del periodo de consumo de 7 días. Antes de empezar el ensayo (día 0) y el día 7, se tomaron muestras de sangre para estudiar el efecto del consumo de probióticos en la polarización de linfocitos T. También el día 7 se tomaron biopsias por gastroduodenoscopia flexible estándar y se aisló el ARN total y se hibridó con micromatrices de expresión de genoma completo. Se llevó a cabo control de calidad de las hibridaciones y análisis de datos primarios de acuerdo con criterios estrictos para asegurar que los datos de matrices eran de la calidad más alta posible.

Respuestas periféricas diferenciales inducidas por *L. plantarum*

Se seleccionaron *L. plantarum* WCFS1, *L. plantarum* CIP104448, y *L. plantarum* TIFN 101 de una serie de 42 cepas de *L. plantarum* individuales, en las que se ensayaron los niveles de IL-10 e IL12 que inducían de las células dendríticas (Meijerink et al., 2010). *L. plantarum* WCFS1 se caracteriza por una relación de IL10/IL12 relativamente baja y se clasifica como proinflamatoria, *L. plantarum* CIP104448, no cambia la relación de IL10/IL12 cuando se comparaba con el control de medio y por lo tanto se clasifica como neutra y *L. plantarum* TIFN 101 induce una relación de IL10/IL12 relativamente alta y por lo tanto se clasifica como antiinflamatoria (Meijerink et al., 2010).

Frecuencias de células después de 6 días de tratamiento con *L. plantarum*

No se observaron diferencias en las frecuencias del porcentaje total de células CD3+, las células CD3+/CD4+ (naïve o de memoria), o las células de memoria CD3-/CD4+ activadas después de tratamiento con cualquiera de las cepas de *L. plantarum*. Sin embargo, el porcentaje de células positivas para CD4+/Foxp3 disminuía significativamente

después del tratamiento con placebo y CIP 48, pero no después del tratamiento con WCFS1 y TIFN 101 (Figura 1a-f). Además, aunque no se encontró un efecto del tratamiento en células naïve o de memoria CD3+/CD8+, las células de memoria activadas disminuían estadísticamente de forma significativa por el tratamiento de CIP48 solo ($P < 0,01$) (Figure 1g-j).

5 El tratamiento no afectaba al número total de células NK o número de NKT. Tampoco había cambio en los porcentajes de los subtipos de células NK (es decir CD56hi y CD56dim), mientras que a la expresión de CD161 (KLRB1), que media la citotoxicidad (Jacobs et al., 2001; Tarazona et al., 2002), tampoco le afectaban los tratamientos con *L. plantarum*.

10 Se estudió la polarización de los linfocitos T después de tres tipos de estimulaciones de los linfocitos T. Se hizo mediante (i) estimulación no específica con PMA/Ca²⁺ o superantígeno (SEB) para estudiar si el tratamiento con *L. plantarum* influía en la sensibilidad total, por (ii) estimulación con extractos celulares de las cepas específicas de *L. plantarum* con el fin de investigar si eran estimuladas respuestas inmunitarias específicas contra *L. plantarum*, y (iii) por estimulación con un antígeno de vacuna (TT) administrado previamente para estudiar la posible estimulación de respuestas de memoria específicas.

15 Después de la estimulación no específica con PMA /ionóforo-Ca o SEB, se estudió el porcentaje de linfocitos Th o linfocitos Th de memoria positivos para IFN γ , IL-4, IL-17 o IL-21. El tratamiento con placebo o las cepas de *L. plantarum* administradas no influía en la producción de citoquinas de la población total de linfocitos Th o de los linfocitos Th de memoria después de estimulación no específica con PMA/ionóforo-Ca (no se muestran los resultados). Aunque después de la estimulación con SEB no se encontraron diferencias en la producción de
20 citoquinas de la población de linfocitos Th total después de tres tratamientos con *L. plantarum* (no se muestran los resultados), se observaron diferencias en la producción de citoquinas de los linfocitos Th de memoria después del tratamiento con *L. plantarum*. Después de estimulación con SEB (figura 2a-d), se observó un menor porcentaje de linfocitos Th de memoria activados que producen IL-17 después de tratamiento con CIP48 y un mayor porcentaje de linfocitos Th de memoria activados que producen IL-17 después de tratamiento con TIFN 101 (figura 2b). Además, el
25 porcentaje de linfocitos Th de memoria activados que producen IFN γ también aumentó después del tratamiento con TIFN 101 (figura 2d).

El tratamiento con cepas de *L. plantarum* también afectó a la producción de citoquinas después de una estimulación más específica por TT (figura 3a-d). Se estudió la producción de citoquinas de linfocitos Th de memoria con el fin de estudiar el efecto del tratamiento con *L. plantarum* en los linfocitos T de memoria. Después del tratamiento con TIFN
30 101, el porcentaje de linfocitos Th de memoria activados que producen IL-17 y el porcentaje de IFN γ aumentó significativamente (figuras 3b y 3d, respectivamente, mientras que no se observaron efectos de las otras *L. plantarum* en la producción de citoquinas de los Th de memoria después de estimulación con TT.

Finalmente, se estimularon las muestras de sangre de los individuos con extractos celulares de la cepa de *L. plantarum* que habían consumido en el estudio (figura 4a-d). Se observó que los sujetos que se trataron con WCFS1 mostraban una mayor respuesta de IL-17 después de estimulación con extractos celulares de WCFS1 (figura 4b).
35 Otras citoquinas no eran afectadas por este tratamiento. No había diferencias en la producción de citoquinas en sujetos cuanto se trataban con CIP48, cuando su sangre se estimulaba con extracto celular de CIP48. Cuando los sujetos se trataban con TIFN 101, sus células de memoria activadas mostraban mayor producción de IL-17 e IFN γ después de estimulación con extracto celular de TIFN 101 (figuras 4 b y d, respectivamente).

40 Respuesta transcripcional diferencial en la mucosa duodenal después de exposición a las tres cepas de *L. plantarum*

Aunque se compararon cepas y no especies diferentes, se encontraron números de genes muy diferentes que eran regulados por aumento o disminución en el intestino estresado de los sujetos expuestos a las tres cepas de *L. plantarum*. Después de tratamiento con las tres cepas, 315 genes eran regulados de forma diferencial con *L. plantarum* WCFS1, 390 con CIP48 y tantos como 779 con TIFN 101 (figura 5a). De estos genes WCFS1 compartía
45 solo 35 genes regulados por aumento con CIP48 y 9 con TIFN 101 (figura 5b). 19 genes adicionales eran regulados por disminución cuando se comparaba CIP48 con WCFS1 y otros 5 con TIFN 101 (figura 5c). Los genes compartidos estaban implicados principalmente en funciones celulares y metabolismo. Como se esperaba, en un intestino estresado por indometacina, también en los controles tratados con placebo, la expresión de muchos genes asociados con la reparación celular era regulada por aumento. Para obtener un mayor conocimiento de los cambios
50 inducidos por el tratamiento con *L. plantarum*, los genes posteriormente se clasificaron de acuerdo con el cambio medio en la expresión. En las tablas 2-3 se dan los 10 genes inducidos más altos y los 10 inducidos más bajos. WCFS1 y CIP48 compartían la regulación por disminución de 6 ARN nucleares pequeños (ARNsno), es decir ARNsno, (H)C/D(ACA) box 6, 14b, 53, 57, 60, 388.

TIFN 101 producía un perfil completamente diferente (tabla 4). De los genes con mayor inducción en TIFN 101 (la *L. plantarum* inmunológicamente más activa), 8 de los 10 están relacionados con la inmunidad, estos son la inmunoglobulina lambda variable 6-57, proteína similar a 6 que contiene dominio de inmunoglobulina y conjunto V
55 putativo, inmunoglobulina lambda variable 7-46, factor regulador de interferón 4, familia de GDNF, CD27, CD79a y activador de plasminógeno.

Basado en los datos inmunitarios, se esperaba encontrar cambios diferenciales por factores de transcripción específicos. Para identificar estos factores de transcripción e identificar las rutas reguladas por las diferentes cepas, se llevó a cabo el Ingenuity Pathway Analysis (IPA). IPA usa información de la bibliografía combinada con cambios en la expresión de genes para predecir una función de los factores de transcripción en el conjunto de datos. TIFN 101 inducía más cambios que CIP48 y WCFS1 en el intestino estresado por AINE. El conjunto más significativo de genes objetivo en el grupo de TIFN 101 eran los genes relacionados con inmunología. TIFN 101 regulaba por aumento MHC-II α mientras que con CIP48 y WCFS1 se encontró una regulación por disminución de MHC-II β . Esto puede explicar las respuestas potenciadas contra antígenos tales como TT en el grupo tratado con TIFN 101. Otra ruta que puede contribuir a las respuestas potenciadas en TIFN 101 es la regulación por aumento de genes implicados en la extravasación de leucocitos. Una observación interesante es que TIFN 101 potencia RAPL que es una GTPasa implicada en la regulación de la afinidad de integrina y que potencia la adhesión de leucocitos. Simultáneamente una regulación por aumento de moléculas de adhesión esenciales tales como ICAM-1 y cadherina 5 (CDH-5) era regulada por aumento, ilustrando la regulación por aumento de las rutas de migración de células inmunitarias por TIFN 101. También con CIP48 y WCFS1 se observó algo de regulación de la extravasación de leucocitos, pero esta era mucho menos pronunciada que para el grupo de TIFN 101.

Perfiles de expresión de genes diferenciales entre las tres cepas de *L. plantarum*

Debido a los diferentes efectos de las tres cepas de *L. plantarum*, *L. plantarum* CIP 104448 y *L. plantarum* TIFN 101 se secuenciaron, anotaron y compararon con el genoma (cromosoma y plásmidos) de *L. plantarum* WCFS1 (Siezen et al., 2012). Se asignaron un total de 3010 grupos ortólogos (OG) al cromosoma basado en este ordenamiento de cóntigos respecto al genoma de WCFS1 molde. Los tres genomas compartían 2455 de los 3010 OG cromosómicos (=81,5%), que se define como el genoma nuclear para este estudio. Los genes únicos en TIFN 101 se dan en la tabla 5. Cuando se incluyen los cóntigos y OG/genos que no se corresponden con el cromosoma de WCFS1, se encuentra un número mucho mayor de genes únicos para los genomas de CIP48 y TIFN 101. Muchos de los genes únicos en TIFN 101 están en plásmidos (véase la tabla 5). El análisis, p. ej., puso de manifiesto que *L. plantarum* CIP 104448 carece del grupo de genes de biosíntesis de plantaricina completo (y un conjunto grande de genes adyacente a este grupo (es decir OG 334-348) y el grupo de genes entero para la biosíntesis de EPS. *L. plantarum* TIFN 101 carece de algunos genes asociados con la biosíntesis de plantaricina así como de genes para la biosíntesis de exopolisacáridos, muchos casetes de uso de azúcares y dos proteínas grandes de unión a moco ancladas a LPXTG.

Tabla 2. Los diez genes más regulados por aumento y por disminución en el intestino humano estresado por AINE después del consumo de *L. plantarum* WCFS1 (WCFS1).

