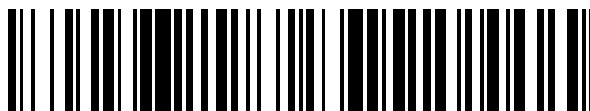


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 690**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

A61K 35/745 (2015.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/EP2015/069740**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16030504**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15763232 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3194567**

54 Título: **Cepas de *Bifidobacterium adolescentis* probióticas**

30 Prioridad:

29.08.2014 EP 14182859

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

23.06.2020

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**LESER, THOMAS DYRMANN;
MYLING-PETERSEN, DORTE;
CHRISTENSEN, JEFFREY EARL;
WELLEJUS, ANJA y
BROCKMANN, ELKE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 768 690 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

Cepas de *Bifidobacterium adolescentis* probióticas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una cepa aislada de *Bifidobacterium adolescentis* seleccionada del grupo que consiste en DSM 29103 y un mutante de dicha cepa que es capaz de i) aumentar la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de una monocapa de células Caco-2 después de 10 h de tratamiento a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento, ii) inducir la secreción de >200 pg/ml de IL-10 cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, y iii) inducir una proporción IL-10:IL-12 > 1 cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas.

Además, la invención se refiere a una cepa aislada de la invención y a un producto probiótico que comprende una cepa aislada de la invención y un crioprotector para uso en mejorar la función barrera intestinal y/o provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria.

Las cepas de *Bifidobacterium adolescentis* fermentan D-ribosa, no fermentan D-sorbitol y tienen una secuencia génica ribosómica 16S que comprende SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 7; y SEQ ID NO: 10.

20 **Antecedentes de la invención**

Las bifidobacterias son habitantes naturales de aparato digestivo que poseen adaptaciones genéticas que permiten la colonización de este hábitat duro y complejo. Las bifidobacterias interactúan con elementos clave del funcionamiento intestinal y contribuyen a mantener la homeostasis. Progreso científico reciente ha demostrado que las bifidobacterias, mediante interacciones dependientes de cepa con el huésped pueden reducir la carga de antígeno de la mucosa, mejorar la barrera intestinal, e inducir la regulación de las respuestas inmunitarias locales y sistémicas. Debido a sus beneficios reconocidos para la salud humana, las bifidobacterias se usan como probióticos. Los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped" (FAO/WHO, 2001). Aproximadamente una docena de cepas de *Bifidobacterium* con efectos clínicamente documentados están comercialmente disponibles. La mitad de estas son cepas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* y las restantes son cepas de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, *B. longum* subsp. *infantis*, o *Bifidobacterium breve*.

La cepa tipo de *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC15703^T) se aisló del intestino de un adulto (Reuter, 1971). Las cepas de *B. adolescentis* con frecuencia se detectan el aparato digestivo humano adulto (Turróni et al., 2009).

El epitelio intestinal es la capa celular columnar y no ciliada que recubre el intestino delgado y grueso. La capa epitelial intestinal constituye la mayor y más importante barrera contra el medio externo y mantener la integridad epitelial es esencial para conservar la salud. El recubrimiento intestinal consiste en una única capa de células epiteliales cubierta por capas de moco producido por células caliciformes especializadas. Debajo de las células epiteliales está la lámina propia que contiene una variedad de células inmunitarias (tejido linfóide asociado al intestino; GALT). Las células epiteliales están unidas por uniones celulares de las que las uniones estrechas (TJ) desempeñan un papel principal en prevenir que entren moléculas en el epitelio entre las células.

Las TJ son responsables de restringir la difusión paracelular (entre células) de proteínas, lípidos y solutos pequeños. Por tanto, en un epitelio sano, solo agua y moléculas pequeñas (iones) penetran por vía paracelular mientras que el transporte de las moléculas más grandes está regulado por mecanismos de absorción celular. Las TJ consisten en proteínas que atraviesan el espacio entre dos células epiteliales intestinales adyacentes. Las TJ son estructuras dinámicas que están implicadas en procesos de desarrollo, fisiológicos y patológicos. Varios factores estresantes pueden producir el debilitamiento de la TJ, aumentando de esta manera el transporte paracelular (no regulado) de moléculas en la mucosa. Una función barrera intestinal comprometida se caracteriza por permeabilidad aumentada de la mucosa intestinal a macromoléculas lumenales, antígenos, y toxinas que pueden producir inflamación, degeneración y/o atrofia de la mucosa. Este estado, algunas veces denominado 'síndrome del intestino permeable' se asocia con una multitud de síntomas dependiendo de la gravedad. Los lipopolisacáridos (LPS) derivados de bacterias Gram negativas en el intestino son activadores muy potentes de la respuesta inmunitaria. Una vez que el sistema inmunitario de la mucosa se activa por mediadores proinflamatorios, se agrava la apertura de las TJ lo que produce un círculo vicioso de permeabilidad aumentada e inflamación.

Se ha mostrado que las cepas bacterianas probióticas disminuyen la permeabilidad epitelial intestinal, *in vitro* (Anderson, et al., 2010; Karczewski et al., 2010; Liu et al., 2010a; Liu et al., 2010b; Donato et al., 2010), en modelos de ratón (Generoso et al., 2010; Liu et al., 2011; Miyauchi et al., 2009), y en seres humanos (Karczewski et al., 2010). En general, se ha encontrado buen acuerdo entre los resultados *in vitro* e *in vivo*.

Los mecanismos implicados en la mejora probiótica de la función barrera incluyen expresión aumentada de las proteínas de las TJ, tal como ocludina, claudina-1, receptor de F11 (F11R), y zona de oclusión 1 (ZO-1) y 2 (Anderson,

et al., 2010; Liu et al., 2010a; Liu et al., 2010b; Miyauchi et al., 2009; Ukena et al., 2007. La localización aumentada de ocludina y ZO-1 a la vecindad de las estructuras TJ se encontró en biopsias humanas (Karczewski et al., 2010) o en monocapas de Caco-2 tratadas con *L. plantarum* WCFS1 (Karczewski et al., 2010) o *L. rhamnosus* LGG (Donato et al., 2010), que posiblemente implica señalización del receptor de tipo Toll 2 (TLR) (Karczewski et al., 2010).

En un modelo de ratón neonatal de enterocolitis necrotizante (NEC) se encontraron aumentos de permeabilidad intestinal que precedían a NEC, mientras que la administración de *B. infantis* BB-02 atenuaba el aumento de permeabilidad intestinal, conservaba la localización de ocludina y claudina 2 y 4 en las TJ, y disminuía la incidencia de NEC (Bergmann et al., 2013). La permeabilidad intestinal aumentada asociada con colitis en ratones se prevenía por completo por probióticos (VSL#3) al contraequilibrar la expresión disminuida y la redistribución de ocludina, ZO-1, y claudina-1, -3, -4, y -5 (Mennigen et al., 2009). Los componentes de señalización bacterianos propuestos incluyen la proteína de la capa superficial de *Lactobacillus plantarum* (Liu et al., 2010a), e indol (Bansal et al., 2010).

In vivo, la función barrera se puede medir por varios métodos de ensayo no invasivos administrando un bolo de, por ejemplo, CrEDTA o dos azúcares no metabolizables (por ejemplo, lactulosa y manitol) seguido por determinar el Cr o la proporción de los dos azúcares en orina, respectivamente. El manitol es un monosacárido y por tanto se absorbe fácilmente y sirve como un marcador de absorción transcelular, mientras que el disacárido lactulosa es excluido por el revestimiento celular y por tanto solo se absorbe ligeramente y sirve como un marcador para integridad de la mucosa. La prueba de la lactulosa y el manitol proporciona información de la integridad relacionada solo con el intestino delgado, debido a la rotura bacteriana de los azúcares en el intestino grueso, mientras que CrEDTA es más estable y preferentemente proporciona información sobre el epitelio colónico ya que este es dónde el compuesto está presente durante el tiempo más largo (Arrieta et al., 2006).

La función barrera intestinal insuficiente se asocia con manifestaciones clínicas tanto intestinales como sistémicas. La permeabilidad intestinal se ha estudiado de forma más extensa en el contexto de la enfermedad intestinal inflamatoria (EII) y el síndrome del intestino irritable (SII). Las enfermedades intestinales inflamatorias (EII; enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa) se caracterizan por inflamación intestinal recidivante crónica con implicación del sistema inmunitario tanto innato como adaptativo (Zhang y Li, 2014). Las rutas proinflamatorias que implican la citoquina interleuquina 23 (IL-23) y células T cooperadoras 17 (T_H17) están elevadas en pacientes con colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (Song et al., 2013) que está apoyado por descubrimientos genéticos que implican una asociación entre variantes génicas en el gen IL23R y EII (Beaudoin et al., 2013). La etiología de la EII es desconocida, pero existen datos de apoyo extensos de una función barrera intestinal comprometida en EII (Gecse et al., 2011; Geroova et al., 2011; Odenwald y Turner, 2012). En pacientes de Crohn con enfermedad activa se encontró permeabilidad intestinal aumentada (Ukabam et al., 1983) y también el 10-20% de parientes sanos respecto a pacientes con enfermedad de Crohn tienen permeabilidad aumentada (Hollander et al., 1986). Una teoría de la patogénesis de la EII sugiere que una permeabilidad intestinal aumentada expone el GALT subyacente a agentes normalmente excluidos que produce un proceso inflamatorio autoperpetuante (Poritz et al., 2007). En el modelo de ratón de colitis con sulfato sódico de dextrano (DSS) se ha mostrado que la permeabilidad intestinal aumentada precede al desarrollo de inflamación intestinal significativa (Poritz et al., 2007).

Los síntomas del síndrome del intestino irritable (SII) incluyen cólicos y dolor abdominales que con frecuencia es concurrente con hábitos intestinales anómalos con diarrea, estreñimiento, o episodios alternantes de ambos. La etiología y patofisiología del SII son desconocidas. Varios estudios han mostrado permeabilidad intestinal aumentada en SII (Camilleri et al., 2007; Camilleri et al., 2012; Gecse et al., 2011; Martinez et al., 2012; Piche et al., 2009). La permeabilidad aumentada resulta de la alteración de la expresión apical normal de las proteínas de TJ claudina-1, ZO-1 y ocludina (Camilleri et al., 2012). La permeabilidad intestinal aumentada está acompañada por activación inmunitaria de bajo grado persistente en el intestino. Un estudio previo encontró calprotectina fecal elevada en pacientes de SII (Goepf et al., 2014) que indica inflamación elevada. También puede estar implicada la disregulación de citoquinas en el proceso inflamatorio y metaanálisis recientes han mostrado asociaciones entre polimorfismos génicos de IL-10 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y SII (Qin et al., 2013; Schmulson et al., 2013; Bashashati et al., 2012). Se observó un desequilibrio suero/plasma en la citoquina TNF α en SII comparado con los controles (Bashashati et al., 2014) y en pacientes de SII con diarrea predominante los niveles en suero tanto de IL-6 como TNF α eran significativamente mayores comparados con los controles (Rana et al., 2012). En conjunto, esto sugiere un desplazamiento inmunitario hacia una fase más proinflamatoria.

El tratamiento con leche fermentada probiótica (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. acidophilus*, y *B. longum*) disminuyó significativamente la permeabilidad del intestino delgado en pacientes de SII y mejoró las puntuaciones de SII globales medias (Zeng et al., 2008).

La enfermedad hepática crónica está asociada con cambios en el intestino y las enfermedades hepáticas se han asociado con cambios microbianos del intestino (Schnabl y Brenner, 2014). Estos cambios en la composición microbiana pueden llevar a la activación del sistema inmunitario de la mucosa a través de receptores TLR y receptores de tipo Nod (NLR) que reconocen productos microbianos seguido por activación del potenciador de cadena ligera kappa del factor nuclear de células B activadas (NF- κ B) que inicia el reclutamiento de células inmunitarias (Chassaing et al., 2014). Los animales genéticamente modificados tal como ratones mutantes TLR4 desarrollaron significativamente menos fibrosis hepática y reclutamiento de macrófagos hepáticos después de la ligación del

conducto biliar comparado con ratones de tipo salvaje lo que indica la implicación de la ruta de TLR4 en el desarrollo de enfermedades hepáticas crónicas (Seki et al., 2007). Se mostró que la conexión entre enfermedad hepática colestática e inflamación local en la lámina propia intestinal estaba mediada por monocitos positivos para TLR2 que secretan TNF α que también se asoció con rotura de las proteínas de TJ ZO-1 y claudina-4 (Hartmann et al. 2012). La translocación de bacterias o sus productos, por ejemplo, LPS a ganglios linfáticos mesentéricos y sitios extraintestinales es común en pacientes con cirrosis hepática debido a permeabilidad intestinal aumentada (Seo y Shah, 2012), y en pacientes con enfermedad hepática crónica y crecimiento excesivo bacteriano intestinal con translocación bacteriana, la gravedad de la enfermedad se correlaciona con niveles sistémicos de LPS (Lin et al. 1995). Tanto en modelos animales como en pacientes con enfermedad hepática crónica, el tratamiento con antibióticos mejora la gravedad de la enfermedad al reducir la carga bacteriana y endotoxemia (Seki et al. 2007; Cirera et al. 2001). Sin embargo, un intestino permeable y la translocación de productos microbianos también se producen pronto en la enfermedad y los pacientes con enfermedad hepática tienen una barrera intestinal alterada y los productos bacterianos se encuentran en la circulación sistémica. Los productos microbianos alcanzan el hígado a través de la vena porta o los conductos linfáticos, donde activan receptores hepáticos del sistema inmunitario innato (Schnabl, 2013).

Experimentos en pacientes con la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) llevados a cabo por Miele et al. (2009) sugieren fuertemente que EHGNA se asocia con permeabilidad intestinal aumentada y crecimiento excesivo bacteriano en el intestino delgado. La translocación bacteriana se correlaciona con niveles en plasma de citoquinas proinflamatorias y activación de óxido nítrico sintasa (Frances et al., 2010), que pueden causar lesiones en el hígado. Por tanto, reducir la translocación bacteriana podría representar un tratamiento para aliviar las enfermedades hepáticas.

La translocación bacteriana disminuida a ganglios linfáticos mesentéricos, sangre de la porta y arterial se encontró en un modelo en rata de lesión hepática aguda después del tratamiento con combinaciones de lactobacilos (*L. acidophilus* NM1, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* 271, y *B. animalis* NM2). Además, se encontraron niveles reducidos de *Enterobacteriaceae* (bacterias Gram negativas) en el ciego y el colon. El daño hepatocelular disminuido estaba indicado por niveles más bajos de alanina aminotransferasa en suero (Adawi et al., 2001). El tratamiento probiótico no solo disminuye la translocación bacteriana, sino que también reduce la exotoxemia causada por endotoxinas, principalmente LPS derivado de bacterias Gram negativas. Parece plausible que las endotoxinas son importantes para el desarrollo de EHGNA y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) a través de la estimulación de células de Kupffer y la producción de TNF α (Osman et al., 2007). Los niveles de endotoxinas en plasma reducidos pueden ser el resultado de disminuir la permeabilidad intestinal.

Se han encontrado concentraciones reducidas de endotoxina en plasma en pacientes de cirrosis después del tratamiento con dos mezclas probióticas (*Bifidobacterium*, *L. acidophilus* y *Enterococcus* [Bifico®], o *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecium* [Medilac-s®]) (Wigg et al., 2001), o después del tratamiento con un producto simbiótico (*Pediococcus pentosaceus* 5-33:3, *Leuconostoc mesenteroides* 32-77:1, *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19, *L. plantarum* 2592 + fibras fermentables bioactivas; Medipharm), o tratamiento con la mezcla probiótica sola (Zhao et al., 2004). Se encontró una disminución marginal de endotoxemia después del tratamiento con *E. coli* Nissle 1917 comparado con placebo en pacientes cirróticos (Liu et al., 2004).

Se sabe bien que el alcohol aumenta la permeabilidad intestinal y esto puede acelerar la evolución de la enfermedad hepática al aumentar la endotoxina circulante portal (LPS). Se encontró que factores solubles de *L. rhamnosus* LGG reducían el aumento de permeabilidad intestinal inducida por alcohol y la translocación de endotoxina, y mejoraban la lesión hepática inducida por alcohol aguda en un modelo de ratón (Wang et al., 2012). La mejora de la barrera intestinal por probióticos está bien documentada *in vitro* e *in vivo*. Dada la importancia de la translocación bacteriana y endotoxemia para el desarrollo de enfermedades hepáticas parece probable que los probióticos con propiedades de fortificación de la barrera intestinal tuvieran un efecto beneficioso sobre EHGNA y EHNA.

Los trastornos metabólicos (diabetes de tipo 2 y resistencia a insulina) y la obesidad están estrechamente unidos a la inflamación. Evidencia reciente sugiere una interacción entre la dieta con alto contenido en grasa y bacterias, y la mucosa intestinal puede fomentar la inflamación del intestino delgado como un suceso temprano en el desarrollo de la obesidad y resistencia a insulina (Ding y Lund, 2011). Estudios animales mostraron un aumento en TNF α en el íleon en ratones alimentados con dieta alta en grasa antes de que la ganancia de peso y grasa se hicieran evidentes y también la ruta proinflamatoria de NF- κ B estaba aumentada en el íleon y a un menor grado en el colon de ratones alimentados con dieta alta en grasa (Ding et al., 2010). En niños gravemente obesos la calprotectina fecal estaba aumentada en el 47% de los pacientes, mientras que el ácido nítrico rectal era patológicamente alto en el 88% de los niños obesos y en el 100% de los pacientes diabéticos lo que apoya la hipótesis de que la inflamación intestinal distal está implicada en obesidad y diabetes (Spagnuolo et al., 2010). En un estudio en mujeres obesas, la expresión génica de rutas proinflamatorias estaba drásticamente disminuida después de una pérdida de peso inducida por dieta de una media del 10%, acompañada por reducción en TNF α , IL-1 β , IL-8, y proteína quimiotáctica de monocitos 1 e infiltración de macrófagos (Pendyala et al., 2011). En conjunto, estos datos implican que el intestino en sujetos obesos y pacientes diabéticos tiene un estado inflamatorio aumentado comparado con sujetos sanos y que esto puede seguir al desarrollo de ganancia de peso y desequilibrios de glucosa/insulina. Los ratones libres de gérmenes están protegidos contra las complicaciones metabólicas de la exposición a una dieta 'occidental' alta en grasa/alta en azúcar refinado. Se ha identificado el LPS bacteriano translocado como un factor desencadenante de inflamación crónica, de bajo grado,

denominada 'endotoxemia metabólica' (Cani et al., 2007). Según este modelo, se libera LPS de bacterias Gram negativas que se lisan en el intestino y se transloca a través del epitelio cuando la barrera está comprometida, por ejemplo, como consecuencia de una dieta que contiene alta grasa. Los niveles aumentados de LPS en plasma (2-3 veces) producen un tono inflamatorio ligeramente aumentado, pero persistente, que desencadena ganancia de peso y resistencia a insulina (Cani et al., 2007). En pacientes con diabetes de tipo 2 se encuentran niveles circulantes aumentados de LPS y marcadores de permeabilidad intestinal (zonulina) (Hawkesworth et al., 2012; Jayashree et al., 2014), así como en pacientes de diabetes de tipo 1 (de Kort et al., 2011; Vaarala et al., 2008). El aumento de zonulina, es decir, permeabilidad intestinal aumentada parece preceder al inicio de la diabetes de tipo 1 (Sapone et al., 2006). La colonización de los intestinos con bifidobacterias aumenta la función barrera intestinal mediante el aumento de la expresión de ZO-1 y ocludina, y mejora de forma significativa y positiva la tolerancia a glucosa, la secreción de insulina inducida por glucosa y normaliza el tono inflamatorio (Cani et al., 2007).

La endotoxemia metabólica debido a la pérdida de integridad de la barrera intestinal activa la inflamación mediada por TLR4 e induce estrés oxidativo que se asocia con riesgo cardiovascular aumentado y mortalidad. La translocación aumentada de LPS a través de la barrera intestinal produce mayores niveles circulantes de LPS que fomentan aterosclerosis (Neves et al., 2013). Los marcadores de inflamación sistémica tal como LPS circulante está elevado en pacientes con infecciones crónicas y son predictores fuertes de riesgo aterosclerótico aumentado (Kiechl et al., 2001).

Los elementos clave de las enfermedades autoinmunitarias son la inmunidad adaptativa y un desequilibrio entre las respuestas inmunitarias T_H1 y T_H2 . En neonatos los antígenos microbianos pueden inducir una respuesta inmunitaria T_H1 que compensa la normalmente dominante respuesta inmunitaria T_H2 . Una respuesta inmunitaria T_H1 es característica de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias. Recientemente, se ha propuesto que una barrera intestinal comprometida está implicada en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias (Fasano y Shea-Donohue, 2005). Según esta hipótesis hay tres elementos clave en la patogénesis de enfermedades autoinmunitarias.

1. Una mala comunicación entre la inmunidad innata y adaptativa.
2. La estimulación continua por antígenos no propios (desencadenantes medioambientales) perpetúa el proceso.
3. Una pérdida de función protectora de las barreras mucosas que interactúan con el medio (mucosa gastrointestinal y pulmonar).

La patología de la enfermedad celiaca es un ejemplo. Pronto en el desarrollo de la enfermedad celiaca las TJ se abren y se produce daño al tejido intestinal. La gliadina desencadena la ruta de inmunidad innata de zonulina de una manera dependiente de MyD88 que inicia la apertura de TJ e induce una respuesta proinflamatoria (T_H1) en la mucosa intestinal. Una vez la gliadina (gluten) se elimina de la dieta, los niveles de zonulina en suero disminuyen, el intestino reanuda su función barrera basal, los títulos de autoanticuerpos se normalizan y el proceso autoinmunitario se para (Fasano y Shea-Donohue, 2005; Fasano, 2012).

Varias otras enfermedades autoinmunitarias, incluyendo diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, se caracterizan por permeabilidad intestinal aumentada que permite el paso de antígenos desde la microbiota intestinal, desafiando al sistema inmunitario a producir una respuesta inmunitaria que se puede dirigir a cualquier órgano o tejido (por mimetismo molecular) en individuos genéticamente predispuestos (Fasano, 2012). Además, se ha reconocido que el sistema inmunitario de particularmente el intestino delgado induce respuestas tolerogénicas a, por ejemplo, antígenos de alimentos o comensales que pueden estar implicados en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Se reconoció que el intestino delgado redirigía y controlaba células T_H17 proinflamatorias (Esplugues et al., 2011) y se ha propuesto que las bacterias probióticas pueden actuar modulando el sistema inmunitario intestinal y por tanto disminuir el desarrollo y la gravedad de enfermedades en modelos animales de artritis reumatoide y esclerosis múltiple (So et al., 2008; Kwon et al., 2013).

Los ratones libres de gérmenes tienen una reacción hipotalámica-hipofisiaria-suprarrenal exagerada al estrés comparada con ratones convencionales, que se puede revertir por monoasociación con *B. infantis* lo que sugiere una interferencia entre las bacterias del intestino y el cerebro (Sudo et al., 2004). La permeabilidad intestinal aumentada, la translocación bacteriana y la activación de la ruta de TLR4 se han implicado como un enlace entre trastornos psicológicos y enfermedades somáticas, incluyendo trastornos del estado de ánimo, trastornos cognitivos, y síndrome de fatiga crónica. Se encontró expresión elevada de marcadores de la ruta de TLR4 en pacientes diagnosticados con trastorno depresivo mayor, acompañando a translocación bacteriana aumentada a través de la barrera intestinal (Keri et al., 2014). Las bacterias intestinales Gram negativas translocadas y LPS activan células inmunitarias para provocar respuestas de IgA e IgM que producen amplificaciones progresivas de rutas inmunitarias asociadas con neuroinflamación y neuroprogresión y con el inicio de síntomas melancólicos, por ejemplo, anhedonia, anorexia, pérdida de peso, retraso psicomotor, ansiedad y fatiga (Maes et al., 2012).

Resistencia eléctrica transepitelial (TER)

Las propiedades barrera de las monocapas de células epiteliales está determinadas a un gran nivel por TJ localizadas en el espacio intracelular donde forman un sello entre el dominio de membrana apical y basolateral y regulan el paso paracelular de moléculas. La función barrera no es estática, sino que se puede modular deliberadamente por

exposición a estímulos específicos. La dinámica resultante de la red de TJ se puede seguir de forma conveniente midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TER). Caco-2 es una línea celular bien establecida derivada de adenocarcinoma de colon humano que se usa comúnmente como un modelo de permeabilidad intestinal. Cuando monocapas de Caco-2 completamente diferenciadas forman TJ que restringen la transferencia de iones y, por tanto, producen una resistencia eléctrica a través de la monocapa.

Matriz citométrica de esferas BD™ (CBA)

Los tejidos linfoides asociados a la mucosa que recubre el aparato digestivo humano contienen una red de células inmunitarias. Las células dendríticas (CD) rigen el equilibrio entre inmunidad y tolerancia por muestreo de los contenidos intestinales e inician las respuestas inmunitarias apropiadas a antígenos lumenales mediante señalización de receptor de reconocimiento de patrón, secreción de citoquinas, y su capacidad para migrar y presentar antígenos a células T indiferenciadas en ganglios linfáticos drenantes. En homeostasis, las CD en la mucosa intestinal están condicionadas por los microorganismos comensales para fomentar la proliferación de células T reguladoras (Treg) Fxp3⁺, fuertes productoras de IL-10 antiinflamatoria que contribuye a la tolerancia intestinal. Los antígenos lumenales que se translocan a través de la capa de células epiteliales se unen a receptores de reconocimiento de patrón expresados en las CD y activan rutas de señalización que dan como resultado la producción y secreción de una amplia gama de quimioquinas y citoquinas con distintos efectos inflamatorios. En este contexto, la secreción por CD de citoquinas inflamatorias tal como TNF α , IL-1b, IL-6 e IL-12 es central para las respuestas inflamatorias agudas, innatas que implican la atracción de neutrófilos y macrófagos al sitio de infección. Además, las CD son jugadores centrales en la regulación de las respuestas inmunitarias adaptativas, por tanto, la modulación de las CD hacia un fenotipo que secreta IL-10 contribuye a la inducción de respuestas de Treg que fomentan la tolerancia intestinal (Smith et al., 2014). Los inmunoensayos multiplexados basados en los principios de citometría de flujo permiten la determinación simultánea de numerosas proteínas solubles en volúmenes de muestra muy pequeños. La combinación de alto rendimiento y precisión impresionante, sensibilidad, y reproducibilidad hacen estas técnicas experimentales muy relevantes para fines de cribado donde la cuantificación rápida de múltiples compuestos es crítica.