10 superiores: Genes regulados por aumento placebo frente a WCFS1	Nombre del gen	Valor p de IBMT	Número de veces medio frente a control
Miembro de la familia de kinesina 20B	KIF20B	0,01	1,34
microARN 186	MIR186	0,03	1,31
activador de guanilato ciclasa 2A (guanilina)	GUCA2A	0,04	1,31
integrina, alfa 4 (antígeno CD49D, subunidad alfa 4 del receptor VLA-4)	ITGA4	0,01	1,31
proteína centrómero E, 312 kDa	CENPE	0,05	1,30
factor de transcripción 1 de homeodominio putativo	PHTF1	0,00	1,30
subunidad 2 del complejo asociado con huso y cinetocoro	SKA2	0,01	1,29
subfamilia D del receptor similar a lectina de linfocitos citolíticos, miembro 1	KLRD1	0,00	1,29
receptor A del ácido gamma-aminobutírico (GABA), alfa 2	GABRA2	0,02	1,27
regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa	RPGR	0,01	1,27
10 superiores: Genes regulados por disminución placebo frente a WCFS1			
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 16A	SNORA16A	0,02	-1,35
ARN nucleolar pequeño, C/D box 53	SNORD53	0,04	-1,36
contactina 3 (asociado a plasmacitoma)	CNTN3	0,00	-1,38
ARN nucleolar pequeño, C/D box 6	SNORD6	0,04	-1,39
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 57	SNORA57	0,00	-1,44
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 60	SNORA60	0,00	-1,44
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 14A	SNORA14A	0,03	-1,49
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 38B (retrotranspuesto)	SNORA38B	0,01	-1,58
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 14B	SNORA14B	0,01	-1,58
ARN 4 específico de cuerpo de Cajal pequeño	SNORA16A	0,01	-1,72

Tabla 3. Los diez genes más regulados por aumento y por disminución en el intestino humano estresado por AINE después del consumo de *L. plantarum* CIP104448 (CIP48).

10 superiores: Genes regulados por aumento placebo frente a CIP48	Nombre del gen	Valor p de IBMT	Número de veces medio frente a control
dominio superenrollado que contiene 59	CCDC59	0,01	1,33
familia 1 de aldehído deshidrogenasa, miembro L2	ALDH1L2	0,03	1,32
KIAA0125	KIAA0125	0,00	1,31
fosfolipasa C, beta 4	PLCB4	0,01	1,31
dominio superenrollado que contiene 102B	CCDC102B	0,04	1,29
Proteína 3 liberadora de guanilo RAS (regulada por calcio y DAG)	RASGRP3	0,03	1,28
contiene dominio de peptidasa asociado con regeneración muscular 1	PAMR1	0,00	1,28
Contiene dominio DEP 1	DEPDC1	0,01	1,28
fosfolipasa A2, grupo IIA (plaquetas, líquido sinovial)	PLA2G2A	0,02	1,28
sulfato de heparán (glucosamina) 3-O-sulfotransferasa 3B1	HS3ST3B1	0,04	1,28
10 superiores: Genes regulados por disminución placebo frente a CIP48			
canal de potasio, subfamilia K, miembro 15	KCNK15	0,05	-1,33
canal catiónico receptor de potencial transitorio, subfamilia V, miembro 6	TRPV6	0,01	-1,33
ARN 282 no codificante de proteína intergénica larga	LINC00282	0,03	-1,35
efrina-A1	EFNA1	0,02	-1,38
metalo peptidasa de la matriz 10 (estromelisin 2)	MMP10	0,05	-1,41
similar a angiopoietina 4	ANGPTL4	0,03	-1,47
hemo-oxigenasa (apertura de ciclo) 1	HMOX1	0,00	-1,50
factor nuclear, regulado por interleuquina 3	NFIL3	0,01	-1,52
contiene dominio de superfamilia de facilitadores principales 2A	MFSD2A	0,02	-1,59
glucosa-6-fosfatasa, subunidad catalítica	G6PC	0,02	-1,65

Tabla 4. Los diez genes más regulados por aumento y por disminución en el intestino humano estresado por AINE después del consumo de *L. plantarum* TIFN 101

10 superiores: Genes regulados por aumento placebo frente a TIFN 101	Nombre del gen	Valor p de IBMT	Número de veces medio frente a control
inmunoglobulina lambda variable 6-57	IGLV6-57	0,01	1,63
proteína similar a 6 que contiene dominio de inmunoglobulina y conjunto V putativo	LOC642131	0,00	1,55
inmunoglobulina lambda variable 7-46 (gen/pseudogén)	IGLV7-46	0,04	1,48
sulfato de heparán (glucosamina) 3-O-sulfotransferasa 3B1	HS3ST3B1	0,00	1,41
factor 4 regulador de interferón	IRF4	0,00	1,40
Receptor alfa 2 de familia de GDNF	GFRA2	0,00	1,40
Molécula CD27	CD27	0,01	1,40
Molécula CD79a, alfa asociada a inmunoglobulina	CD79A	0,03	1,38
activador de plasminógeno, tejido	PLAT	0,00	1,37
Familia de dominios similares a Der1, miembro 3	DERL3	0,00	1,37
10 superiores: Genes regulados por disminución placebo frente a TIFN 101			
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 38B (retrotranspuesto)	SNORA38B	0,04	-1,40
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 21	SNORA21	0,03	-1,40
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 60	SNORA60	0,01	-1,41
ARN nucleolar pequeño, C/D box 53	SNORD53	0,01	-1,43
efrina-A1	EFNA1	0,00	-1,45
ARN nucleolar pequeño, C/D box 6	SNORD6	0,02	-1,46
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 57	SNORA57	0,00	-1,47
ARN nucleolar pequeño, H/ACA box 14B	SNORA14B	0,00	-1,73
familia con similitud de secuencia 5, miembro C	FAM5C	0,03	-1,97
ARN 4 específico de cuerpo de Cajal pequeño	SCARNA4	0,00	-2,00

Tabla 5. Resumen de los cóntigos/grupos de genes/genes únicos en *L. plantarum* TIFN 101; los números de identidad de secuencia se representan en la columna 3, la primera SEQ ID NO representa la secuencia de polinucleótido, la segunda SEQ ID NO representa el polipéptido codificado [polinucleótido; polipéptido].

OG	Funciones que contiene	SEQ ID NO:
cromosoma		
185	Transportador de la familia MFS	176; 260
186	fumarato reductasa/succinato deshidrogenasa flavoproteína	177; 261
187	Regulador de transcripción, familia AraC	178; 262
382	sistema toxina-antitoxina, componente antitoxina MazE, familia AbrB	179; 263
383	sistema toxina-antitoxina, componente toxina MazF, familia PemK	180; 264
409	Proteína hipotética	181; 265
410	Proteína de repetición de anquirina conservada, putativa	182; 266
411	proteína de membrana integral	183; 267
461	transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína de unión a sustrato	184; 268
462	transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína permeasa	185; 269
463	transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato, proteína de unión a ATP	186; 270
1197	ADP-ribosilglicohidrolasa	187; 271
1986	proteína de resistencia de bacteriófagos de infección abortiva	188; 272
2366	hidrolasa de pared celular, familia de glicosil hidrolasa 25	189; 273
2549	proteínasa de membrana PrsW, regulador del factor anti-sigma	190; 274
2583	proteína de membrana hipotética, familia YfhO	191; 275
2610	Fructoquinasa (EC 2.7.1.4)	192; 276
2611	glicosil hidrolasa, familia 38	193; 277
2612	Sistema PTS, componente IIC	194; 278
2613	Sistema PTS, componente IIBC específico de fructosa (EC 2.7.1.69)	195; 279
2614	(EC 2.7.1.69) / Sistema PTS, componente IIC específico de fructosa (EC 2.7.1.69)	196; 280
2615	Antiterminador de transcripción, familia BglG	197; 281
en plásmidos putativos		
3299	hidrolasa, superfamilia HD, extremo C	198; 282
3300	Proteína de reducción de ribonucleótido NrdI	199; 283
3301	Ribonucleótido reductasa de clase Ib (aeróbico), subunidad alfa (EC 1.17.4.1)	200; 284
3302	Ribonucleótido reductasa de clase Ib (aeróbico), subunidad beta (EC 1.17.4.1)	201; 285
3303	Ribonucleótido reductasa de clase Ib (aeróbico), subunidad beta (EC 1.17.4.1)	202; 286
3304	transposasa, fragmento	203; 287
3305	Recombinasa específica de sitio, ADN invertasa P en proteína relacionada	204; 288
3306	proteína de membrana con dominios DUF161 y DUF2179, familia YitT	205; 289
3307	Antitransportador de Na(+)/H(+)	206; 290
3308	Proteína de la familia de canales de cloruro regulados por voltaje	207; 291
3323	Proteína de captación de glucosa	208; 292
3324	Manosa-6-fosfato isomerasa	209; 293
3325	proteína hipotética, extremo C	210; 294
3326	proteína hipotética	211; 295
3327	Glutamina sintetasa tipo I (EC 6.3.1.2)	212; 296
3328	transposasa	213; 297
3329	sistema toxina-antitoxina, componente toxina, familia PemK/MazF	214; 298
3330	sistema toxina-antitoxina, componente antitoxina, familia PemI/MazE	215; 299
3331	integrasa/recombinasa	216; 300
3332	proteína hipotética, extremo C	217; 301
3333	proteína hipotética	218; 302
3334	Proteína de choque de frío CspA	219; 303
3335	sistema toxina-antitoxina, familia RelE/StbE: proteína de replicación RepA	220; 304
3336	proteína hipotética	221; 305
3337	Regulador transcripcional, familia PBSX/Xre	222; 306
3338	proteína hipotética	223; 307
3339	integrasa/recombinasa	224; 308
3340	sistema toxina-antitoxina, componente antitoxina, familia Phd YefM	225; 309
3341	sistema toxina-antitoxina, componente toxina, familia RelE/StbE	226; 310
3342	proteína hipotética	227; 311
3343	proteína hipotética	228; 312
3344	ISEf1, transposasa	229; 313

OG	Funciones que contiene	SEQ ID NO:
3345	proteína de membrana hipotética	230; 314
3346	proteína hipotética, extremo N	231; 315
3347	Proteína de replicación RepA	232; 316
3348	proteína hipotética	233; 317
3349	Transposasa IS66	234; 318
3350	Transposasa IS66, extremo N	235; 319
3351	Transposasa IS66, extremo C	236; 320
3352	Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa	237; 321
3353	Proteína similar a LtrC	238; 322
3354	Facilitador principal: Antitransportador de oxalato:formiato	239; 323
3355	Proteína de familia de transposasa IS3/IS911	240; 324
3356	Parólogo de subunidad A de excinucleasa ABC	241; 325
3357	recombinasa específica de sitio	242; 326
3358	Proteína de ensamblaje del grupo hierro-azufre SufB, permeasa, extremo C	243; 327
3359	Proteína de membrana, familia MarC	244; 328
3360	peptidasa E	245; 329
3361	proteína hipotética	246; 330
3362	FIG00742910: proteína hipotética	247; 331
3363	Proteína de choque alcalino, familia de Asp23	248; 332
3364	proteína de membrana hipotética	249; 333
3365	proteína hipotética	250; 334
3366-3371	FIG00753329: proteína hipotética, extremo N	251; 335
3367	FIG00742586: proteína hipotética	252; 336
3368	Proteína iniciadora de la replicación, extremo C	253; 337
3369	Proteína iniciadora de la replicación, extremo N	254; 338
3370	proteína hipotética	255; 339
3371	ATPasa de partición de plásmido ParA	256; 340