El modelo de colitis por DSS

El modelo de colitis por sulfato sódico de dextrano (DSS) en roedores presenta inflamación colónica incontrolada. Puede de muchas maneras parecerse a la EII, incluyendo colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn, para la que se ha mostrado que la incidencia y prevalencia mundiales aumentan (Molodecky et al., 2012). Los mecanismos patofisiológicos subyacentes de la colitis por DSS incluye la alteración inicial de la función barrera intestinal seguido por inflamación y pérdida de criptas (Cooper et al., 1993; Iwaya et al., 2012; Poritz et al., 2007). Los síntomas de la enfermedad en colitis por DSS corresponden a lo que se observa en CU humana, incluyendo pérdida de peso corporal, diarrea y pérdida de sangre en heces (Herias et al., 2005). El mecanismo exacto por el que DSS induce colitis no se ha elucidado, sin embargo, se ha reconocido que DSS se asocia con ácidos grasos de cadena media presentes en la luz colónica y forma vesículas capaces de fusionarse con las membranas de colonocitos lo que puede producir la activación de rutas de señalización inflamatorias en el citoplasma (Laroui et al., 2012). Además, hallazgos recientes indican que el espesor de la capa de moco colónico interno, normalmente desprovista de bacterias, disminuye y se vuelve permeable a las bacterias solo 15 minutos después de la exposición a DSS. A las 12 horas después de la exposición a DSS se observó la interacción bacteriana con la capa epitelial que podría activar inflamación (Johansson et al., 2010). Como en roedores sanos, las bacterias están claramente separadas de la capa colónica epitelial en seres humanos sanos, mientras que en pacientes de colitis ulcerosa con inflamación aguda las bacterias penetran la capa de moco interna (Johansson et al., 2014), lo que indica patología común entre el modelo de colitis inducida por DSS y trastornos GI inflamatorios humanos.

Uno de los sucesos tempranos de la patología inducida por DSS es la pérdida de ZO-1 de uniones estrechas y permeabilidad intestinal aumentada, que precede a la inflamación intestinal (Poritz et al., 2007), que podría indicar que el DSS altera la función barrera intestinal, lo que permite la penetración de toxinas, antígenos y bacterias enteras o fracciones de bacterias que alimentan la inflamación. Esto también se corresponde bien con hallazgos humanos donde la permeabilidad intestinal está comprometida junto con disminución marcada en genes de TJ durante el estado inflamado intestinal (Koltun et al., 1998; Gassler et al., 2001). De forma interesante, la disminución de genes de TJ como ZO-1, claudina-1, JAM, beta-catenina y ocludina en áreas de mucosa colónica que transmigran de forma activa neutrófilos se vio en pacientes de colitis ulcerosa (Kucharzik et al., 2001) lo que sugiere una conexión estrecha entre la alteración en las TJ e inflamación.

Las bifidobacterias, lactobacilos y mezclas han mostrado eficacia en colitis inducida por DSS en ratones y ratas (Chen et al., 2009; Kim et al., 2010; Geler et al., 2007; Mennigen et al., 2009). Se han propuesto diferentes modos de acción de probióticos que implican reforzamiento de la barrera epitelial intestinal y modular las rutas inflamatorias tal como señalización de citoquinas. Por ejemplo, *Lactobacillus reuteri* inhibió la translocación bacteriana del intestino a los ganglios linfáticos mesentéricos además del índice de actividad de la enfermedad (Dicksveld et al., 2012) que podría sugerir función barrera aumentada como parte del mecanismo de disminución de la gravedad de la enfermedad. Además, se mostró que *E. coli* Nissle 1917 disminuía la colitis inducida por DSS por reforzamiento de la permeabilidad intestinal y expresión de proteínas de TJ tal como ZO-1 (Ukena et al., 2007). Aunque este modo de acción no se ha verificado directamente en seres humanos hasta ahora se ha descrito que *E. coli* Nissle 1917 es eficaz en prevenir la

recaída de la colitis ulcerosa (Kruis et al., 1997; Kruis et al., 2004) lo que indica similitudes en los mecanismos entre roedores y seres humanos.

También se mostró que las modulaciones de las rutas inflamatorias durante la colitis inducida por DSS mediante el uso de probióticos inhibían de forma eficaz la gravedad de la enfermedad. Yao y colaboradores transfectaron un *B. longum* con un plásmido que contiene IL-10 y dosificaron las bacterias a ratones expuestos a DSS. Las bacterias transfectadas aliviaron los síntomas de colitis al disminuir la ruta de NF-κB que de otra manera llevaría a la producción de varias citoquinas proinflamatorias (Yao et al., 2011). Miyauchi y otros, por otra parte, mostraron que *B. longum* subsp. *infantis* era capaz de reducir la gravedad de la colitis al suprimir la expresión de citoquinas específicas de T cooperadores de tipo 1 (T_H1) y T cooperadores productores de IL-17 (T_H17) en tejido colónico (Miyauchi et al., 2013).

Se divulgan cepas de *Bifidobacterium adolescentis* en el estado de la técnica:

Mitsuoka T et al, "Ecology of the bifidobacteria", The American Journal of Clinical Nutrition, vol. 30, no. 11, 1 de Noviembre, 1977, páginas 1799-1810

N. P. Shah: "Bacteria, Beneficial/Bifidobacterium spp.: Morphology and Physiology: En: John W Fuquay; Patrick J. Fox; Paul L H McSweeney: "Encyclopedia of dairy sciences", 1 de enero, 2011, Elsevier/Academic Press, Ámsterdam; Boston, MA, XP008178101

Yaeshima T et al, "The diversity in phenotypic characteristics of Bifidobacterium longum", Milchwissenschaft, vol 47, no. 4, 1 de enero, 1992, páginas 212-214

Documento WO 02/38798 (Raisio Yhtymä Oy, Bioferme Oy, Salminen Seppo, Ouweha, 16 de Mayo, 2002

También se divulgan en el estado de la técnica cepas de *Bifidobacterium adolescentis* con efecto inmunoestimulador. Por ejemplo: T. Pozo-Rubio et al: "Immunostimulatory effect of faecal Bifidobacterium species of breast-fed and formula-fed infants in a peripheral blood mononuclear cell/Caco-2 co-culture system", British Journal of Nutrition, vol. 106, no. 08, 31 de Mayo, 2011, páginas 1216-1223, divulga una cepa de *Bifidobacterium adolescentis* que induce producción de citoquinas (entre otras IL-10) de CMSP y células Caco-2 (cf. resumen; figura 1).

Compendio de la invención

El problema que se va a resolver por la presente invención es la provisión de cepas adicionales de *Bifidobacterium adolescentis* con efecto antiinflamatorio. Las propiedades específicas de la cepa de *Bifidobacterium adolescentis* depositada como DSM 29103 no se podrían esperar del estado de la técnica.

La invención se refiere a cepas aisladas de *Bifidobacterium adolescentis*. Entre los aislados bacterianos que pertenecen a *B. adolescentis*, cuatro subgrupos taxonómicos, no previamente descritos, se pueden identificar por características genómicas y fenotípicas. Estos subgrupos taxonómicos son claramente diferentes de la cepa tipo (*B. adolescentis* ATCC15703^T). Los cuatro subgrupos taxonómicos de *B. adolescentis* se diferencian de la cepa tipo de *B. adolescentis* por firmas específicas en las secuencias génicas de ARNr 16S. Las firmas del ARNr 16S también diferencian los cuatro subgrupos entre sí. Como no existen definiciones taxonómicas exactas por debajo del nivel de especie, estos subgrupos se han denominado riboespecies 2, 3, 4 y 5. La riboespecie 1 es *B. adolescentis* ATCC15703^T.

El análisis de la secuencia de ARN ribosómico de 16S es un elemento central en el enfoque polifásico para la clasificación bacteriana y para delinear taxones de especies filogenéticamente vecinas. Sin embargo, a similitudes de secuencia génica de ARNr 16S por encima del 98,7% este método no es capaz de discriminar de forma no ambigua taxones únicos y se recomienda determinar el parentesco ADN-ADN. Como la similitud de secuencia de las cepas aisladas respecto a la cepa tipo estaban todas por encima del 99,87% se decidió determinar el parentesco ADN-ADN. Los estudios de reasociación de ADN-ADN de cepas representativas de cada subgrupo con la cepa tipo de *B. adolescentis* mostraron más del 70% de parentesco ADN-ADN entre las cepas representativas y la cepa tipo, y por tanto confirmó que las cepas representativas en efecto pertenecen a la especie *B. adolescentis*. Estos datos combinados mostraron que las cepas aisladas son subgrupos novedosos de *B. adolescentis*, que no se han descrito previamente.

Los cuatro subgrupos se diferencian además de *B. adolescentis* ATCC15703^T por secuencias de ADN que codifican proteínas (CDS) presentes solo en las riboespecies 2, 3, 4, y 5, pero no en la cepa tipo. Las secuencias codificantes de proteínas únicas discriminan las riboespecies individuales entre sí, mientras que otras secuencias codificantes de proteínas son únicas para las riboespecies 2 + 5, o las riboespecies 3 + 4.

La capacidad para fermentar almidón y glucógeno discrimina las riboespecies de *B. adolescentis* ATCC15703^T, así como las riboespecies 2 + 5 de las riboespecies 3 + 4. Por tanto, las riboespecies 2 y 5, pero no *B. adolescentis* ATCC15703^T y las riboespecies 3 + 4, fermentan glucógeno como la única fuente de carbono, mientras que las riboespecies 2 + 5 y *B. adolescentis* ATCC15703^T, pero no las riboespecies 3 + 4, pueden fermentar almidón.

Por tanto, se han encontrado cuatro riboespecies (subgrupos taxonómicos) de *B. adolescentis* que se pueden diferenciar de forma no ambigua de *B. adolescentis* ATCC15703^T y entre sí por firmas de secuencia génica de ARNr 16S específicas, secuencias de ADN codificantes de proteínas específicas y la capacidad para fermentar glucógeno y almidón.

La cepa aislada de *Bifidobacterium adolescentis* de la invención tiene una secuencia génica ribosómica de 16S que comprende SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 7; y SEQ ID NO: 10.

Un denominador común de un huésped de enfermedades y afecciones humanas es una función barrera intestinal alterada y activación proinflamatoria del sistema inmunitario de la mucosa debido a la translocación aumentada de bacterias y LPS a través del epitelio intestinal. Las enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, afecciones inflamatorias intestinales tales como EII y SII, enfermedades hepáticas incluyendo EHGNA, EHNA, cirrosis, y enfermedad hepática alcohólica, trastornos metabólicos, tal como síndrome metabólico, resistencia a insulina, diabetes de tipo 2, obesidad, aterosclerosis cardiovascular, enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, enfermedad celiaca, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple y artritis reumatoide, y afecciones mentales incluyendo, trastornos depresivos mayores, un trastornos del estado de ánimo, un trastorno cognitivo, síndrome de fatiga crónica, y ansiedad.

Las cepas de las riboespecies 2, 3, 4, y 5 de *B. adolescentis* son capaces de mejorar la función barrera intestinal y/o inducir elementos reguladores de la respuesta inmunitaria.

Algunas cepas de las riboespecies 2, 3, 4, y 5 de *B. adolescentis* aumentan la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de monocapas de células Caco-2 después de tratamiento de 10 h a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento, y, por tanto, mejoran la función barrera intestinal.

Algunas cepas de las riboespecies 2, 3, 4, y 5 de *B. adolescentis* inducen secreción de > 200 pg/ml de IL-10 y/o inducen una proporción IL-10:IL-12 > 1, cuando se coincuban con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, y por tanto provocan una respuesta inmunitaria antiinflamatoria.

Algunas cepas de las riboespecies 2, 3, 4, y 5 de *B. adolescentis* aumentan la TER en monocapas de células Caco-2 a > 120% relativa a la TER del inicio del tratamiento y/o inducen la secreción de más de 200 pg/ml de IL-10 y/o inducen una proporción IL-10:IL-12 > 1, y pueden, por tanto, tanto mejorar la función barrera intestinal como provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria.

Prevención, alivio de síntomas, y tratamiento de enfermedades o afecciones con una función barrera intestinal alterada subyacente y/o activación proinflamatoria de la mucosa puede ser posible con cepas de las riboespecies 2 de *B. adolescentis* que mejoran la función barrera intestinal determinada por la capacidad de aumentar la TER en monocapas de células Caco-2 a > 120% relativa a la TER del inicio del tratamiento, inducir una respuesta inmunitaria antiinflamatoria determinada por la capacidad de inducir secreción de > 200 pg/ml de IL-10 cuando se coincuban con células dendríticas derivadas de CMSP humanas e inducir una proporción IL-10:IL-12 > 1, cuando se coincuban con células dendríticas derivadas de CMSP humanas.

Divulgación detallada de la invención

Una manera de caracterizar cepas de *Bifidobacterium adolescentis* es su capacidad para fermentar y crecer en las fuentes de hidratos de carbono específicas esbozadas en el ejemplo 4. La tabla 2 proporciona una visión general de las características de crecimiento de un número de cepas de *B. adolescentis*. Las cepas proporcionadas en la tabla solo se deben considerar ejemplos no limitantes de cepas.