Discusión

- Este estudio se llevó a cabo para investigar si las cepas de *L. plantarum* seleccionadas in vitro según su capacidad inmunoestimuladora diferencial, tienen diferente impacto en la inmunidad local y sistémica en individuos sanos que sufren un factor estresante leve de la inmunidad intestinal encontrado habitualmente. Las tres cepas tenían un efecto en la inmunidad, pero este efecto dependía mucho de la cepa y puede no ser beneficioso en ciertos contextos. Basándose en los resultados obtenidos por la estimulación de células dendríticas con cepas de *L. plantarum* in vitro, se consideró que las propiedades inmunitarias de la cepa WCFS1 eran proinflamatorias, de *L. plantarum* CIP104448 neutras y de *L. plantarum* TIFN 101 reguladoras. Sin embargo, las respuestas inmunitarias de estas cepas in vivo eran muy diferentes a las previstas in vitro. El consumo de AINE inducía la reducción en células reguladoras CD4+/Foxp3 pero se prevenía por la administración de WCFS1 y TIFN 101, lo cual debe considerarse que es un efecto regulador beneficioso. CIP48 no prevenía la reducción inducida por AINE de linfocitos T CD4+/Foxp3 y tenía más efectos negativos. CIP48 reducía el número de células de memoria sugiriendo un efecto de empeoramiento, proinflamatorio del consumo de esta bacteria.
- Se estudió la polarización de los linfocitos T después de diferentes estímulos para aumentar el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales las bacterias pueden influir en la inmunidad. Una hipótesis que tenían los autores de la invención era que los componentes de la pared bacteriana pueden inducir respuestas inmunitarias (Smelt et al., 2012) y potenciar la inmunidad sistémica como efecto de vecindad. Sin embargo, se tuvo que rechazar esta hipótesis como el único mecanismo responsable, ya que solo WCFS1 mostraba una tendencia a elevar la producción de IL17 después de estimulación con la cepa bacteriana de la sangre entera de los consumidores de WCSF1. El estimulador de inmunidad más marcado, es decir TIFN 101, no mostró respuesta al extracto bacteriano, pero potenció las respuestas contra antígenos patógenos específicos tales como SEB y contra TT.
- El análisis del transcriptoma de la mucosa sugería que la respuesta de memoria potenciada está relacionada con la regulación por aumento de TIFN 101 mejorada de procesos asociados con la función de linfocitos T y B y presentación de antígeno. TIFN 101 a diferencia de las otras bacterias tenía un efecto marcado en las rutas relacionadas inmunológicas en la mucosa de los consumidores. En particular TIFN 101 mejoraba las rutas y genes relacionados con la presentación de antígeno. TIFN 101 tenía un efecto marcado en la regulación por aumento de CD27 que es necesario para generar y mantener a largo plazo la inmunidad de linfocitos T (Huang et al., 2013). TIFN 101 también mejoraba la expresión de MHC-II α en la mucosa y de moléculas reguladoras clave tales como RAPL. RAPL aumenta la afinidad por la integrina y la adhesión de linfocitos T (Raab et al., 2010; Zhang y Wang, 2012). Estas observaciones en la mucosa pueden explicar las respuestas de linfocitos T de memoria mejores observadas en los consumidores de TIFN 101. También mejoraba la inmunidad de linfocitos B en la mucosa como

se ilustra por la regulación por aumento de los genes reguladores de inmunoglobulina y por CD79a. CD79A se conoce también como una proteína de cadena alfa asociada al complejo receptor de antígeno de linfocito B que forma junto con la proteína CD79b el receptor de antígeno de linfocitos B (Herren y Burrows, 2002). CIP48 y WCFS1 no tenían estos efectos o no regulaban por disminución procesos tales como la presentación de antígeno en la mucosa.

La observación de que las bacterias pueden regular por disminución los ARNsno en el intestino, según el conocimiento de los autores de la invención, no se había descrito antes. Los ARNsno son ARN no codificante metabólicamente estables que se asocian con un conjunto de proteínas para formar las RNP nucleolares pequeñas (RNPsno). La mayoría de los ARNsno funcionan como ARN guía en la síntesis postranscripcional de nucleótidos 2'-O-metilados y pseudouridinas en ARNr, ARN nucleares pequeños (ARNsn) y otros ARN celulares, incluyendo ARNm (Bratkovic y Rogelj, 2011; Esteller, 2011; Williams y Farzaneh, 2012). La reducción relativa en ARNsno 53, 57, 60 por CIP48 y WCFS1 sugiere una regulación por disminución de la metilación del ARN ribosómico (Kiss-Laszlo et al., 1996) y regulación por disminución de la pseudouridinilación disminuida 14b de ARN (Kiss et al., 2004). Normalmente esto sugiere una desestabilización de procesos celulares (Su et al., 2014), sugiriendo de nuevo que CIP48 y WCFS1 no son beneficiosas para un entorno intestinal levemente estresado.

Se aplicó la secuenciación genómica de *L. plantarum* CIP 104448 y *L. plantarum* TIFN 101 para identificar posibles grupos de genes que pueden ser responsables de los efectos biológicos diferenciales de las tres cepas de *L. plantarum*. Se encontraron varios cientos de genes de *L. plantarum* nuevos en la cepa CIP48 (340 OG nuevos) y TIFN 101 (177 OG) en comparación con la cepa WCFS1. Solo un pequeño número de estos (47 OG) son compartidos tanto por CIP48 como por TIFN 101. La mayoría de estos genes nuevos parece que están en plásmidos. *L. plantarum* TIFN 101 carece parcialmente de los grupos de biosíntesis de plantaricina. Estos genes se han asociado en estudios previos con diferencias en cepas en la producción de citoquinas (Meijerink et al., 2010; Wells et al., 2011) pero aquí se ha mostrado que no están asociados con efectos inmunitarios in vivo. También *L. plantarum* CIP104448 y *L. plantarum* TIFN 101 carecen de regiones muy grandes del metabolismo de azúcares. Estas adaptaciones se han atribuido a adaptaciones a los factores ambientales que son objetivos interesantes para identificar genes asociados con efectos probióticos (Molenaar et al., 2005). No solo la presencia sino también la ausencia de genes puede mejorar los efectos inmunitarios de bacterias (Smelt et al., 2013b). Este estudio genómico comparativo de qué efectos del aporte complementario de *L. plantarum* en el transcriptoma de la mucosa se combinaban con parámetros de activación inmunitaria sistémica, proporciona muchas indicaciones para el trabajo experimental de seguimiento para identificar genes que son responsables de o están implicados en las diferencias observadas en efectos inmunitarios en el sujeto humano.

Lista de referencias

Belkaid Y, Hand TW. *Role of the microbiota in immunity and inflammation*. Cell 2014;157:121-41. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011.

Cao S, Feehley TJ, Nagler CR. *The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens*. FEBS Lett 2014;1:00312-3.

de Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL. *Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics*. Front Immunol 2014;5:60. eCollection 2014.

Geuking MB, Koller Y, Rupp S, McCoy KD. *The interplay between the gut microbiota and the immune system*. Gut Microbes 2014;5:3.

Walker MM, Talley NJ. *Review article: bacteria and pathogenesis of disease in the upper gastrointestinal tract--beyond the era of Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 2014;39:767-79. doi: 10.1111/apt.12666. Epub 2014 febrero 24.

Meijerink M, van HS, Taverne N, Wels M, de VP, Bron PA, et al. *Identification of genetic loci in Lactobacillus plantarum that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization*. PLoSOne 2010;5:e10632.

Meijerink M, Wells JM, Taverne N, de Zeeuw Brouwer ML, Hilhorst B, Venema K, et al. *Immunomodulatory effects of potential probiotics in a mouse peanut sensitization model*. FEMS Immunol Med Microbiol 2012;65:488-96.

Wells JM, Rossi O, Meijerink M, van BP. *Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface*. ProcNatlAcadSciUSA 2011;108 Suppl 1:4607-14.

van Baarlen P, Troost F, van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, Brummer RJ, et al. *Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:4562-9. doi: 10.1073/pnas.1000079107. Epub 2010 septiembre 7.

- van Baarlen P, Troost FJ, van Hemert S, van der Meer C, de Vos WM, de Groot PJ, et al. *Differential NF-kappaB pathways induction by Lactobacillus plantarum in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:2371-6. doi: 10.1073/pnas.0809919106. Epub 2009 febrero 3.
- 5 van Hemert S, Meijerink M, Molenaar D, Bron PA, de Vos P, Kleerebezem M, Wells JM, Marco ML *Identification of Lactobacillus plantarum genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells* BMC microbiology 2010;10 (1) 293
- Smelt MJ, de Haan BJ, Bron PA, van Swam I, Meijerink M, Wells JM, et al. *The Impact of Lactobacillus plantarum WCFS1 Teichoic Acid D-Alanylation on the Generation of Effector and Regulatory T-cells in Healthy Mice*. PLoS One 2013;8:e63099.
- 10 Smelt MJ, de Haan BJ, Bron PA, van Swam I, Meijerink M, Wells JM, et al. *L. plantarum, L. salivarius, and L. lactis attenuate Th2 responses and increase Treg frequencies in healthy mice in a strain dependent manner*. PLoS One 2012;7:e47244.
- 15 Schoutz I, McKay CM, Graepel R, Phan VC, Wang A, Soderholm J, et al. *Indomethacin-induced translocation of bacteria across enteric epithelia is reactive oxygen species-dependent and reduced by vitamin C*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2012;303:G536-45. doi: 10.1152/ajpgi.00125.2012. Epub 2012 junio 14.
- Deasy A, Read RC. *Challenges for development of meningococcal vaccines in infants and children*. Expert Rev Vaccines 2011;10:335-43. doi: 10.1586/erv.11.3.
- (16) Edwards KM, Berbers GA. *Immune responses to pertussis vaccines and disease*. J Infect Dis 2014;209:S10-5. doi: .1093/infdis/jit560. Epub 2013 Octubre 31.
- 20 Kerneis S, Launay O, Turbelin C, Batteux F, Hanslik T, Boelle PY. *Long-term immune responses to vaccination in HIV-infected patients: a systematic review and meta-analysis*. Clin Infect Dis 2014;58:1130-9. doi: 10.093/cid/cit937. Epub 2014 enero 10.
- Poorolajal J, Mahmoodi M, Haghdoust A, Majdzadeh R, Nasser-Moghaddam S, Ghalichi L, et al. *Booster dose vaccination for preventing hepatitis B*. Cochrane Database Syst Rev 2010:CD008256. doi: 10.1002/14651858.CD008256.pub2.
- 25 Schure RM, Hendriks LH, de Rond LG, Ozturk K, Sanders EA, Berbers GA, et al. *T-cell responses before and after the fifth consecutive acellular pertussis vaccination in 4-year-old Dutch children*. Clin Vaccine Immunol 2012;19:1879-86. doi: 10.128/CVI.00277-12. Epub 2012 septiembre 26.
- 30 Marco, M.L., S. Pavan, y M. Kleerebezem, *Towards understanding molecular modes of probiotic action*. Curr Opin Biotechnol, 2006. 17(2): p. 204-10.
- Corr, S.C., C. Hill, y C.G. Gahan, *Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens*. Adv Food Nutr Res, 2009. 56: p. 1-15.
- Saulnier, D.M.A., et al., *Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods*. Current Opinion in Biotechnology, 2009. 20(2): p. 135-141.
- 35 Saxelin, M., et al., *Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms*. Curr Opin Biotechnol, 2005. 16(2): p. 204-11.
- Ma, D., P. Forsythe, y J. Bienenstock, *Live Lactobacillus reuteri is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression*. Infect Immun, 2004. 72(9): p. 5308-14.
- 40 Gobetti, M., R.D. Cagno, y M. De Angelis, *Functional microorganisms for functional food quality*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2010. 50(8): p. 716-27.
- Smyth et al. 2004, Stat Appl Genet Mol Biol
- Subramanian et al 2005, Proc Natl Acad Sci USA PMID 16199517
- 45 Tarazona, R., J.G. Casado, O. Delarosa, J. Torre-Cisneros, J.L. Villanueva, B. Sanchez, M.D. Galiani, R. Gonzalez, R. Solana, y J. Pena. 2002. *Selective depletion of CD56(dim) NK cell subsets and maintenance of CD56(bright) NK cells in treatment-naive HIV-1-seropositive individuals*. J Clin Immunol 22:176-183.
- Jacobs, R., G. Hintzen, A. Kemper, K. Beul, S. Kempf, G. Behrens, K.W. Sykora, y R.E. Schmidt. 2001. *CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells*. Eur J Immunol 31:3121-3127.
- Siezen, R.J., C. Francke, B. Renckens, J. Boekhorst, M. Wels, M. Kleerebezem, y S.A. van Hijum. 2012. *Complete resequencing and reannotation of the Lactobacillus plantarum WCFS1 genome*. J Bacteriol 194:195-196.