Como es evidente de la tabla un número de cepas tienen la capacidad de fermentar D-ribosa, pero no D-sorbitol, entre otras BIF084 (DSM 29106), BIF046 (DSM 29111), BIF106 (DSM 29107), BIF123 (DSM 29102) BIF129 (DSM 29104), y BIF038 (DSM 29103).

Un fin de la presente invención es proporcionar cepas de *B. adolescentis* que son capaces de mejorar la función barrera intestinal y provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria ya que estas características están relacionadas con un número de enfermedades o afecciones con una función barrera intestinal alterada subyacente y/o activación proinflamatoria de la mucosa.

Como es evidente de los ejemplos algunas cepas de *B. adolescentis* aumentan la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de monocapas de células Caco-2 después de tratamiento de 10 h a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento, y por tanto, mejoran la función barrera intestinal.

Algunas cepas de *B. adolescentis* inducen secreción de > 200 pg/ml de IL-10 y/o inducen una proporción IL-10:IL-12 > 1, cuando se coincuban con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, y por tanto provocan una respuesta inmunitaria antiinflamatoria.

En una forma de realización, las cepas aisladas de la invención son capaces de i) aumentar la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de monocapas de células Caco-2 después de tratamiento de 10 h a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento, ii) inducir secreción de > 200 pg/ml de IL-10 cuando se coincuran con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, y iii) inducir una proporción IL-10:IL-12 > 1, cuando se coincuran con células dendríticas derivadas de CMSP humanas.

La tabla 9 proporciona un resumen de los datos *in vitro* de cepas de *B. adolescentis* seleccionadas que cumplen una o más de las características anteriores. Como es evidente de la tabla 9 todas las cepas provocan una respuesta inmunitaria antiinflamatoria, y DSM 29102, DSM 29107 y DSM 29103 mejoran además la barrera intestinal.

La invención se refiere a una cepa aislada de *Bifidobacterium adolescentis* de la invención o un producto probiótico de la invención para uso en la prevención, alivio de síntomas, y/o tratamiento de una afección inflamatoria intestinal tal como EII o SII, una enfermedad hepática tal como EHNA, EHNA, cirrosis, o enfermedad hepática alcohólica, un trastorno metabólico tal como síndrome metabólico, resistencia a insulina, diabetes de tipo 2, obesidad, aterosclerosis cardiovascular, una enfermedad autoinmunitaria tal como enfermedad celiaca, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple o artritis reumatoide, y/o una afección mental tal como trastorno depresivo mayor, un trastorno del estado de ánimo, un trastorno cognitivo, síndrome de fatiga crónica, o ansiedad.

Los ejemplos de síntomas que se pueden prevenir o aliviar por la administración de una cepa de *Bifidobacterium adolescentis* de la invención son anorexia, sangre en heces, cólicos y dolor abdominal, diarrea, estreñimiento, o episodios alternantes de ambos.

El ejemplo 8 proporciona los resultados del efecto de una de las cepas de la invención, *B. adolescentis* DSM 29103, sobre colitis inducida por DSS que indica que *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) previene y/o inhibe la inflamación y el daño tisular en el aparato digestivo, así como inhibe diarrea e induce un efecto que fomenta la salud global en términos de peso corporal. Basado en estos hallazgos se contempla que DSM 29103 y otras cepas que tienen propiedades similares como se esboza en el presente documento serán capaces de prevenir o aliviar al menos algunos de los síntomas gastrointestinales esbozados anteriormente.

Aunque las cepas de la invención se consideran que son de relevancia particular para su uso para seres humanos, el uso para animales tales como mascotas, por ejemplo, gatos, perros y caballos, también está incluido dentro del ámbito de la presente invención.

La cepa aislada de *Bifidobacterium adolescentis* se puede caracterizar en que a) la secuencia comprende SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 7; y SEQ ID NO: 10, y b) la secuencia codifica una proteína que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia a al menos una proteína seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 12, 13, 14, 18, y 19.

En una forma de realización de b) la secuencia codifica una proteína que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia a al menos una proteína seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 12, 13, y 14. En una forma de realización adicional de b) la secuencia codifica una proteína que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia a al menos una proteína seleccionada de cualquiera de SEQ ID NO: 18 y 19.

En formas de realización específicas, la cepa comprende secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas que tienen al menos el 90% de identidad a al menos una proteína seleccionada de SEQ ID NO 12 a 14, 18 o 19, tal como secuencias que codifican proteínas que tienen al menos el 91% de identidad, al menos el 92% de identidad, al menos el 93% de identidad, al menos el 94% de identidad, al menos el 95% de identidad, al menos el 96% de identidad, al menos el 97% de identidad, al menos el 98% de identidad, o al menos el 99% de identidad a una o más de SEQ ID NO 12 a 14, 18 o 19. En una forma de realización, la cepa incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende una o más de SEQ ID NO 12 a 14, 18 o 19.

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos se determina usando el método de alineamiento de secuencias de ClustalW versión 2 (ClustalW2) para secuencias de nucleótidos (ADN) o secuencia de aminoácidos (proteína), respectivamente, alineamiento por pares como se describe por Larkin *et al.* (2007, Bioinformatics 23:2947-2948) y Goujon *et al.* (2010, Nucleic acids research 38 Supl:W695-699) con parámetros por defecto (tipo de alineamiento: lento; Matriz de ponderación de ADN: IUB; Matriz de ponderación de proteína: Gonnet; Apertura de hueco: 10; Extensión de hueco: 0.1), disponible en www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/.

Una forma de realización se refiere a cepas aisladas que son capaces de crecer en almidón o glucógeno como la única fuente de hidratos de carbono. Algunas de estas cepas se caracterizan en que comprenden SEQ ID NO: 2, 4, 7 y 10. Los ejemplos de tales cepas son DSM 29103 y cepas derivadas de la misma.

La presente invención se refiere a una cepa aislada de *Bifidobacterium adolescentis* depositada con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el No. de registro DSM 29103 y a una cepa mutante de DSM 29103 que es capaz de i) aumentar la resistencia

eléctrica transepitelial (TER) de monocapas de células Caco-2 después de tratamiento de 10 h a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento, ii) inducir secreción de > 200 pg/ml de IL-10 cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, y iii) inducir una proporción IL-10:IL-12 > 1 , cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas.

5 Una "cepa" bacteriana como se usa en el presente documento se refiere a una bacteria que permanece genéticamente sin cambios cuando crece o se multiplica. Se incluye la multiplicidad de bacterias idénticas. "Cepa de tipo salvaje" se refiere a la forma no mutada de una bacteria, como se encuentra en la naturaleza.

10 En el presente contexto, el término "cepa derivada" se debe entender como una cepa derivada de una cepa madre por medio de, por ejemplo, ingeniería genética, radiación y/o tratamiento químico, y/o selección, adaptación, cribado, etc. En formas de realización específicas la cepa derivada es un mutante funcionalmente equivalente, por ejemplo, un mutante que tiene sustancialmente las mismas propiedades, o mejoradas, (por ejemplo, respecto a propiedades probióticas) que la cepa madre. El término "cepa derivada" incluye una cepa obtenida al someter una cepa de la invención a cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado incluyendo tratamiento con un mutágeno químico tal como metanosulfonato de etano (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), luz UV o a un mutante que se produce espontáneamente.

20 Una "bacteria mutante" o una "cepa mutante" se refiere a una bacteria mutante natural (espontanea, se produce de forma natural) o una bacteria mutante inducida que comprende una o más mutaciones en su genoma (ADN) que están ausentes en el ADN de tipo salvaje. Un "mutante inducido" es una bacteria donde la mutación se indujo por tratamiento humano, tal como tratamiento con cualquier tratamiento de mutagenización convencionalmente usado incluyendo tratamiento con mutágenos químicos, tal como un mutágeno químico seleccionado de (i) un mutágeno que se asocia con o se incorpora al ADN tal como un análogo de base, por ejemplo, 2-aminopurina o un agente intercalante tal como ICR-191, (ii) un mutágeno que reacciona con el ADN incluyendo agentes alquilantes tal como nitrosoguanidina o hidroxilamina, o metanosulfonato de etano (EMS) o N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina (NTG), radiación UV o gamma etc. En contraste, un "mutante espontáneo" o "mutante natural" no ha sido mutagenizado por el hombre.

30 Una cepa derivada, tal como un mutante, puede haber sido sometida a varios tratamientos de mutagenización (se debe entender un único tratamiento una etapa de mutagenización seguida por una etapa de selección/cribado), pero típicamente no se llevan a cabo más de 20, no más de 10, o no más de 5, tratamientos. En formas de realización específicas de cepas derivadas, tal como mutantes, menos del 1%, menos el 0,1%, menos del 0,01%, menos del 0,001% o incluso menos del 0,0001% de los nucleótidos en el genoma bacteriano se han cambiado (tal como por sustitución, inserción, delección o una combinación de las mismas) comparado con la cepa madre.

35 Las bacterias mutantes como se han descrito anteriormente son no-OMG, es decir, no modificadas por tecnología de ADN recombinante. Como alternativa al método preferido anterior de proporcionar el mutante por mutagénesis aleatoria, también es posible proporcionar tal mutante por mutagénesis dirigida, por ejemplo, usando técnicas de PCR apropiadamente diseñadas o usando un elemento transponible que es integrable en replicones bacterianos.

40 Cuando el mutante se proporciona como un mutante que se produce espontáneamente la cepa de tipo salvaje anterior se somete a la etapa de selección sin ningún tratamiento de mutagenización precedente.

45 Una cepa mutante de la cepa de *B. adolescentis* con número de registro DSM 29103 se puede obtener al someter a la cepa a tratamiento de mutagenización como se describe para obtener cepas mutantes y seleccionar para cepas mutantes que tienen las propiedades deseadas. Alternativamente, se realiza una selección para mutantes espontáneos.

50 Una forma de realización de la invención se refiere a una cepa aislada de *Bifidobacterium adolescentis* seleccionada del grupo que consiste en DSM 29103 y un mutante de dicha cepa depositada que es capaz de i) aumentar la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de monocapas de células Caco-2 después de tratamiento de 10 h a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento, ii) inducir secreción de > 200 pg/ml de IL-10 cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, y iii) inducir una proporción IL-10:IL-12 > 1 , cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas.

55 Mediante el término "un producto probiótico" se quiere decir cualquier producto que comprenda una bacteria probiótica. Un producto probiótico que comprende una cepa según la invención se puede administrar en forma de un producto alimenticio o un suplemento nutricional. El *Bifidobacterium adolescentis* se puede, por ejemplo, incorporar en un producto lácteo, tal como leche, y en particular un producto lácteo fermentado, opcionalmente en combinación con otras bacterias del ácido láctico, por ejemplo, con fermentos de yogur, o en otros productos alimenticios tal como una barra para picar, o bebidas tal como zumo.

60 El producto probiótico que comprende *Bifidobacterium adolescentis* también se puede proporcionar como un suplemento nutricional en forma de un polvo, comprimido, tal como una tableta o un comprimido efervescente, pastilla, cápsula, chicle, en bolsitas individuales o como un componente de una composición más general tal como gotas de

aceite, una emulsión o una pasta, o en cualquier otro soporte adecuado determinado por los expertos en la materia que es un soporte eficaz para microorganismos vivos.

5 Las bacterias probióticas son microorganismos vivos y esto puede ser un desafío durante la formulación y almacenamiento de los productos probióticos. Las bacterias probióticas son especialmente sensibles a la temperatura, contenido de humedad, y oxígeno y otros ingredientes en una matriz de formulación. Se prefiere que las bacterias de la invención permanezcan viables después de almacenamiento prolongado para que las bacterias impartan su efecto beneficioso tras la administración del producto probiótico de la invención al individuo en necesidad de ello.

10 Mediante el término “viable” se quiere decir que la célula está viva y es capaz de formar una colonia en una placa Petri durante plaqueado por vertido o plaqueado por extensión. El número de bacterias probióticas viables se determina como el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por métodos de placa por vertido o placa por extensión con incubación en condiciones adecuadas para el crecimiento de la(s) cepa(s) probiótica(s). Mediante este método se contarán las células capaces de crecer y formar colonias. Cuando se da un número en la presente especificación y reivindicaciones, se debe entender como UFC/g a menos que el contexto indique otra cosa. En algunas formas de realización, el producto probiótico de la presente invención comprende al menos 10^9 UFC/unidad al final de la vida útil (EOS). El final de la vida útil puede ser al menos 3 meses, tal como al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, o al menos 24 meses.

20 Usar una baja actividad acuosa asegura una mejor supervivencia de las bacterias probióticas durante el almacenamiento del producto.

25 La actividad acuosa (a_w) se define como la presión de vapor parcial de agua en una composición a una temperatura especificada dividida por la presión de vapor parcial del estado estándar de agua a la misma temperatura. La actividad acuosa, por tanto, actúa como una medida de la cantidad de agua libre (sin unir) en una composición. Se puede calcular como:

$$a_w = p/p_0$$

30 donde p es la presión de vapor parcial de agua en la composición y p_0 es la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. En productos probióticos en general se prefiere que la actividad acuosa (a_w) esté en el intervalo de 0,1-0,2.

35 Las bacterias probióticas que se van a usar en los productos probióticos de la invención en general se congelan o liofilizan. Para obtener una alta viabilidad las bacterias se mezclan con un crioprotector antes de que se congelen o liofilicen.

40 El término “un crioprotector” indica una sustancia que es capaz de mejorar la supervivencia durante la congelación y/o secado para mejorar la estabilidad de almacenamiento de las bacterias. El crioprotector usado en el presente documento en general comprende un sacárido.

45 El sacárido puede ser un mono-, di-, oligo- o polisacárido, o una mezcla de al menos dos sacáridos. La composición puede incluso comprender tres, cuatro o más sacáridos. En algunas formas de realización, la composición comprende una mezcla de al menos un mono- o disacárido y al menos un oligosacárido. En otras formas de realización, la composición comprende una mezcla de al menos un mono- o disacárido y al menos un polisacárido.

50 Los monosacáridos útiles en el producto probiótico de la presente invención incluyen glucosa (también conocida como dextrosa), fructosa, ribosa y galactosa. Los disacáridos útiles en el producto probiótico de la presente invención incluyen entre otros, sacarosa, trehalosa, maltosa y lactosa. La composición puede comprender uno o más mono- o disacáridos, tal como uno, dos o tres o incluso más sacáridos diferentes.

55 En algunas formas de realización el producto probiótico de la invención comprende al menos un oligosacárido. Un oligosacárido es un polímero de sacárido que contiene de tres a nueve monosacáridos. Los fructooligosacáridos (FOS), que se encuentran en muchos vegetales, consisten en cadenas cortas de moléculas de fructosa. Los galactooligosacáridos (GOS), que también se dan de forma natural, consisten en cadenas cortas de moléculas de galactosa. Estos compuestos pueden ser digeridos solo parcialmente por los seres humanos. La composición puede comprender uno, dos o incluso más oligosacáridos diferentes.

60 En algunas formas de realización el producto probiótico de la invención comprende al menos un polisacárido. Los polisacáridos son moléculas glucídicas poliméricas compuestas de más de diez unidades de monosacárido unidas por enlaces glucosídicos y en hidrólisis dan los monosacáridos u oligosacáridos constituyentes. Varían en estructura desde lineal a muy ramificado. Los ejemplos de polisacáridos que se van a usar en un producto probiótico de la invención son maltodextrina, ciclodextrina, alginato, pectina, quitosano, almidón e inulina. La composición puede comprender uno, dos, tres o incluso más polisacáridos diferentes.

65

Como un ejemplo, el crioprotector puede comprender una mezcla de un disacárido, tal como sacarosa o glucosa, y un polisacárido, tal como maltodextrina.

La adición de oligo- o polisacáridos tal como FOS, GOS, inulina y otros polisacáridos puede ayudar en la reducción de la actividad acuosa y tiene la ventaja adicional de que los oligo- y polisacáridos no son tan dulces como los mono- y disacáridos y además añaden fibras a la composición.

Los polioles (alcoholes de azúcar) tienen la fórmula general $\text{HOCH}_2(\text{CHOH})_n\text{CH}_2\text{OH}$. Se añaden comúnmente a los alimentos debido a su menor contenido calórico y menor dulzor que los azúcares. Además, no se rompen por bacterias en la boca o se metabolizan a ácidos, y por tanto no contribuyen al deterioro de los dientes.

La composición puede comprender además al menos un poliol tal como eritriol, inositol, isomalt, manitol, maltitol, sorbitol, o xilitol, o una mezcla de los mismos. Los polioles preferidos son xilitol, sorbitol y manitol. La composición puede comprender uno, dos, tres o incluso más polioles diferentes.

El crioprotector puede comprender además un péptido, proteína, hidrolizado de proteína o una mezcla de los mismos. Los ejemplos de péptidos y proteínas que se van a usar en el presente documento son caseína, guisante, suero, albúmina, proteína de soja, ácido glutámico o gelatina, y cualquier aislado o hidrolizado de los mismos. También pueden estar presentes otros aditivos, por ejemplo, antioxidantes tal como ascorbato, citrato de sodio, galato de propilo.

La presente invención también se refiere a un probiótico que comprende una cepa aislada según la invención y un crioprotector, tal como un sacárido.

Se pueden usar combinaciones de varias especies o cepas de bacterias probióticas, es decir, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o incluso más de las especies o cepas enumeradas en el presente documento. En formas de realización actualmente preferidas, solo una, dos, tres, cuatro o cinco cepas diferentes están presentes en un producto probiótico según la invención.

Además de las bacterias probióticas, uno o más de otros ingredientes activos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o más ingredientes activos seleccionados del grupo que consiste en vitaminas tal como vitamina A, D, E, K2, C, B2, B6, B12, biotina, niacina, ácido fólico; minerales tal como cinc, selenio, cromo, cobre, calcio, cloruro; y extractos vegetales tal como extracto/zumo de arándano rojo, jalea real se podrían incluir en el producto probiótico.

Se contempla que para obtener un efecto terapéutico, el producto probiótico se debe administrar a diario durante al menos una semana, y ventajosamente durante un periodo más largo tal como al menos 2 semanas, al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 9 semanas, preferiblemente al menos 12 semanas, en una cantidad correspondiente a al menos 10^6 UFC, tal como al menos 10^7 UFC, preferiblemente al menos 10^8 UFC, en general entre 10^9 UFC y 10^{12} UFC de *Bifidobacterium adolescentis*.

En los presentes estudios el producto probiótico comprende *Bifidobacterium adolescentis* como el ingrediente activo. *Bifidobacterium adolescentis* se puede usar como el único ingrediente activo. Alternativamente, el producto probiótico como se describe en el presente documento puede comprender compuestos adicionales de interés tal como otras cepas bacterianas, vitaminas, prebióticos, fibras u otros compuestos que pueden tener un efecto saludable beneficioso.

Las otras bacterias se pueden seleccionar del grupo que consiste en *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lactobacillus acidophilus*.

Por tanto, la composición puede comprender además una o más cepa(s) de una bacteria del ácido láctico seleccionadas del grupo que comprende *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* depositada como DSM 15954, *Lactobacillus acidophilus* depositada como DSM 13241, *Lactobacillus rhamnosus* depositada como ATCC 53103, *Lactobacillus rhamnosus* depositada como ATCC 55826, *Lactobacillus reuteri* depositada como ATCC 55845, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada como ATCC 55544, *Lactobacillus paracasei* depositada como LMG-17806, *Streptococcus thermophilus* depositada como DSM 15957, *Lactobacillus fermentum* depositada como NM02/31074, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* depositada como CCTCC M204012.

El uso de los términos “un” y “una” y “el” y “la” y referentes similares en el contexto de describir la invención (en especial en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en el presente documento o claramente se contradiga por el contexto. Los términos “comprender”, “tener”, “incluir” y “contener” se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan “incluir, pero sin limitar a”) a menos que se indique lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en

el presente documento se pretende solamente que sirva como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que está dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la especificación como si enumeraran individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o de otra manera claramente se contradiga por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, se pretende solamente para iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el ámbito de la invención a menos que se reivindique de otra manera. El lenguaje en la especificación no se debe interpretar como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

10 Leyendas de las figuras

Figura 1. Dendograma de secuencias de ADNr 16S parciales de cepas similares a *B. adolescentis* generado por el método de unión de vecinos. También se incluye la cepa tipo *B. adolescentis* ATCC 15703^T.

Figura 2. Alineamiento parcial de secuencias consenso de ADNr 16S de cepas similares a *B. adolescentis* y la cepa tipo *B. adolescentis* ATCC 15703^T. Solo se muestran regiones variables. Los números son numeración de *E. coli*. Las secuencias firma que diferencian las 4 riboespecies y la cepa tipo están indicadas por sombreado.

Figura 3. Resistencia eléctrica transepitalial (TER) en monocapas de células Caco-2 después de estimulación con cepas similares a *B. adolescentis*. Inicialmente confluentes, las monocapas de Caco-2 diferenciadas por completo cultivadas en membranas Transwell se colocaron en un CellZscope. Las monocapas se incubaron con bacterias durante 16 h y se midió la TER cada hora. Los resultados se muestran como TER (%) relativa a la TER en la última medida antes del inicio de la incubación.

Figura 4. Resistencia eléctrica transepitalial (TER) en monocapas de células Caco-2 después de estimulación con cepas similares a *B. adolescentis*. Inicialmente confluentes, las monocapas de Caco-2 diferenciadas por completo cultivadas en membranas Transwell se colocaron en un CellZscope y TER se midió automáticamente cada hora durante la noche. Después de 10 h, TER había alcanzado una meseta y este punto de tiempo se usó para comparar la estimulación de TER por cepas similares a *B. adolescentis*. Las barras indican TER (%) después de 10 h de incubación relativa a la TER en la última medida antes del inicio de la incubación.

Figura 5. Expresión de IL-10 y la proporción de expresión IL-10:IL-12 en células dendríticas (CD) derivadas de CMSP humana después de la estimulación con cepas similares a *B. adolescentis*. Las CD se estimularon con bacterias a una proporción de 100:1 (bacterias:células) durante 20 h y se midió la secreción de IL-10 e IL-12 mediante el kit de matriz citométrica de esferas (CBA) de citoquinas inflamatorias humanas. Las medidas de citoquinas se normalizaron a la expresión media para cada citoquina y cada donante. Las barras indican secreción de IL-10 en el eje izquierdo, las estrellas indican proporción IL-10:IL-12 en el eje derecho.

Figura 6. Peso corporal de ratas en un modelo de colitis por DSS de enfermedad intestinal inflamatoria. Después de dos semanas de dosificación de *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103), o vehículo por alimentación forzada oral, se introdujo DSS al 3% en el agua de beber durante 9 días. Los animales que no recibieron DSS sirvieron como controles sanos; DSS, recibieron vehículo y DSS; DSS+BIF038 recibieron *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103) y DSS. El peso corporal se registró a diario.

Control sano: ■■ ; DSS: ◆◆ ; DSS + BIF038: ▼▼ .

Figura 7. Puntuaciones de consistencia de las heces de ratas en un modelo de colitis por DSS de enfermedad intestinal inflamatoria. Después de dos semanas de dosificación de *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103), o vehículo por alimentación forzada oral, se introdujo DSS al 3% en el agua de beber durante 9 días. Los animales que no recibieron DSS sirvieron como controles sanos; DSS, recibieron vehículo y DSS; DSS+BIF038 recibieron *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103) y DSS.

Figura 8. Puntuaciones de sangre en heces de ratas en un modelo de colitis por DSS de enfermedad intestinal inflamatoria. Después de dos semanas de dosificación de *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103), o vehículo por alimentación forzada oral, se introdujo DSS al 3% en el agua de beber durante 9 días. Los animales que no recibieron DSS sirvieron como controles sanos; DSS, recibieron vehículo y DSS; DSS+BIF038 recibieron *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103) y DSS.

Control sano: ■■ ; DSS: ◆◆ ; DSS + BIF038: ▼▼ .

Figura 9. Permeabilidad del intestino entero de ratas en un modelo de colitis por DSS de enfermedad intestinal inflamatoria. Después de dos semanas de dosificación de *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103), o vehículo por alimentación forzada oral, se introdujo DSS al 3% en el agua de beber durante 9 días. Los animales que no recibieron DSS sirvieron como controles sanos; DSS, recibieron vehículo y DSS; DSS+BIF038 recibieron *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103) y DSS. La permeabilidad se determinó como excreción CrEDTA en orina.

Control sano: ■■ ; DSS: ◆◆ ; DSS + BIF038: ▼▼ .

Figura 10. Puntuaciones histológicas de tejido colónico de ratas en un modelo de colitis por DSS de enfermedad intestinal inflamatoria. Después de dos semanas de dosificación de *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103), o vehículo por alimentación forzada oral, se introdujo DSS al 3% en el agua de beber durante 9 días. Los animales que no recibieron DSS sirvieron como controles sanos; DSS, recibieron vehículo y DSS; DSS+BIF038 recibieron *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103) y DSS.

Figura 11. Puntuación macroscópica de los intestinos de ratas en un modelo de colitis por DSS de enfermedad intestinal inflamatoria. Después de dos semanas de dosificación de *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103), o vehículo por alimentación forzada oral, se introdujo DSS al 3% en el agua de beber durante 9 días. Los animales que no recibieron DSS sirvieron como controles sanos; DSS, recibieron vehículo y DSS; DSS+BIF038 recibieron *B. adolescentis* BIF038 (DSM 29103) y DSS.

Breve descripción de la lista de secuencias

La lista de secuencias incluye las once secuencias de la figura 2, así como las proteínas codificadas por las CDS enumeradas en las tablas 3 a 8.

SEQ ID NO: 1 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para ATCC 15703^T y las cepas de las riboespecies 3 y 4.

SEQ ID NO: 2 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para las cepas de las riboespecies 2 y 5.

SEQ ID NO: 3 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para ATCC 15703^T y las cepas de las riboespecies 5 y 3.

SEQ ID NO: 4 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para las cepas de la riboespecie 2.

SEQ ID NO: 5 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para las cepas de la riboespecie 4.

SEQ ID NO: 6 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para ATCC 15703^T y las cepas de la riboespecie 3.

SEQ ID NO: 7 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para las cepas de la riboespecie 2.

SEQ ID NO: 8 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para las cepas de la riboespecie 5.