- Huang, J., C. Jochems, A.M. Anderson, T. Talaie, A. Jales, R.A. Madan, J.W. Hodge, K.Y. Tsang, D.J. Liewehr, S.M. Steinberg, J.L. Gulley, y J. Schlom. 2013. *Soluble CD27-pool in humans may contribute to T cell activation and tumor immunity*. J Immunol 190:6250-6258
- 5 Raab, M., H. Wang, Y. Lu, X. Smith, Z. Wu, K. Strebhardt, J.E. Ladbury, y C.E. Rudd. 2010. *T cell receptor "inside-out" pathway via signaling module SKAP1-RapL regulates T cell motility and interactions in lymph nodes*. Immunity 32:541-556.
- Zhang, Y., y H. Wang. 2012. *Integrin signalling and function in immune cells*. Immunology 135:268-275.
- Herren, B., y P.D. Burrows. 2002. *B cell-restricted human mb-1 gene: expression, function, and lineage infidelity*. Immunologic research 26:35-43.
- 10 Bratkovic, T., y B. Rogelj. 2011. *Biology and applications of small nucleolar RNAs*. Cellular and molecular life sciences : CMLS 68:3843-3851.
- Esteller, M. 2011. *Non-coding RNAs in human disease*. Nature reviews. Genetics 12:861-874.
- Williams, G.T., y F. Farzaneh. 2012. *Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer?* Nature reviews. Cancer 12:84-88.
- 15 Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry, J.P. Bachellerie, M. Caizergues-Ferrer, y T. Kiss. 1996. *Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs*. Cell 85:1077-1088.
- Kiss, A.M., B.E. Jady, E. Bertrand, y T. Kiss. 2004. *Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery*. Molecular and cellular biology 24:5797-5807.
- 20 Su, H., T. Xu, S. Ganapathy, M. Shadfan, M. Long, T.H. Huang, I. Thompson, y Z.M. Yuan. 2014. *Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer*. Oncogene 33:1348-1358.
- Molenaar, D., F. Bringel, F.H. Schuren, W.M. de Vos, R.J. Siezen, y M. Kleerebezem. 2005. *Exploring Lactobacillus plantarum genome diversity by using microarrays*. J Bacteriol 187:6119-6127.
- Troost, F.J., W.H. Saris, y R.J. Brummer. 2003. *Recombinant human lactoferrin ingestion attenuates indomethacin-induced enteropathy in vivo in healthy volunteers*. Eur J Clin Nutr 57:1579-1585.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación probiótica que comprende al menos una sustancia de calidad alimentaria y *Lactobacillus plantarum* TIFN 101, depositado con el número CBS 138100.
- 5 2. Una formulación probiótica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos una cepa bacteriana probiótica adicional.
3. Una formulación probiótica de acuerdo con reivindicación 1 o 2, en donde la concentración de las cepas bacterianas probióticas está en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 por ciento en peso, y/o de aproximadamente 1 E+6 a aproximadamente 1 E+12 unidades formadoras de colonia/ml de formulación.
- 10 4. Una formulación probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que se forma como parte de un comprimido o que está contenida dentro de una cápsula.
5. Un producto alimenticio, una formulación para enriquecer alimentos, un complemento alimenticio, una formulación nutracéutica o una formulación farmacéutica que comprende una formulación probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 15 6. Un recipiente con un volumen de líquido entre 0,5 y 50 ml que comprende una formulación probiótica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
7. Un recipiente con un volumen de líquido entre 0,5 y 1000 ml que comprende un producto alimenticio, una formulación para enriquecer alimentos, un complemento alimenticio, una formulación nutracéutica o una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5.
- 20 8. Una formulación probiótica de acuerdo con la reivindicación 2-4 o un producto alimenticio, una formulación para enriquecer alimentos, un complemento alimenticio, una formulación nutracéutica o una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende una cepa bacteriana probiótica adicional, en donde la cepa bacteriana probiótica adicional es una especie seleccionada del grupo que consiste en *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. murinus*, *L. jensenii*, *L. salivarius*, *L. minutis*, *L. brevis*, *L. gallinarum*, *L. amylovorus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroid. es*, *Lc. lactis*, *Pediococcus damnosus*, *P. acidilactici*, *P. parvulus*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescente*, *B. animalis*, *B. gallinarum*, *B. magnum*, y *B. thermophilum*.
- 25