SEQ ID NO: 9 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para las cepas de la riboespecie 4.

SEQ ID NO: 10 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para ATCC 15703^T y las cepas de las riboespecies 2 y 5.

SEQ ID NO: 11 presenta una secuencia génica del ARNr 16S que es específica para las cepas de las riboespecies 3 y 4.

SEQ ID NO: 12 presenta CDS 2439 en la tabla 3.

SEQ ID NO: 13 presenta CDS 2454 en la tabla 3.

SEQ ID NO: 14 presenta CDS 2458 en la tabla 3.

SEQ ID NO: 15 presenta CDS 2027 en la tabla 4.

SEQ ID NO: 16 presenta CDS 2312 en la tabla 4.

SEQ ID NO: 17 presenta CDS 2314 en la tabla 4.

SEQ ID NO: 18 presenta CDS 2406 en la tabla 5.

SEQ ID NO: 19 presenta CDS 2425 en la tabla 5.

SEQ ID NO: 20 presenta CDS 3350 en la tabla 6.

SEQ ID NO: 21 presenta CDS 3351 en la tabla 6.

SEQ ID NO: 22 presenta CDS 3166 en la tabla 7.

SEQ ID NO: 23 presenta CDS 3123 en la tabla 7.

SEQ ID NO: 24 presenta CDS 2293 en la tabla 8.

SEQ ID NO: 25 presenta CDS 2334 en la tabla 8.

Ejemplos

Visión general del procedimiento experimental

Las bifidobacterias se aislaron de heces humanas de voluntarios sanos. La identidad de las especies de los aislados purificados se determinó por secuenciación del ADNr 16S y análisis filogenético. El análisis filogenético de 16S mostró la presencia de 4 grupos (rboespecies) de cepas más estrechamente relacionados a la cepa tipo *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703^T, sin embargo, claramente distintas de la cepa tipo (cepas similares a *B. adolescentis*). Este subconjunto de aislados bifidobacterianos se investigó adicionalmente para determinar su afiliación taxonómica en el grupo de *B. adolescentis*. El parentesco ADN:ADN investigado por hibridación demostró que las cepas pertenecen a la especie *B. adolescentis*; sin embargo, la secuenciación del genoma identificó secuencias codificantes (genes) que distinguían 4 grupos de cepas similares a las rboespecies que eran diferentes de la cepa tipo *B. adolescentis* ATCC15703^T. La capacidad de crecer en varias fuentes de hidratos de carbono se investigó usando el sistema API. La utilización de almidón y glucógeno identificó 2 subgrupos que eran diferentes de la cepa tipo.

Se investigaron las características funcionales relacionadas con la salud GI de las cepas similares a *B. adolescentis*. La capacidad de estimular TJ en células epiteliales se investigó aplicando bacterias vivas a monocapas de células Caco-2 y midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TER). La mayoría de las cepas similares a *B. adolescentis* aumentó TER; sin embargo, a varios grados. La estimulación local del sistema inmunitario se determinó aplicando bacterias a células dendríticas derivadas de CMSP humanas y midiendo la producción de citoquinas. Varias cepas indujeron altos niveles de IL-10 con una proporción IL-10:IL-12 > 1 indicativa de una respuesta inmunitaria reguladora.

Una cepa similar a *B. adolescentis* se seleccionó por su fuerte capacidad de inducir TER y alta inducción de IL-10 y se aplicó en un modelo de colitis por DSS en rata. La cepa mejoró significativamente los síntomas inducidos por el tratamiento con DSS.

Ejemplo 1 – Aislamiento de bifidobacterias de seres humanos sanos

Se aislaron bifidobacterias de muestras de heces humanas congeladas (-80°C) recogidas de voluntarios sanos. Se obtuvo consentimiento por escrito para utilizar el material para el aislamiento de bacterias de todos los voluntarios. Las muestras se descongelaron y 4 g de muestra se mezclaron en un homogenizador stomacher a alta velocidad en 35 ml de solución salina con peptona con cloruro de cisteína al 0,05%. Después de mezclado exhaustivo, se hicieron diluciones en serie de 10 veces en solución salina con peptona. Se plaquearon alícuotas de cien µl de las diluciones 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ y 10⁹ en zumo de tomate/agar de Eugon pH 7,0; (zumo de tomate, pH ajustado a 7,0 (400 ml/1000 ml), 45 g de agar de Eugon (Difco)/1000 ml, maltosa al 1%, cloruro de cisteína al 0,05%, hemina al 0,0005%, 40 mg/1000 ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)), y agar de medio Columbia pH 7,0 (medio Beerens ajustado); (Medio Columbia (Difco), glucosa al 0,005%, sal sódica del ácido propiónico al 0,1%, cloruro de cisteína al 0,05%, 40 mg de X-gal.

Las placas se incubaron anaerobiamente a 37°C. Después de 3 días, se cogieron colonias individuales. La morfología de la colonia se registró y se determinó la morfología de célula individual por microscopía. Se sembraron colonias que tenían células con forma de V o forma de Y características de bifidobacterias en caldo Man Rogosa Sharp (MRS) (Oxoid A/S, Dinamarca) con cloruro de cisteína al 0,05% (Merck KGaA, Alemania) y se incubaron anaerobiamente a 37°C. Las cepas se purificaron posteriormente por sembrado en estrías 3 veces en placas de MRS con cloruro de cisteína al 0,05%. La pureza de las cepas se ensayó por extensión en agar de Caso (agar de tripton y soja con sangre de oveja), e incubación aerobia, 30°C durante 2 días. Las cepas puras en MRS con glicerol al 20% se almacenaron en ampollas a -80°C.

La afiliación taxonómica de los aislados fecales se determinó por secuenciación del ADNr 16S y análisis filogenético.

Se obtuvieron 127 aislados de *Bifidobacterium* de muestras de heces humanas y se caracterizaron adicionalmente.

Ejemplo 2 – Secuenciación de ADNr 16S y análisis filogenético

Se determinaron secuencias parciales del gen de ARNr 16S por amplificación de parte del ADNr 16S con cebadores conservados 616V (5'-AGRGTTTGATYCKGGCTCAG-3') y 612R (5'-GTAAGGTTCTTCGCGT-3') y posterior secuenciación del producto de amplificación con el cebador conservado 610R (5'-ACCGCGGCTGCTGGCAC-3'). Las reacciones de secuenciación de Sanger fueron realizadas por LGC Genomics, Berlín, Alemania).

Se alinearon secuencias parciales de ADNr 16S rDNA (posición de *E. coli* de 27 a 468; Brosius et al., 1978) de las cepas de *Bifidobacterium* aisladas y *B. adolescentis* ATCC 15703^T usando Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Se generó un árbol filogenético por unión de vecinos usando ClustalW2-Phylogeny (http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/), y el árbol se mostró usando la impresora de árboles Phylogendron Phylogenetic (<http://iubio.bio.indiana.edu/treeapp/treeprint-form.html>).

Resultados

Treinta y seis cepas de *Bifidobacterium* estaban más estrechamente relacionadas con *B. adolescentis* basado en el análisis filogenético del ADNr 16S. Sin embargo, todas las cepas tenían secuencias de ADNr 16S divergentes de la cepa tipo, *B. adolescentis* ATCC 15703^T. Las cepas se agruparon en 4 grupos distintos diferentes de *B. adolescentis* ATCC 15703^T como se muestra en el dendograma de la figura 1. Los 4 grupos de nombraron riboespecies 2, 3, 4 y 5. Veinte cepas constituían un único grupo (riboespecie 2), otras 12 cepas se agruparon juntas (riboespecie 5), y 2 y 3 cepas formaron 2 grupos respectivamente (riboespecie 3 y riboespecie 4). Se identificaron secuencias firma de ADNr 16S que discriminan claramente las riboespecies entre sí y de la cepa tipo (figura 2). Las secuencias firma se marcan en la figura 2. Se encontraron todas las secuencias de ADNr 16S específicas (firmas) consistentemente entre las cepas y produjeron el agrupamiento de las cepas. Así las riboespecies 2 y 5 tienen ambas secuencias específicas en las bases 74-75 y 90-3 (numeración de *E. coli*) que las separan de la cepa tipo y las riboespecies 3 y 4. La riboespecie 2 se puede discernir de la riboespecie 5 por la firma ACC (bases 192-194), y por firmas en las bases 212-215, 226-232. Las secuencias firma en las bases 262-267 y 287-293 discriminan las riboespecies 3 y 4 de la cepa tipo y las riboespecies 2 y 5. La riboespecie 4 se diferencia de las otras riboespecies y de la cepa tipo por la firma GACAU localizada en las bases 187-191. Por tanto, las cuatro riboespecies se pueden discriminar de forma no ambigua entre sí y *B. adolescentis* ATCC 15703^T ya sea por secuencias firma únicas o por combinaciones de firmas.

El análisis filogenético de ADNr 16S demostró la existencia de 4 grupos (riboespecies) de bifidobacterias entre las cepas aisladas de heces humanas que estaban más estrechamente relacionadas a *B. adolescentis*; sin embargo, con secuencias firma muy consistentes y específicas que diferencian los aislados de la cepa tipo.

Para determinar el estado taxonómico de estas riboespecies, se seleccionaron cepas representativas de cada grupo y se sometieron a análisis de reasociación ADN-ADN con cepas tipo que pertenecen al grupo *B. adolescentis*.

Ejemplo 3 – Reasociación ADN-ADN

El parentesco ADN-ADN de una colección de cepas similares a *B. adolescentis* respecto a cepas tipo de *Bifidobacterium* se determinó por BCCMTM/LMG, Bacteria Collection Laboratorium voor Microbiologie Universiteit Gent.

Se investigaron los siguientes cultivos BIF122, DSM 29103 (BIF038), DSM 29107 (BIF106), BIF107, *B. adolescentis* LMG 10502^T, *B. stercoris* LMG 27438^T, *B. ruminantium* LMG 21811^T, *B. dentium* LMG 11045^T, y *B. angulatum* LMG 11039^T. Estas especies están todas afiliadas con el grupo de *B. adolescentis*.

Las bacterias se cultivaron en medio LMG 144, y se comprobó la pureza después de la incubación a 37°C en condiciones anaerobias. El ADN genómico se extrajo según una modificación del procedimiento de Gevers et al., (2001). Las hibridaciones se realizaron en presencia de formamida al 50% a 49°C según una modificación (Goris et al., 1998; Cleenwerck et al., 2002) del método descrito por Ezaki et al., (1989). Se realizaron reacciones recíprocas (A x B y B x A) y la diferencia entre el valor medio de A x B y de B x A para cada par de ADN se da en la tabla 1 entre paréntesis.

Resultados

Para BIF122, la diferencia entre el valor medio de A x B y el de B x A en general no está en los límites de este método (tabla 1) y por tanto los resultados de la hibridación ADN:ADN no son concluyentes.

DSM 29103 (BIF038), DSM 29107 (BIF106), BIF107 muestran más del 70% de parentesco ADN-ADN, en general aceptado como el límite de especies para delineación (Wayne et al., 1987) entre sí y con la cepa tipo de *B. adolescentis* y *B. stercoris*. *B. stercoris* previamente descrita como una nueva especie ya no se considera una especie discreta, sino que se incluye con *B. adolescentis* (Killer et al., 2013).

La cepa tipo de *B. ruminantium* muestra un parentesco de ADN-ADN que varía del 36 al 45% con DSM 29103 (BIF038), DSM 29107 (BIF106), BIF107, la cepa tipo de *B. adolescentis* y *B. stercoris* (Tabla 1).

En conclusión, los resultados claramente muestran que DSM 29103 (BIF038), DSM 29107 (BIF106), BIF107 pertenecen a la especie *B. adolescentis* y que las riboespecies identificadas son subgrupos distintos de esta especie. Puesto que no existe una definición firme de subespecie, hemos mantenido el término riboespecie para estos grupos.

Tabla 1

Parentesco ADN-ADN de cepas similares a *B. adolescentis* respecto a cepas tipo en el grupo de *B. adolescentis*.

(% de parentesco de ADN)

BIF122	100								
DSM 29103	85 (115)*	100							
DSM 29107	81 (130)*	79 (0)	100						
BIF107	82 (83)*	84 (15)	86 (15)	100					
LMG 10502 ^T	89 (135)*	84 (17)	87 (18)	87 (11)	100				
LMG 27438 ^T	65 (13)	75 (3)	76 (25)	73 (6)	73 (12)	100			
LMG 21811 ^T	38 (48)*	40 (5)	45 (15)	41 (9)	40 (10)	36 (6)	100		
LMG 11045 ^T	36 (27)*	25 (3)	25 (16)	28 (13)	26 (6)	22 (9)	20 (13)	100	
LMG 11039 ^T	32 (30)*	22 (4)	22 (15)	22 (2)	23 (4)	21 (1)	22 (7)	16 (10)	100

Para cada par de ADN la diferencia entre el valor medio de A x B y el de B x A está dentro de los límites de este método, excepto en el caso de la hibridación ADN:ADN con ADN de BIF122, donde la diferencia es en general demasiado alta (*). Los altos valores entre paréntesis son debidos a la diferencia en la inmovilización de los ADN "recíprocos". En este estudio el ADN de BIF122 se inmovilizó en una menor cantidad en los pocillos de la microplaca que los otros ADN. La razón para esto no está clara.

Ejemplo 4 – Fermentación de hidratos de carbono

Se investigó el crecimiento de la cepa tipo de *B. adolescentis* y representantes de las 4 riboespecies en varias fuentes de hidratos de carbono usando el ensayo API 50 CH.

Se investigó la capacidad para crecer sobre almidón, amigdalina, arbutina, D-celobiosa, D-fructosa, D-galactosa, D-glucosa, D-lactosa (bovina), D-maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melibiosa, D-melezitosa, D-ribosa, D-sacarosa (sacarosa), D-sorbitol, D-trehalosa, D-turanosa, D-xilosa, gentiobiosa, glucógeno, inulina, 2-cetogluconato de potasio, gluconato de potasio, L-arabinosa, metil- α D-glucopiranosido, N-acetilglucosamina, salicina, D-adonitol, D-arabinosa, D-arabitol, D-fucosa, D-lixosa, D-rafinosa, D-tagatosa, dulcitol, eritritol, esculinfericitrato, glicerol, inositol, 5-cetogluconato de potasio, L-arabitol, L-fucosa, L-rhamnosa, L-sorbosa, L-xilosa, metil- β D-xilopiranosido, metil- α D-manopiranosido, y xilitol en un subconjunto de las cepas aisladas similares a *B. adolescentis* y se comparó con la cepa tipo *B. adolescentis* ATCC 15703^T.

Las bifidobacterias se sembraron a partir de cultivos nocturnos en caldo de Man Rogosa Sharp (MRS) (Oxoid A/S, Dinamarca) con cloruro de cisteína al 0,05% (Merck KGaA, Alemania) y se incubaron de forma anaerobia a 37°C. Después de 2 días las bacterias se recogieron de las placas usando un hisopo y se suspendieron en medio API 50 CHL con cloruro de cisteína al 0,5% y la suspensión bacteriana se distribuyó en tiras de API 50 CH según las instrucciones del fabricante. Las tiras se inocularon de forma anaerobia a 37°C. Las tiras se leyeron después de 5 días de incubación y el desarrollo del color se registró como + o -.

Resultados

Dieciocho hidratos de carbono fueron diferencialmente fermentados por la cepa tipo *B. adolescentis* y los aislados fecales (tabla 2). La cepa tipo y las cepas que pertenecen a las riboespecies 2 y 5 fueron capaces de crecer sobre almidón como la única fuente de hidratos de carbono, mientras que cepas de las riboespecies 3 y 4 fueron incapaces de fermentar almidón. La cepa tipo y las riboespecies 3 y 4 no crecieron en glucógeno, mientras que las riboespecies 2 y 5 crecieron en esta fuente de hidratos de carbono. Todas las cepas de las riboespecies 3 y 4 fueron capaces de crecer en trehalosa, mientras que la cepa tipo y el 38% de las riboespecies 2 y 5 pudieron crecer en trehalosa. La cepa tipo y el 54% de las cepas pertenecientes a las riboespecies 2 y 5 crecieron en sorbitol, mientras que las riboespecies 3 y 4 no crecieron en sorbitol.

La capacidad para fermentar y crecer en fuentes específicas de hidratos de carbono muestra la presencia de dos grupos de cepas de *B. adolescentis* entre los aislados humanos que son diferentes de la cepa tipo. En particular, el crecimiento en almidón y glucógeno diferencia los dos subgrupos entre sí y de la cepa tipo.

Sustrato	Riboespecie															Crecimiento en sustrato Riboespecies 2+5 (%)	Crecimiento en sustrato Riboespecies 3+4 (%)	
ATCC 15703 ^T																+	100	0
																-	100	0
																-	38	100
																+	54	0
																+	100	60
																-	38	60
																+	100	80
																-	77	80
																-	38	40
																-	8	0
																-	15	0
																+	77	100
																+	69	40
																-	23	20
																-	8	0
																+	92	80
																+	46	20
																+	92	100
	Tabla 2. Crecimiento de <i>B. adolescentis</i> ATCC 15703 ^T y aislados de <i>Bifidobacterium</i> huimanos en fuentes de hidratos de carbono determinado por el ensayo API50CH. Solo se muestran esos azúcares en el panel de API50CH donde el crecimiento varió entre cepas.																	

Ejemplo 5 – Secuenciación del genoma

Se extrajo ADN de cultivos nocturnos de dos representantes de cada riboespecie: BIF038 (DSM 29103) y BIF060, riboespecie 2; BIF137 y BIF107, riboespecie 3; BIF122 y BIF046 (DSM 29111), riboespecie 4, y BIF016 y BIF106 (DSM 29107), riboespecie 5, con ayuda del kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania). La secuenciación del genoma se realizó en Instituto de Genómica Beijing, Hong Kong, usando la plataforma NGS Illumina, HiSeq® 2000 (San Diego, EE UU). Para cada cepa se obtuvieron datos de 200 megabases, consistentes en lecturas de 100 pb de extremo emparejado con espaciadores de 500 pb. El ensamblaje de novo de las lecturas de la secuenciación se realizó con ayuda de software CLC Bioinformatics (Aarhus, Dinamarca). Se identificaron secuencias codificantes en las colecciones de contigs resultantes con ayuda del módulo GenAnnot de Genostar Suite 4.0 (Grenoble, Francia) empleado el algoritmo Glimmer incorporado. Se usó la funcionalidad pangenoma en el módulo Pathway Explorer de Genostar Suite 4.0 para construir el pangenoma de las ocho cepas secuenciadas y *B. adolescentis* ATCC 15703^T (No. de registro de GenBank NC_008618.1).

Resultados

Se identificaron secuencias de ADN codificantes (CDS) únicas en cada riboespecie. Así, se encontraron CDS que estaban presentes en las cepas similares a *B. adolescentis* secuenciadas y ausentes en *B. adolescentis* ATCC 15703^T. Se encontraron CDS específicas que definen las riboespecies 2 y 5, las riboespecies 3 y 4, así como las riboespecies individuales (2, 3, 4, y 5).

La similitud de las secuencias de aminoácidos codificadas por estas CDS respecto a cualquier proteína conocida se determinó por búsquedas Blast® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las búsquedas se hicieron usando blastp frente a todas las traducciones de CDS de GenBank no redundantes +PDB+SwissProt + PIR + PRF excluyendo las muestras medioambientales de los proyectos WGS.

La tabla 3 enumera 3 CDS encontradas solo en las riboespecies 2 y 5.

CDS 2439 codifica una proteína de 91 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína hipotética [Bifidobacterium catenulatum]; WP_003834978.1" (E-score: 3E-22; Identidad: 67%). No se encontraron dominios conservados, y no se encontró alineamiento significativo a proteínas conocidas.

CDS 2454 codifica una proteína de 107 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína hipotética BMOU_0229 [Bifidobacterium moukalabense DSM 27321]; gbETY72215.1" (E-score: 5E-41; Identidad: 65%), sin dominio conservado. El mejor alineamiento a una proteína no hipotética es al "factor de transporte nuclear 2 [Mycobacterium tusciae]; WP_006241648.1" (E-score: 0.004; Identidad: 32%) con 1 dominio (25-138), "superfamilia del factor de transporte nuclear 2 (tipo NTF2)".

CDS 2458 codifica una proteína de 206 aminoácidos con alineamiento significativo a "dominio similar a Ig bacteriano, grupo 2 [Bifidobacterium moukalabense DSM 27321]; ETY72212.1", (E-score: 1E-119; Identidad: 90%). No se encontraron dominios conservados.

Tabla 3. Secuencias codificantes encontradas solo en las riboespecies 2 y 5				
CDS	Producto génico	Identidad	E-score	Referencia
2439	proteína hipotética [Bifidobacterium catenulatum]	67%	3E-22	WP_003834978.1
2454	proteína hipotética BMOU_0229 [Bifidobacterium moukalabense DSM 27321]	62%	6E-38	ETY72215.1
2458	dominio similar a Ig bacteriano, grupo 2 [Bifidobacterium moukalabense DSM 27321]	90%	1E-119	ETY72212.1

La tabla 4 enumera 3 CDS encontradas solo en las riboespecies 3 y 4.

CDS 2027 codifica una proteína de 427 aminoácidos que se alinea significativamente a "transportador multifármaco MatE [Bifidobacterium catenulatum]; WP_003834477.1", (E-score: 0.0; Identidad: 98%) con un dominio conservado "familia de proteína de eflujo MATE [Bifidobacterium catenulatum DSM 16992 = JCM 1194 = LMG 11043]".

CDS 2312 codifica una proteína de 330 aminoácidos con alineamiento significativo a "MULTIESPECIES: subunidad beta de ribonucleótido-difosfato reductasa [Bifidobacterium]; WP_003835055.1" (E-score: 0.0; Identidad: 97%), con un dominio conservado (20-291), "Ribonucleótido Reductasa, R2/subunidad beta, dominio de unión a dihierro similar a ferritina; cd01049". Se han encontrado proteínas homólogas en varias bifidobacterias, pero no en *B. adolescentis*. Además, CDS 2314 codifica una proteína de 766 aminoácidos con alineamiento significativo a "subunidad alfa de ribonucleótido-difosfato reductasa [Bifidobacterium pseudocatenulatum]; WP_004221779.1" (E-score: 0.0; Identidad: 91%). Por tanto, en las riboespecies 3 y 4 están presentes secuencias codificantes que codifican tanto la subunidad alfa como la beta de esta proteína.

Tabla 4. Secuencias codificantes encontradas solo en las riboespecies 3 y 4				
CDS	Producto génico	Identidad	E-score	Referencia
2027	transportador multifármaco MatE [Bifidobacterium catenulatum]	98%	0.0	WP_003834477.1
2313	MULTIESPECIES: subunidad beta de ribonucleótido-difosfato reductasa [Bifidobacterium]	97%	0.0	WP_003835055.1
2314	subunidad alfa de ribonucleótido-difosfato reductasa [Bifidobacterium pseudocatenulatum]	91%	0.0	WP_004221779.1

La tabla 5 enumera 2 CDS encontradas solo en la riboespecie 2.

- 5 CDS 2406 codifica una proteína de 362 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína hipotética [Bifidobacterium catenulatum]; WP_003835002.1" (E-score: 0.0; Identidad: 99%), con un dominio conservado (22-114), "extremo N de proteína R de la enzima de restricción de tipo I (HSDR_N)".

- 10 CDS 2425 codifica una proteína de 66 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína hipotética [Bifidobacterium boum]; WP_026502472.1" (E-score: 1E-37; Identidad: 100%) sin dominios conservados. El mejor alineamiento a una proteína no hipotética es a la "proteína de membrana de la familia OmpA [Hyphomonas neptunium]; WP_011646448.1" (E-score: 0.87; Identidad: 48%), con 2 dominios conservados (411-536), "proteína de membrana externa y (lipo)proteínas asociadas a peptidoglucano relacionadas [biogénesis de la envuelta celular, membrana externa]; COG2885"; (430-534), "dominios de unión a peptidoglucano similares al dominio C-terminal de la proteína de membrana externa OmpA; cd07185".

Tabla 5. Secuencias codificantes encontradas solo en la riboespecie 2				
CDS	Producto génico	Identidad	E-score	Referencia
2406	proteína hipotética [Bifidobacterium catenulatum]	99%	0,0	WP_003835002.1
2425	proteína hipotética [Bifidobacterium boum]	100%	1E-37	WP_026502472.1

La tabla 6 enumera 2 CDS encontradas solo en la riboespecie 5.

- 20 CDS 3350 codifica una proteína de 60 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína hipotética [Pseudoclavibacter soli]; WP_028244556.1" (E-score: 7E-13; Identidad: 53%), con un dominio conservado (41-252), "dolichil-fosfato-manosa-proteína manosiltransferasa".

- 25 CDS 3351 codifica una proteína de 462 aminoácidos con un alineamiento significativo a "proteína hipotética [Bifidobacterium bifidum]; WP_003815303.1" (E-score: 4E-42; Identidad: 31%), con un dominio conservado (1-312), "dolichil-fosfato-manosa-proteína manosiltransferasa".

Tabla 6. Secuencias codificantes encontradas solo en la riboespecie 5				
CDS	Producto génico	Identidad	E-score	Referencia
3350	proteína hipotética [Pseudoclavibacter soli]	53%	7E-13	WP_028244556.1
3351	proteína hipotética [Bifidobacterium bifidum]	31%	4E-42	WP_003815303.1

La tabla 7 enumera 2 CDS encontradas solo en la riboespecie 3.

- 30 CDS 3123 codifica una proteína de 612 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína hipotética [Bifidobacterium angulatum]; WP_003826727.1" (E-score: 1E-170; Identidad: 98%) con un dominio conservado (12-213), " subunidad permeasa del transportador ABC de protección lantibiótico, familia MutE/EpiE; TIGR03732".
- 35 CDS 3166 codifica una proteína de 612 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína que contiene el dominio D2 de formación de isopéptido fimbrial [Bifidobacterium breve]; WP_016462071.1" (E-score: 0.0; Identidad: 95%), con 3 dominios (225-407), "dominio D2 de formación de isopéptido fimbrial; TIGR04226"; (444-532) "dominio de tipo B de proteína Cna; pfam05738"; (577-610), "dominio de ancla a la pared celular con motivo LPXTG; TIGR01167".