Fig. 1a

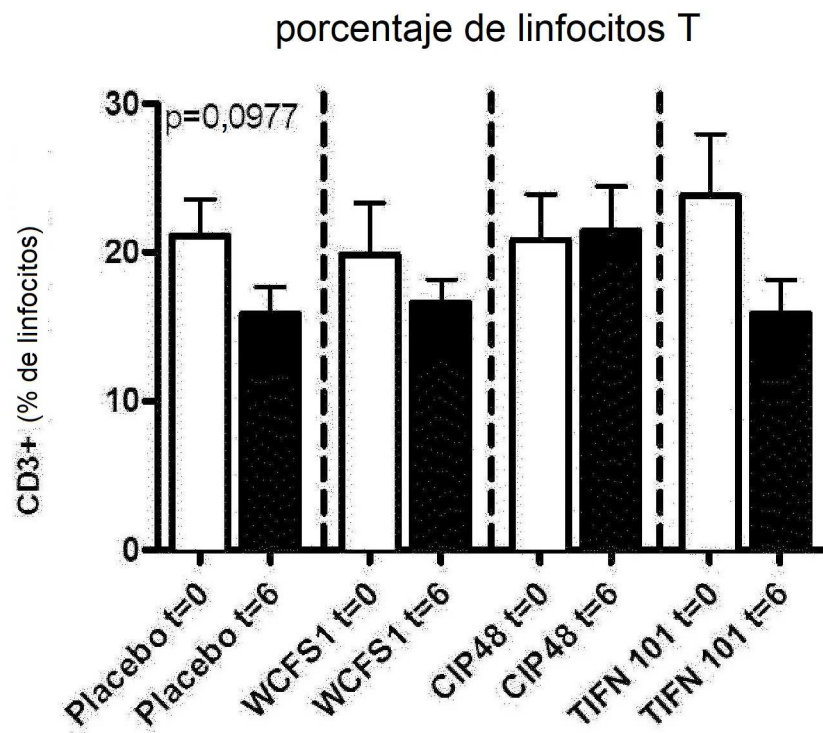


Fig. 1b

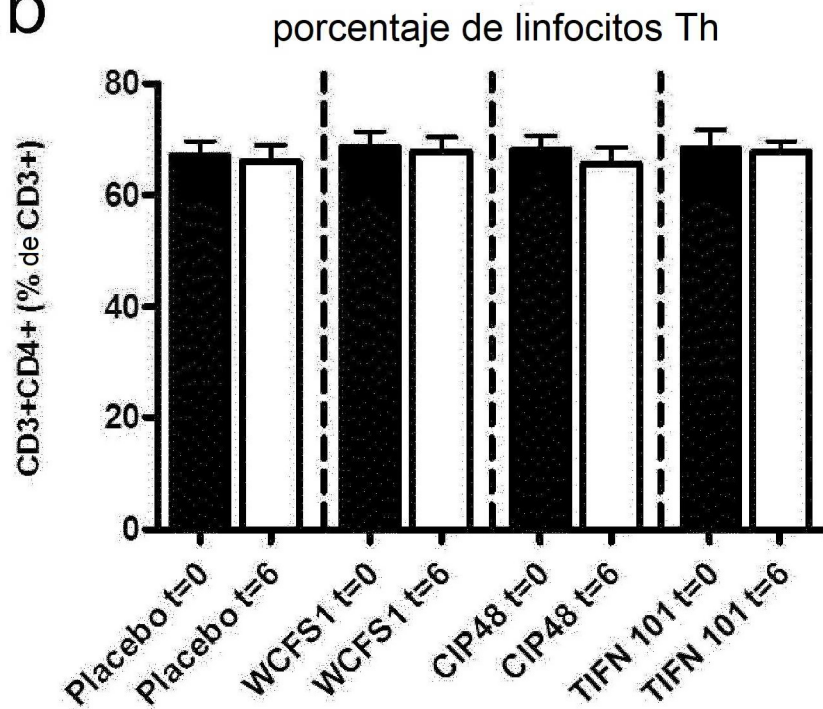


Fig. 1c

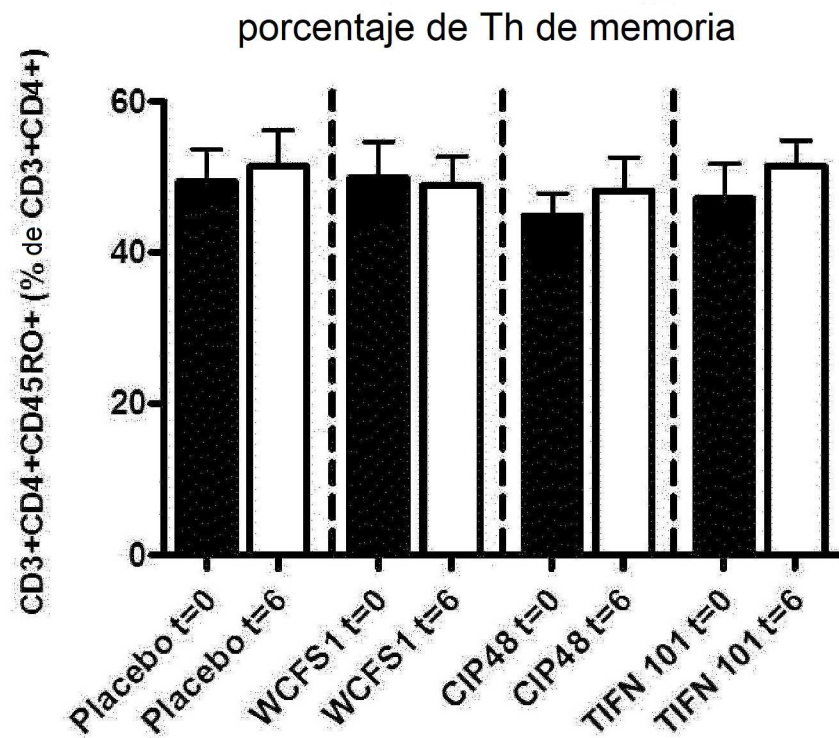


Fig. 1d

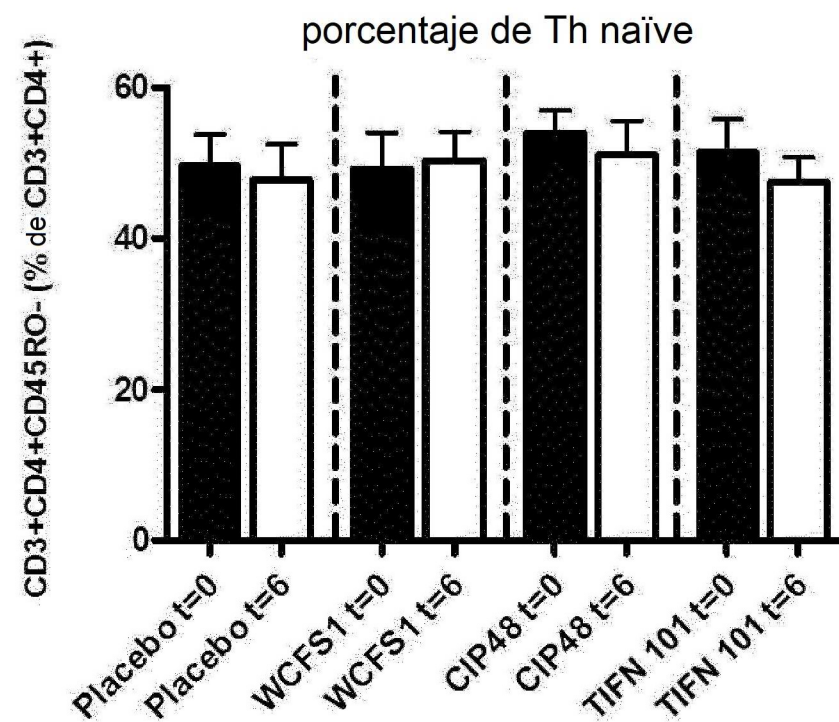


Fig. 1e

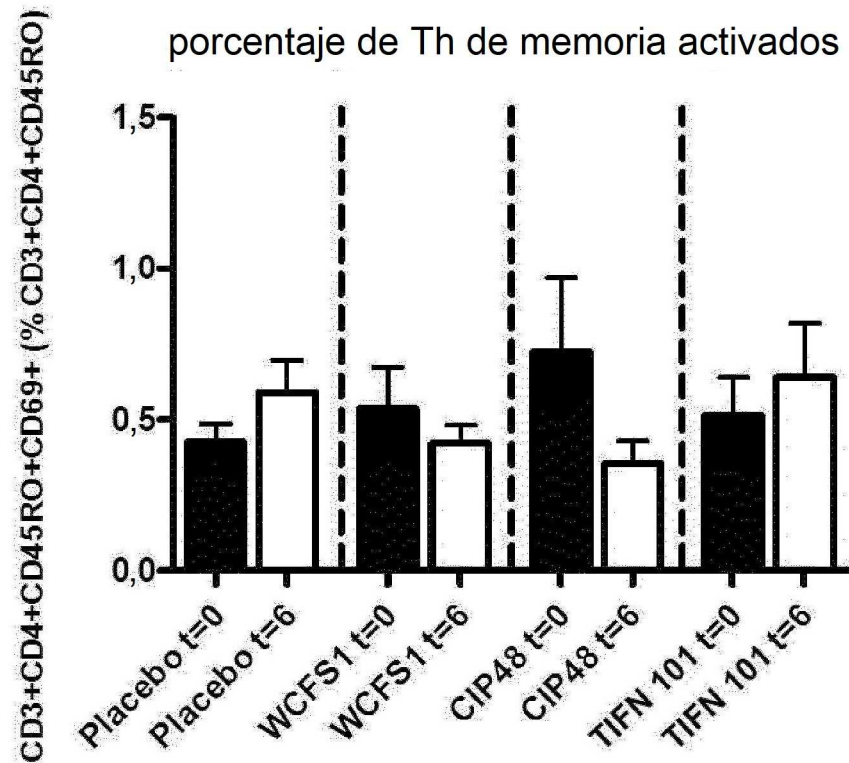


Fig. 1f

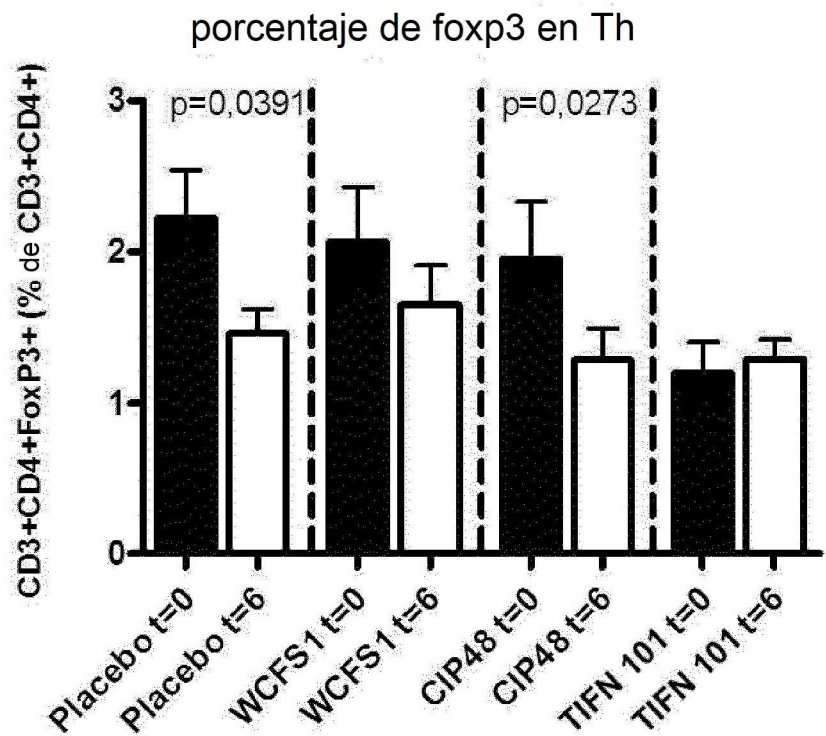


Fig. 1g

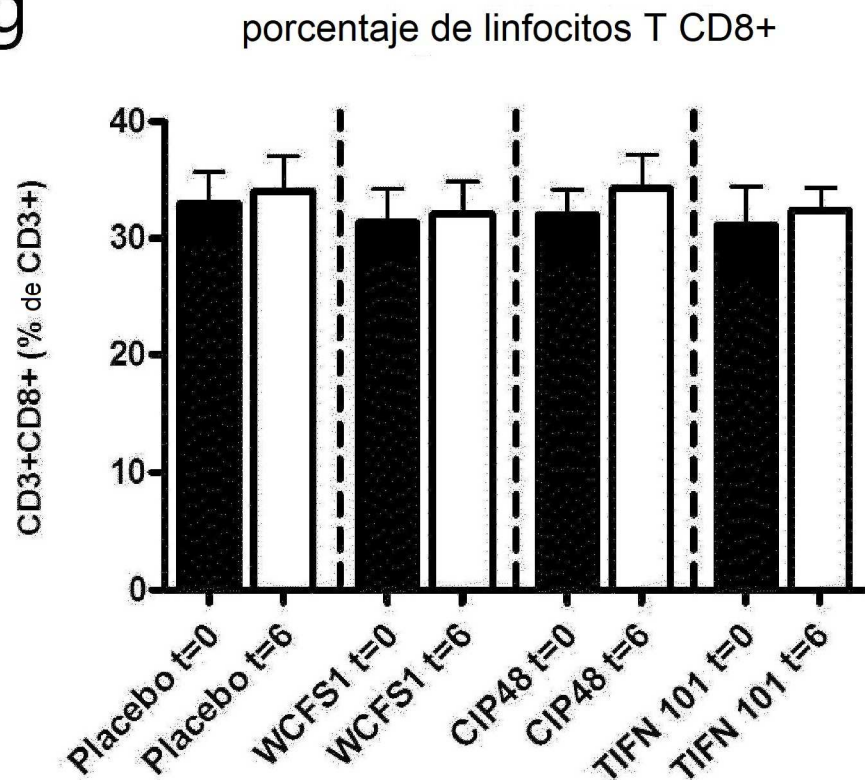


Fig. 1h

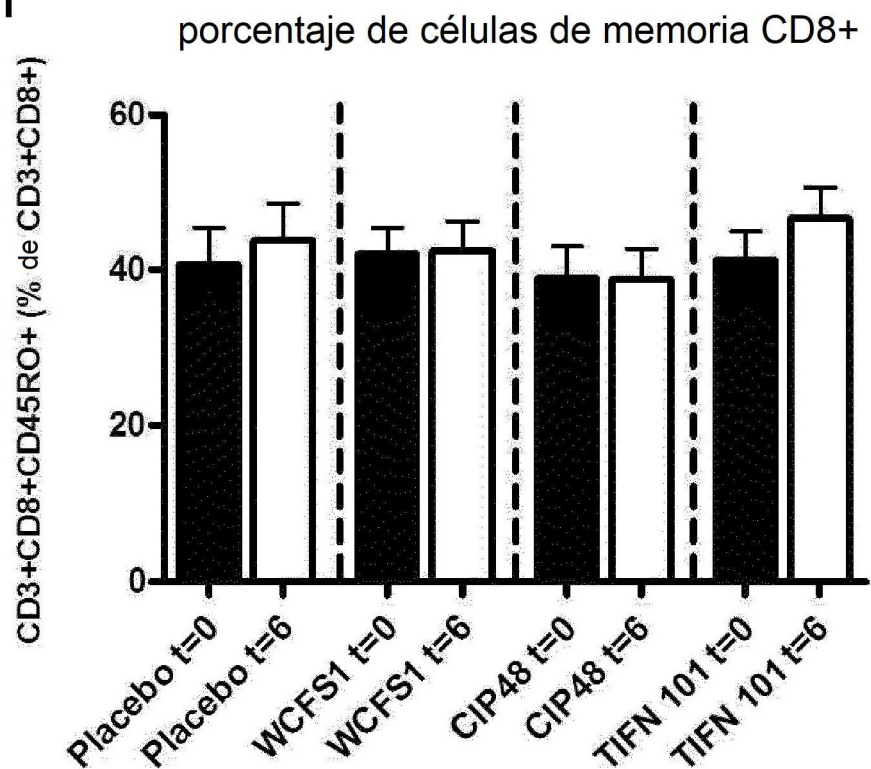


Fig. 1i

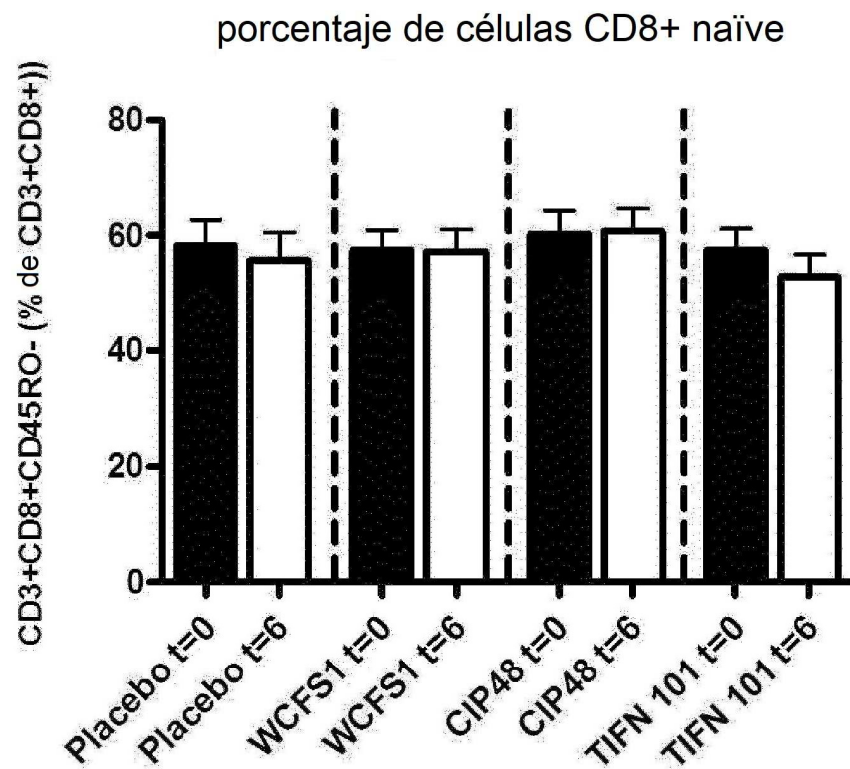


Fig. 1j

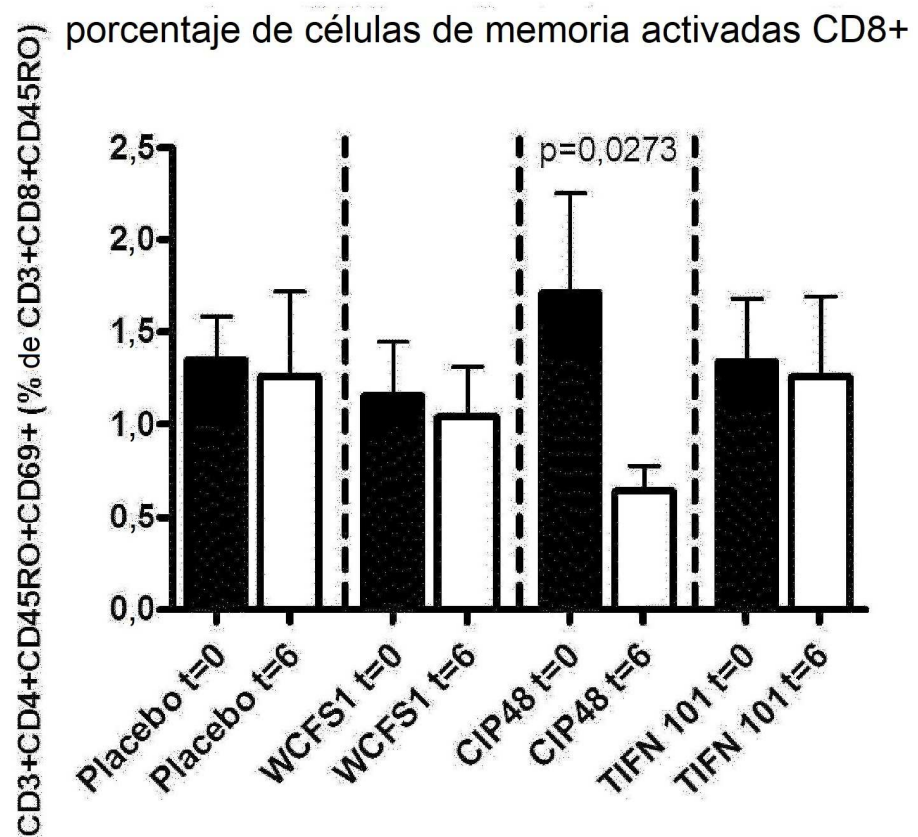


Fig. 2a

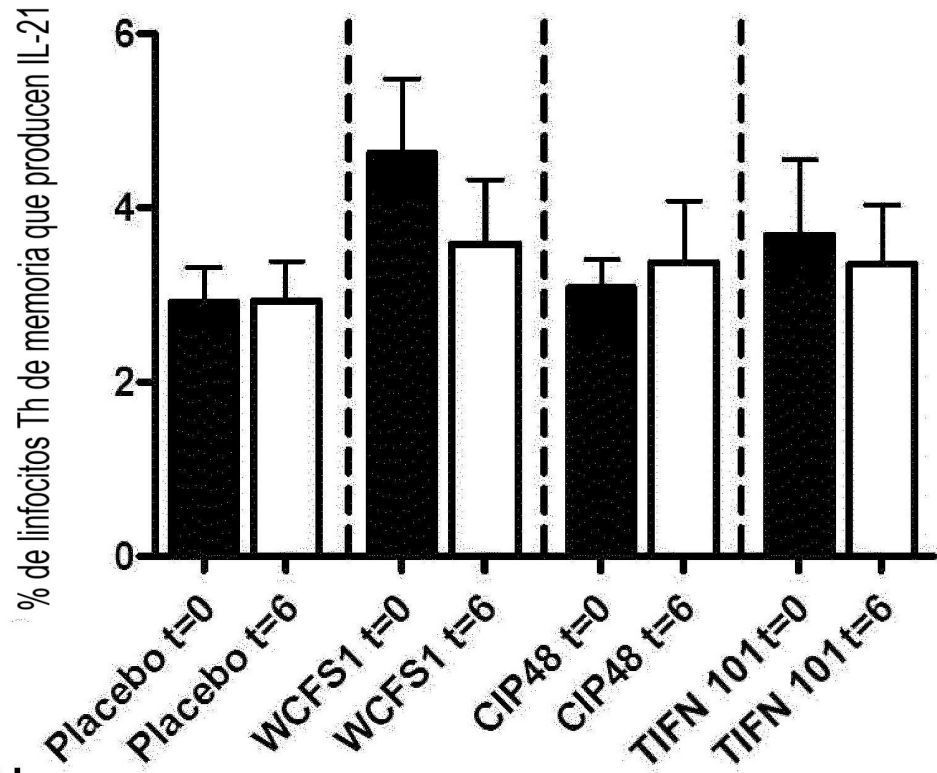


Fig. 2b

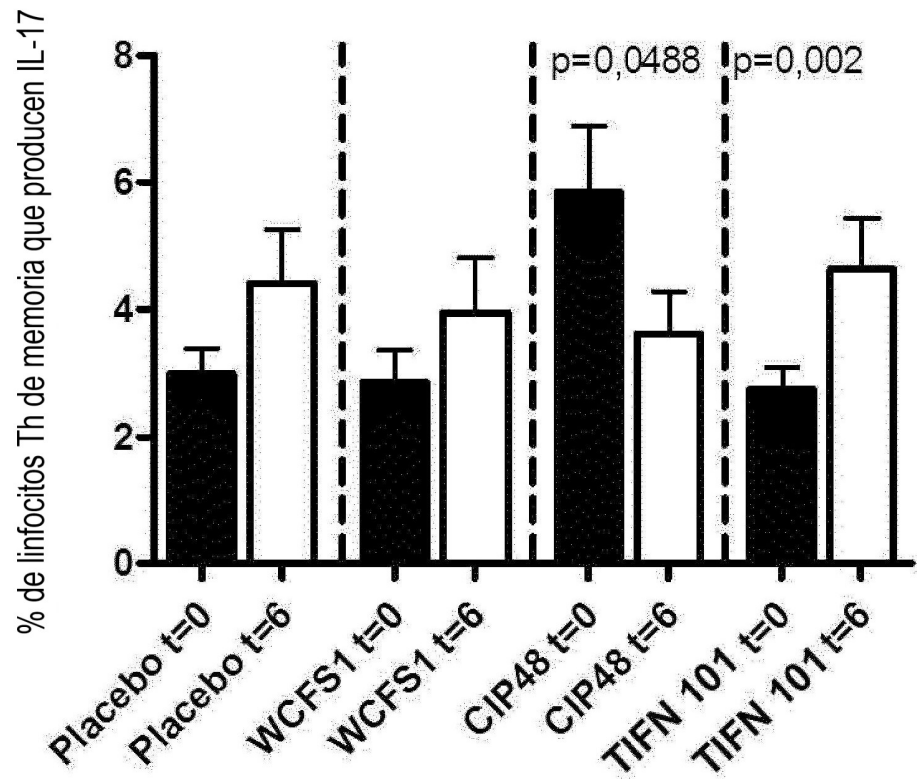


Fig. 2c

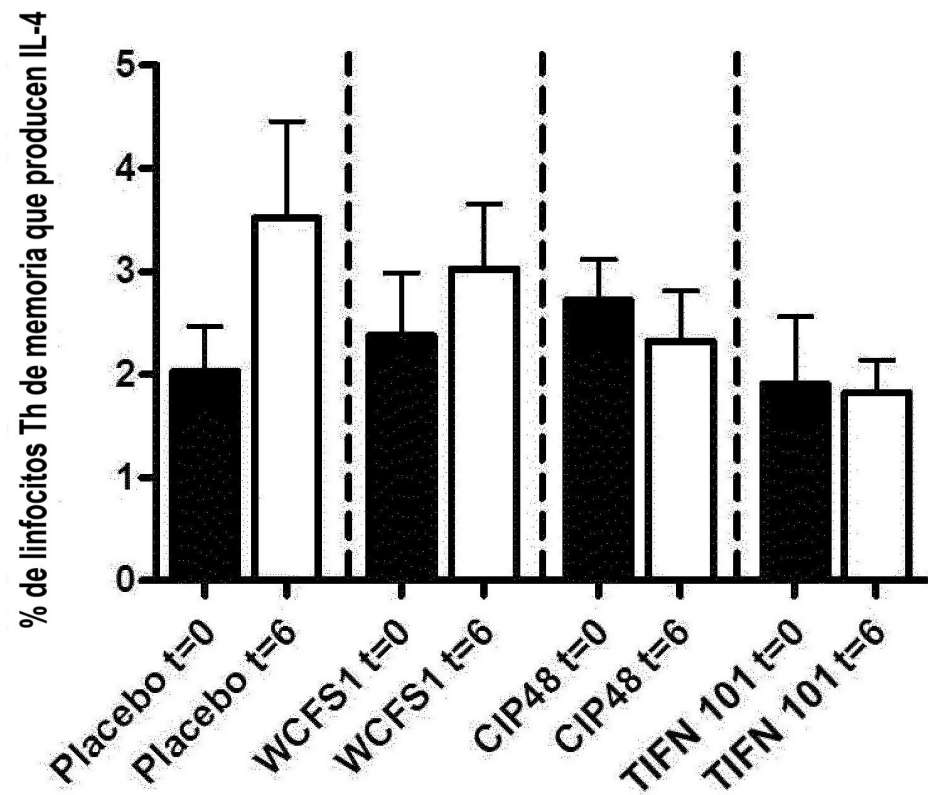


Fig. 2d

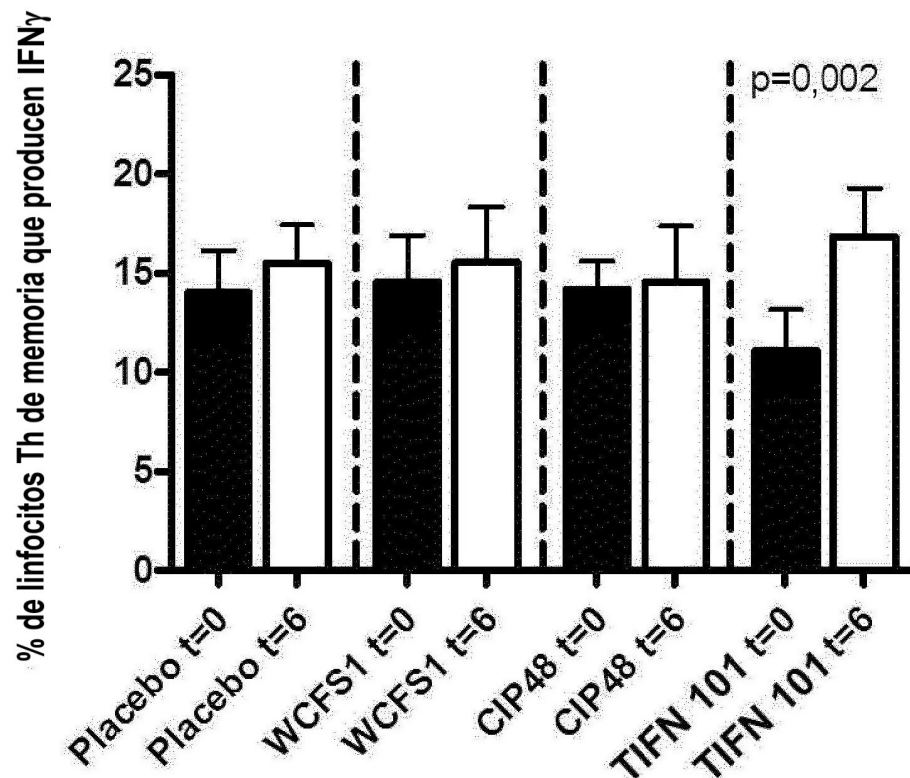


Fig. 3a

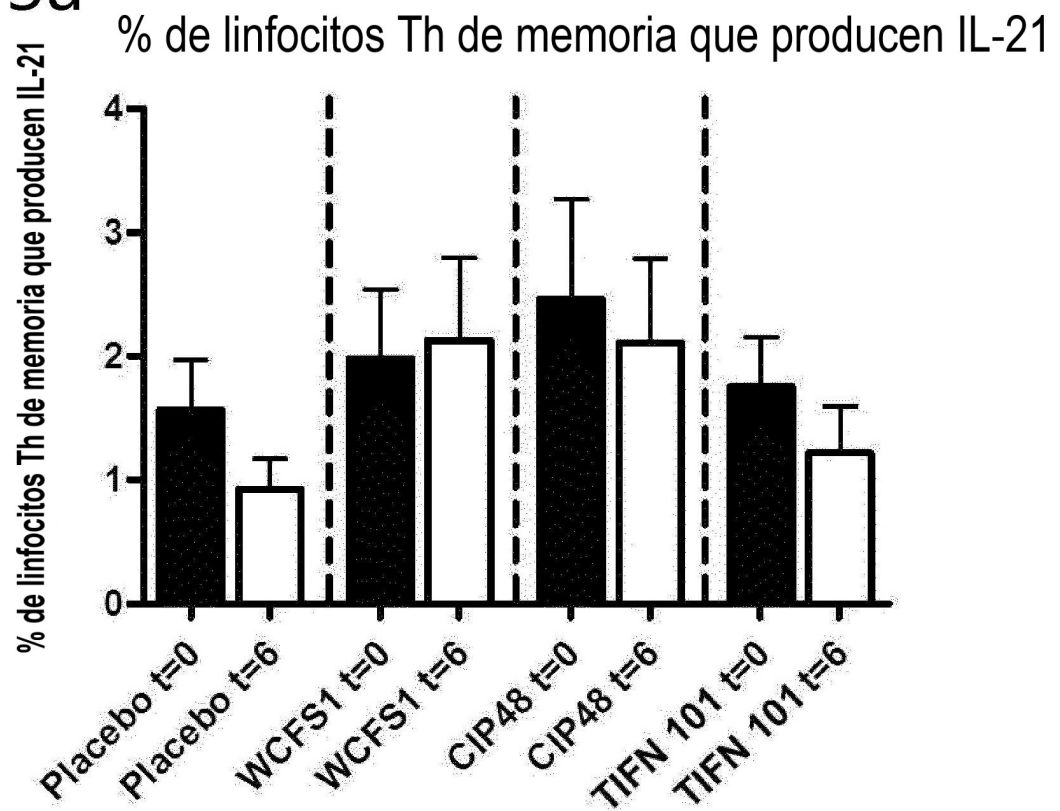


Fig. 3b

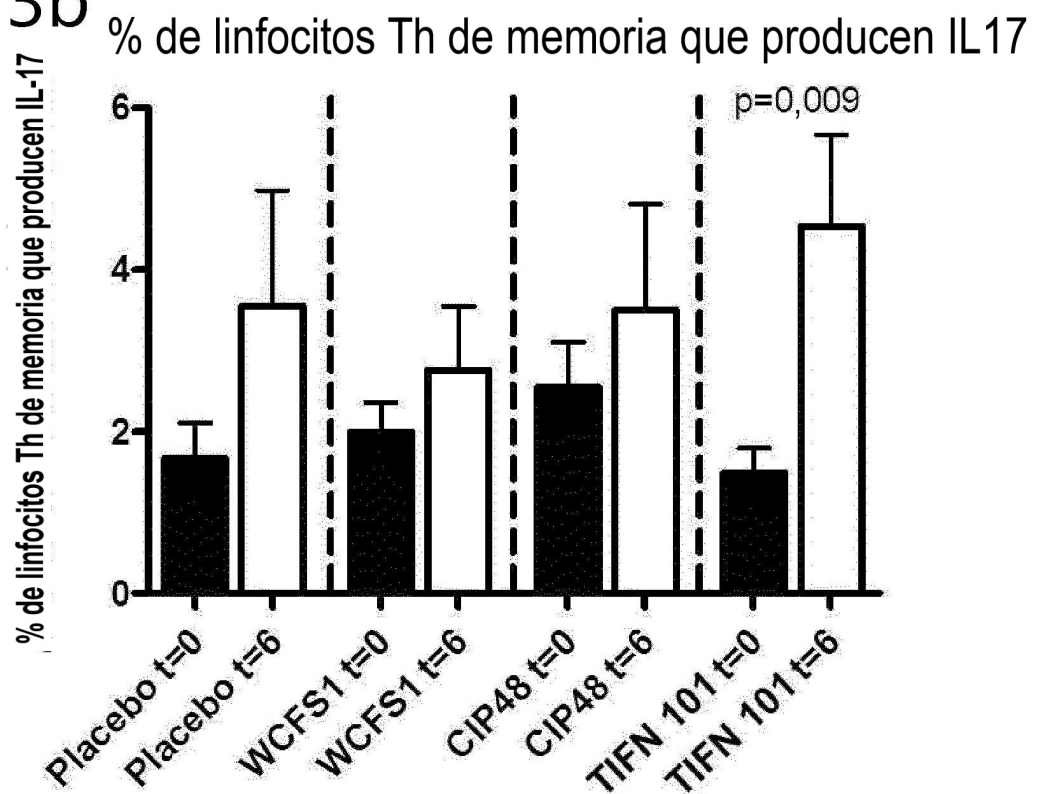


Fig. 3c

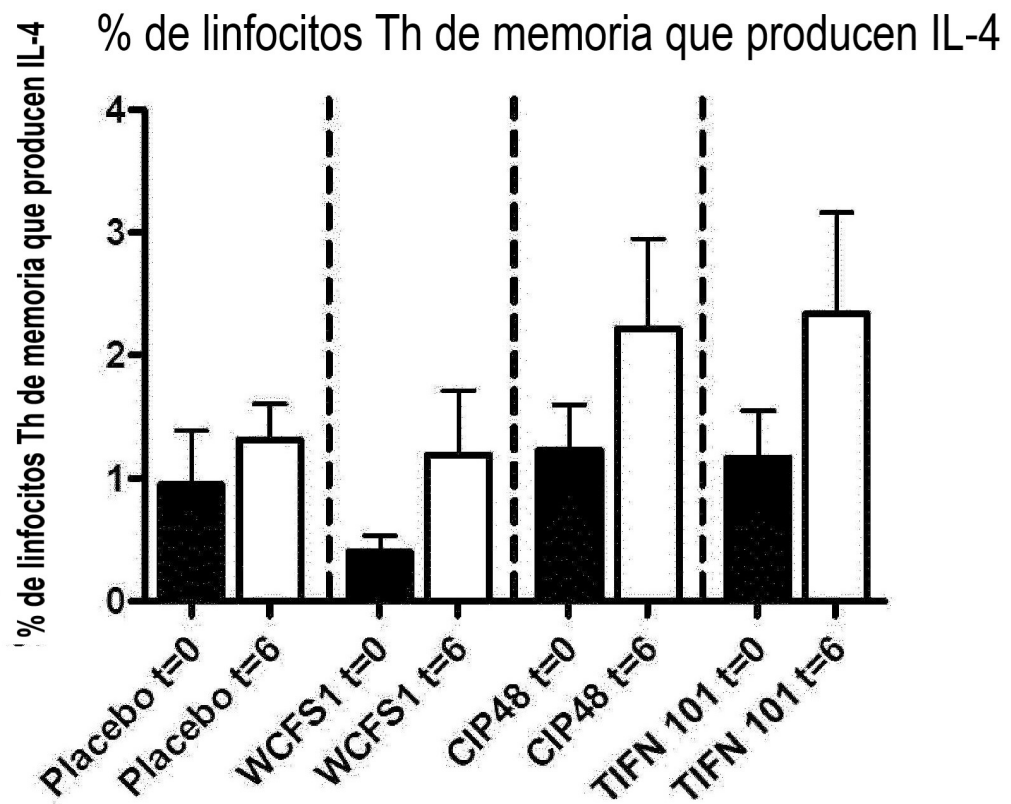


Fig. 3d

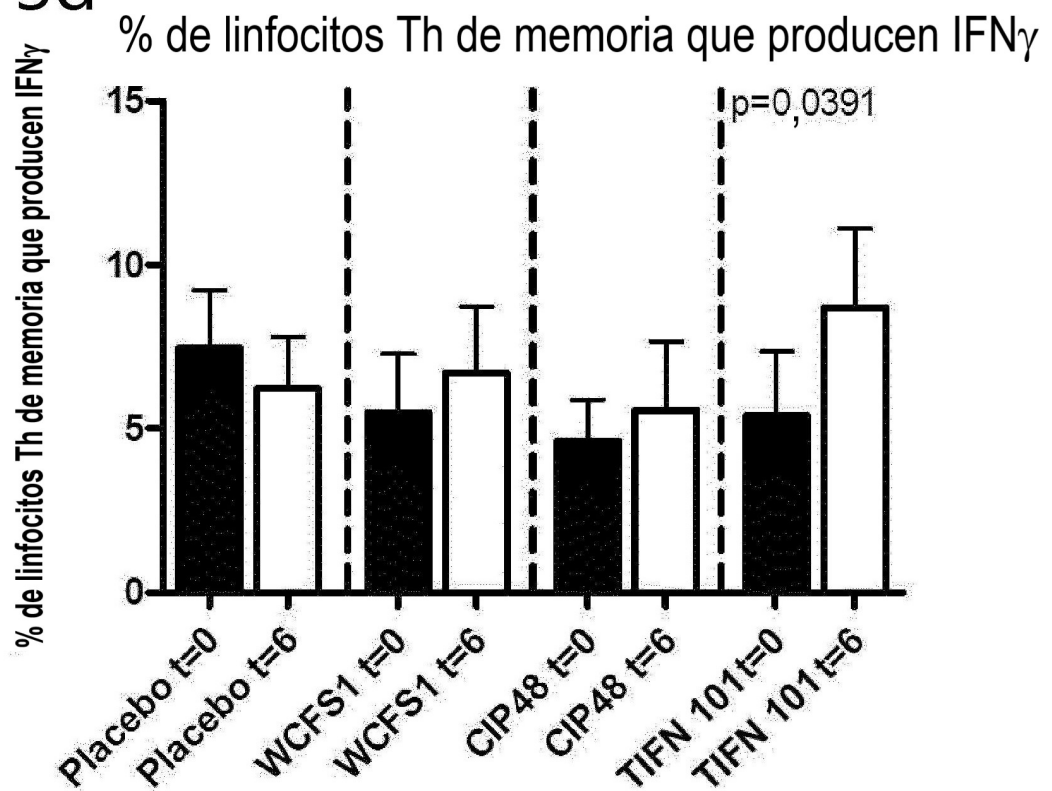


Fig. 4a

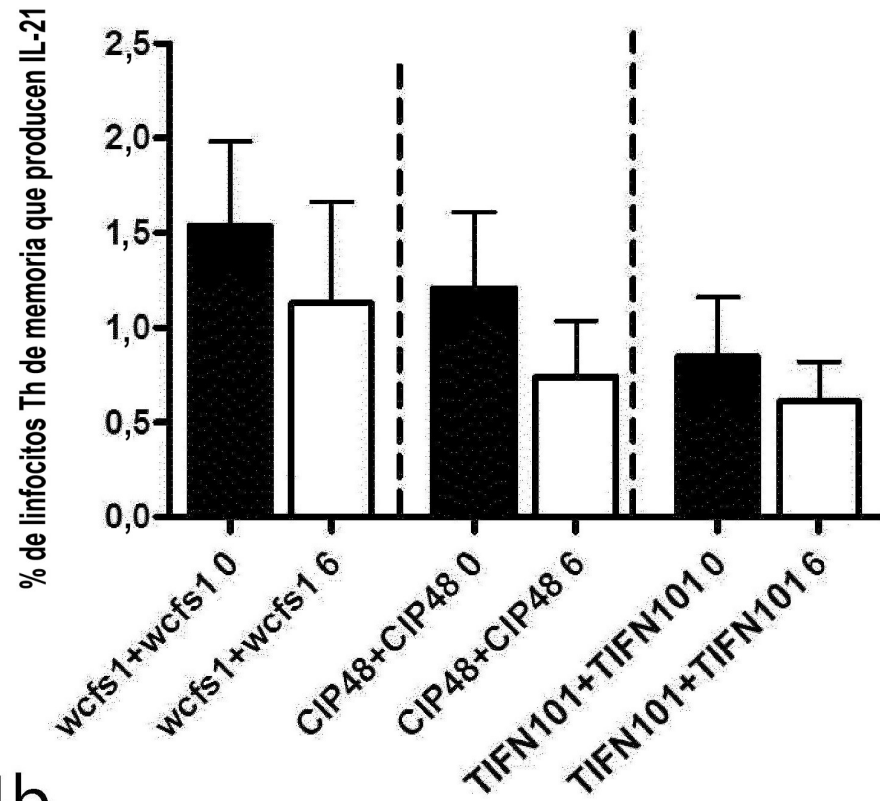


Fig. 4b

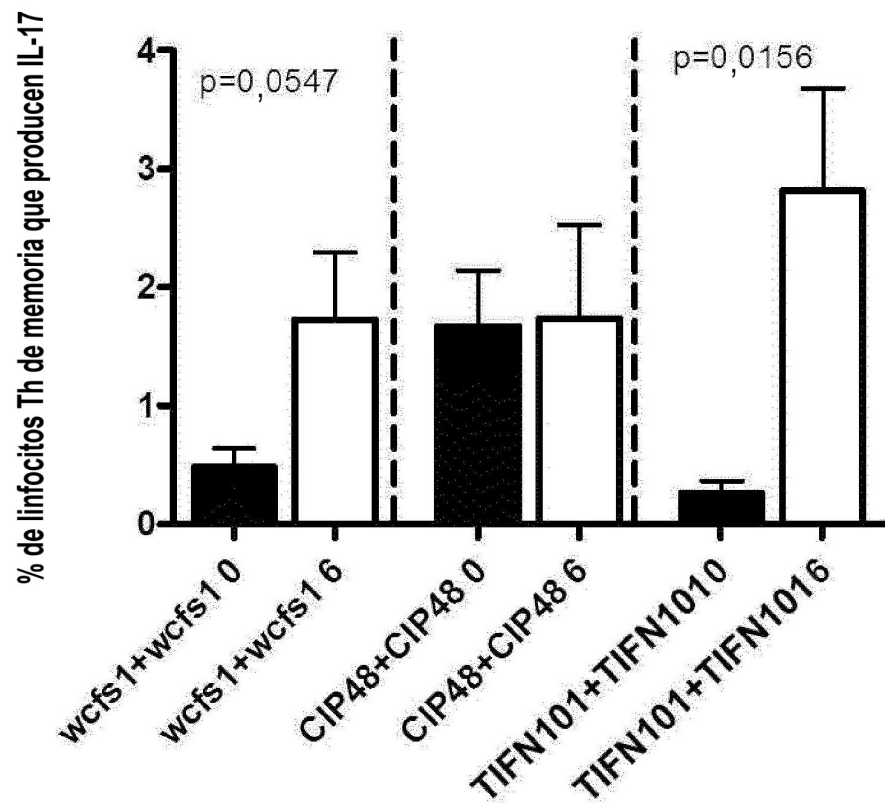


Fig. 4c

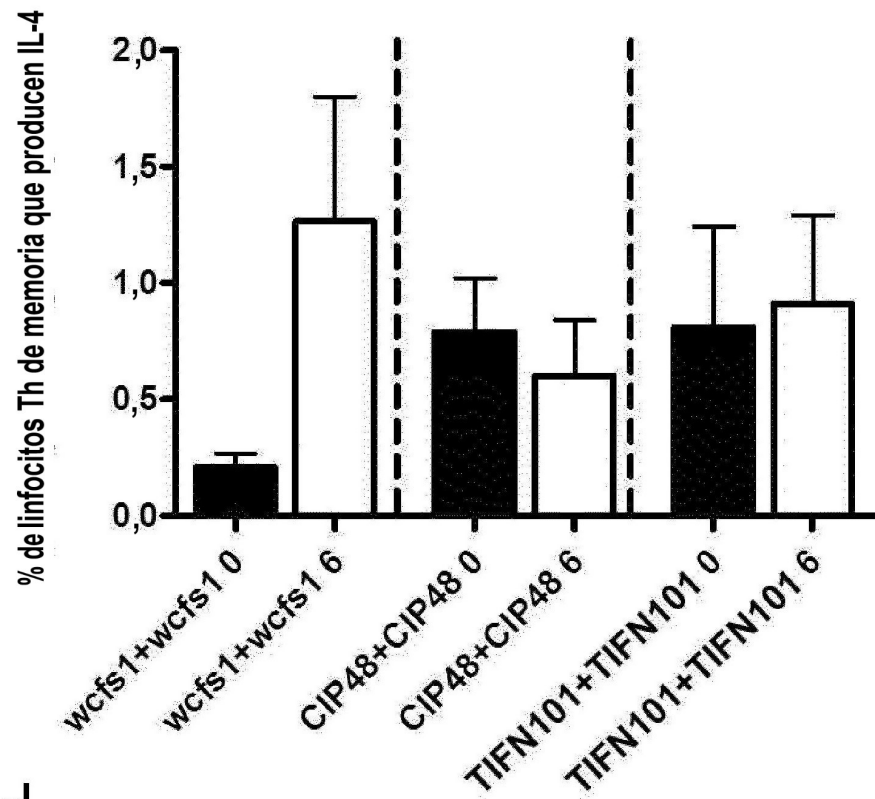


Fig. 4d

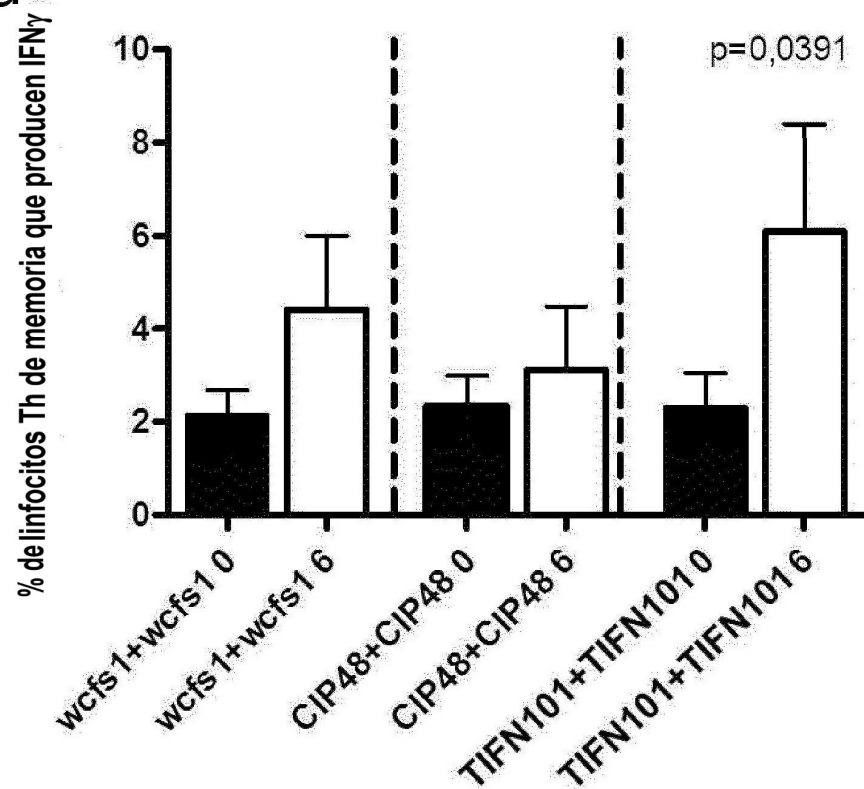


Fig. 5a

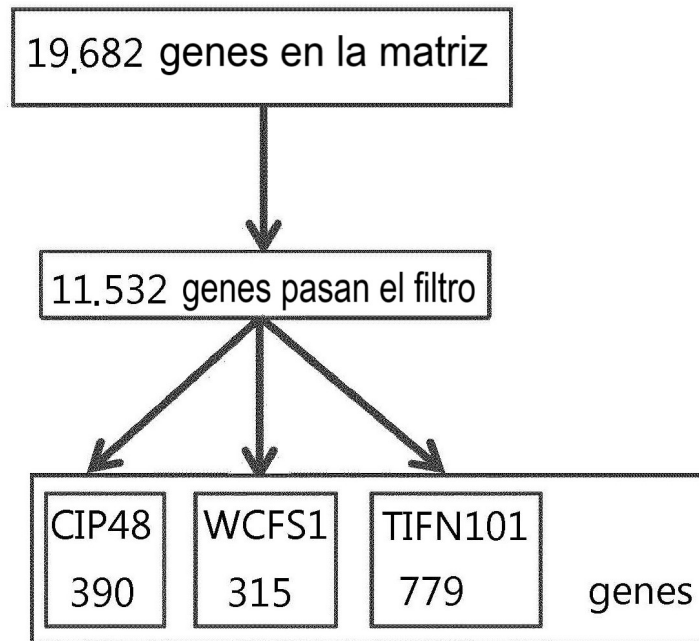


Fig. 5b

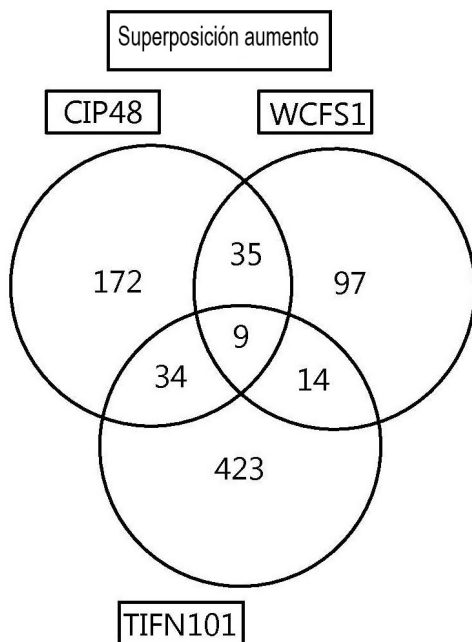


Fig. 5c