Tabla 7. Secuencias codificantes encontradas solo en la riboespecie 3				
CDS	Producto génico	Identidad	E-score	Referencia
3166	proteína que contiene el dominio D2 de formación de isopéptido fimbrial [Bifidobacterium breve]	95%	0.0	WP_016462071.1
3123	proteína hipotética [Bifidobacterium angulatum]	98%	1E-170	WP_003826727.1

La tabla 8 enumera 2 CDS encontradas solo en la riboespecie 4.

CDS 2293 codifica una proteína de 1156 aminoácidos con alineamiento significativo a "proteína de unión a ATP [Bifidobacterium ruminantium]; WP_026645899.1 (E-score: 0.0; Identidad: 97%), con 2 dominios conservados (627-842), "dominio de función desconocida DUF87; cl19135"; (638-958), "dominio similar a AAA; pfam12846".

CDS 2334 codifica una proteína de 141 aminoácidos con alineamiento significativo a "regulador transcripcional de la familia XRE [Eggerthella lenta]; WP_015760296.1 (E-score: 3E-87; Identidad: 92%), con 2 dominios conservados (4-117), "reguladores transcripcionales predichos [Transcripción]; COG1396"; (4-61) "proteínas similares a la familia XRE de hélice-giro-hélice".

Tabla 8. Secuencias codificantes encontradas solo en la riboespecie 4				
CDS	Producto génico	Identidad	E-score	Referencia
2293	proteína de unión a ATP [Bifidobacterium ruminantium]	97%	0.0	WP_026645899.1
2334	regulador transcripcional de la familia XRE [Eggerthella lenta]	92%	3E-87	WP_015760296.1

Ejemplo 6 – Estimulación de uniones estrechas en monocapas de células

Se midió la mejora de la barrera intestinal mediante la capacidad de las cepas para aumentar la resistencia eléctrica a través de monocapas de células Caco-2 (resistencia eléctrica transepitelial (TER)).

Cultivo de célula Caco-2

La línea celular Caco-2 epitelial intestinal de mamífero (DSMZ ACC 169, Instituto Leibniz, DSMZ-Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH, Braunschweig, Alemania) se cultivo en DMEM (Gibco) suplementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 20% (Gibco), aminoácidos no esenciales 1X (Thermo Scientific), y Pen Strep 1X (Biological industries) a 37°C, CO₂ al 5% en un incubador. Se usaron células Caco-2 de los pases 15 a 25. Las células se tripsinizaron cuando estaban al 60-80% de confluencia. Se preparó una suspensión celular de 10⁵ células/ml en DMEM y se sembraron 500 µl en el compartimento apical de insertos de 12 mm de membrana de poliéster Transwell® con tamaño de poro de 0,4 µm (Corning, EE UU), al tiempo que se añadió 1,5 ml de medio al compartimento basolateral. Las células se cultivaron en los insertos durante 21 días con cambio de medio dos veces a la semana.

El día 21 los insertos Transwell se movieron a un cellZscope® (nanoAnalytics, Alemania). El medio de cultivo se cambió a medio sin antibióticos, y según esto se añadieron 760 µl y 1,65 ml de DMEM sin antibióticos al compartimento apical y basolateral, respectivamente. El CellZscope se colocó en el incubador y se siguió la TER cada hora durante 20-23 horas con recogida automática de datos.

Preparación de bifidobacterias

Las bifidobacterias se cultivaron durante la noche anaerobiamente en caldo Man Rogosa Sharp (MRS) (Oxoid A/S, Dinamarca) con cloruro de cisteína al 0,05% (Merck KGaA, Alemania). Las bacterias se recogieron por centrifugación (6000 x g, 2 min), el sobrenadante se desechó y las bacterias se resuspendieron en DMEM. Las bacterias se recogieron de nuevo por centrifugación y se resuspendieron en DMEM para lavar las células. Después de una tercera centrifugación, las bacterias se resuspendieron en DMEM y se midió la DO₆₀₀. La suspensión celular se diluyó a OD₆₀₀ = 3,8.

Estimulación de células Caco-2

Para estimular las células Caco-2 con bifidobacterias, 100 µl de DMEM se retiraron suavemente de la parte apical de los insertos Transwell y se sustituyeron por 100 µl de suspensión bacteriana para dar una DO₆₀₀ final de 0,5. Después el CellZscope se transfirió de vuelta al incubador y se registró la TER cada hora durante 16 horas. Todas las estimulaciones se hicieron en triplicados (3 Transwell independientes). Se usó DMEM sin suplemento bacteriano como control, es decir, monocapas de Caco-2 sin estimular. También se incluyó en cada experimento estimulación con *Lactobacillus rhamnosus* LGG, que es una cepa que estimula fuertemente TER. Se usó LGG para normalizar los datos entre experimentos individuales. La medida durante la noche de TER antes del inicio del experimento permitió la determinación de TER basal en cada pocillo individual y asegurar que la resistencia eléctrica era estable. Los cambios en TER durante la estimulación bacteriana se calcularon relativos al último valor registrado antes de la estimulación (fijado al 100%). Para comparar medidas de experimentos individuales los datos se normalizaron a los valores de TER medidos después de la estimulación con LGG.

Resultados

La capacidad para aumentar TER en monocapas de Caco-2 se ensayó en 21 cepas similares a *B. adolescentis*. La medida continua de TER mostró que después de 10 h de estimulación TER alcanzó una meseta seguido por muy poco

aumento (figura 3). Según esto, la capacidad de cada cepa de mejorar TER después de 10 h se registró y las cepas se compararon en este punto de tiempo. La mayoría de las cepas similares a *B. adolescentis* aumentaron la TER de monocapas de Caco-2, pero a grados variables (figura 4). Seis cepas aumentaron TER después de 10 h a más del 120% de la resistencia registrada antes de la estimulación (DSM 29102 (BIF123), 148%; DSM 29107 (BIF106), 146%; DSM 29103 (BIF038), 142%; BIF060, 126%; BIF113, 124%; BIF016, 122%). Nueve cepas aumentaron TER del 110% al 120% relativa al valor antes de la estimulación mientras que seis cepas no tuvieron efecto sobre TER. Se consideró que las cepas que aumentan TER a $\geq 120\%$ del valor de resistencia antes de la estimulación de monocapas de Caco-2 tenían un efecto significativo sobre la barrera epitelial. *Lactobacillus rhamnosus* LGG aumentó TER al $155\% \pm 25\%$ de la resistencia antes de la estimulación en todos los experimentos.

Ejemplo 7 – Modulación inmunitaria de células dendríticas

Se investigó el potencial efecto inmunorregulador de las cepas similares a *B. adolescentis* determinando la inducción de citoquinas en células dendríticas humanas después de la estimulación.

Preparación de bifidobacterias

Se prepararon cultivos congelados de bifidobacterias para la estimulación de células dendríticas (CD) inoculando bifidobacterias en 10 ml de caldo Man Rogosa Sharp (MRS) (Oxoid A/S, Dinamarca) con cloruro de cisteína al 0,05% (Merck KGaA, Alemania) y cultivando anaeróticamente durante la noche a 37°C. Al día siguiente, el 1% del cultivo nocturno se inoculó en MRS con cloruro de cisteína al 0,0% y se hizo crecer anaeróticamente durante la noche a 37°C. Para recoger las bifidobacterias en fase de crecimiento exponencial, 100 μ l del cultivo nocturno fresco se inocularon en 10 ml de MRS (dilución del 1%) con cloruro de cisteína al 0,05%; se hicieron cinco diluciones secuenciales de 10 veces (de 10^{-1} a 10^{-5}) de la inoculación al 1% y se hicieron crecer anaeróticamente durante la noche a 37°C. La densidad bacteriana se ajustó a $OD_{600} = 5$, y los cultivos se congelaron a -80°C en glicerol al 10% en bandejas de microtitulación.

Generación de CD derivadas de monocitos

Se generaron CD inmaduras derivadas de monocitos *in vitro* mediante un procedimiento de 6 días. Capas leucocíticas humanas de donantes sanos fueron suministradas por el Departamento de Inmunología Clínica en el Hospital de la Universidad de Copenhague, Copenhague, Dinamarca. El uso de muestras humanas sin información de identificación fue aprobado por el Comité Nacional sobre Investigación en Salud y La Sociedad Danesa para Inmunología Clínica, y todos los donantes dieron consentimiento escrito informado tras la donación. Brevemente, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica humana de capas leucocíticas por centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Friburgo, Alemania). Los monocitos se aislaron por selección positiva para CD14 usando separación celular activada por magnetismo con microesferas de CD14 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania) y se cultivaron a una densidad de 2×10^6 células/ml en medio de CD completo (RPMI 1640 suplementado con HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Alemania), L-glutamina 2 mM (Life Technologies Ltd, Paisley, RU), suero bovino fetal inactivado por calor al 10% (Invitrogen, Paisley, RU), penicilina 100 U/ml (Biological Industries, Kibutz Beit-Haemek, Israel), y estreptomycin 100 mg/ml (Biological Industries, Kibutz Beit-Haemek, Israel)) que contenía IL-4 recombinante humana 30 ng/ml y GM-CSF recombinante humano 20 ng/ml (ambos de Sigma-Aldrich, San Luis, EE UU) a 37°C, CO₂ al 5%. Se añadió medio de CD completo fresco que contenía dosis completas de IL-4 y GM-CSF después de tres días de cultivo. El día 6, la diferenciación de CD inmaduras se verificó por análisis de expresión de marcadores de superficie (CD11c > 90% de expresión; CD1a > 75% de expresión).

Estimulación de CD

Las CD inmaduras se resuspendieron en medio de CD completo fresco que no contenía antibióticos, se sembraron en placas de 96 pocillos a 10^5 células/pocillo, y se dejó que se aclimataran a 37°C, CO₂ al 5%, durante al menos una hora antes de la estimulación. Las CD se estimularon con bifidobacterias descongeladas a una proporción bacterias:CD de 100:1, durante 20 h a 37°C, CO₂ al 5%. Después de 20 h de estimulación, los sobrenadantes de CD se esterilizaron por filtración a través de una placa de filtro de 96 pocillos de 0,2 μ m AcroPrep Advance (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, EE UU) y se almacenaron a -80°C hasta el momento de la cuantificación de citoquinas.

Tinción de CD para la cuantificación de moléculas coestimuladoras y receptores de quimioquinas

Inmediatamente después del tiempo de estimulación de 20 h, las CD se recogieron, se centrifugaron a 200 x g durante 5 min, y se resuspendieron en PBS frío que contenía BSA al 2%. La tinción se realizó usando los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-CD80 humano conjugado a FITC (clon L307.4), anti-CD86 humano conjugado a FITC (clon 2331), anti-CCR6 humano conjugado a APC (clon 11A9), anti-CCR7 humano conjugado a FITC (clon 150503), y controles de isotipo apropiados (todos de BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica). Las CD se incubaron con los Acn durante 30 min en hielo protegidas de la luz, seguido por etapas de lavado repetidas usando 1 ml de PBS frío BSA al 2%. Por último, las CD se resuspendieron en BSA al 2% en PBS y se mantuvieron en hielo hasta el análisis por citometría de flujo. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences, SanJose, CA, EE UU) usando software FACSDiva (BD Biosciences, SanJose, CA, EE UU).

Cuantificación de citoquinas

Se cuantificaron los niveles secretados de IL-10, IL-12, TNF α , IL-6 e IL-1 β mediante el kit de la matriz citométrica de esferas (CBA) de Citoquinas Inflamatorias Humanas (BD Biosciences, Erembodegem, Bélgica) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, esferas fluorescentes recubiertas con anticuerpos de captura monoclonales se mezclaron con anticuerpos de detección conjugados a PE y estándares recombinantes o muestras de prueba y se dejó que formaran complejos en sándwich durante 3 h de incubación protegidos de la luz. Después de etapas de lavado repetidas, las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences, San José, CA, EE UU) y el análisis de datos se realizó usando el software FCAP Array 3 (BD Biosciences, San José, CA, EE UU). Los límites de detección para citoquinas individuales fueron como sigue: IL-12 1,9 pg/ml; TNF α 3,7 pg/ml, IL-10 3,3 pg/ml, IL-6 2,5 pg/ml, e IL-1 β 7,2 pg/ml.

Resultados

Las cepas similares a *B. adolescentis* indujeron secreción de citoquinas en células dendríticas humanas. Puesto que no se pudieron ensayar todas las cepas similares a *B. adolescentis* en un único cribado, se usaron CD derivadas de diferentes donantes. Se encontraron variaciones sustanciales en la respuesta global de citoquinas entre donantes y en consecuencia los datos de citoquinas se normalizaron para comparar los resultados de diferentes donantes. Los datos de citoquinas sin procesar se normalizaron a la expresión media para cada citoquina y cada donante. Trece cepas similares a *B. adolescentis* estimularon la secreción de IL-10 por encima del límite de detección y significativamente diferentes de células sin estimular (Figura 5), entre otras en particular DSM 29111 (BIF046), DSM 29105 (BIF061), DSM 29106 (BIF084), DSM 29103 (BIF038) y DSM 29104 (BIF129). Diez de estas cepas similares a *B. adolescentis* además produjeron una proporción de secreción IL-10/IL-12 mayor de uno lo que sugiere potencial inmunorregulador (DSM 29111 (BIF046), 2.1; DSM 29106 (BIF084), 1.1; DSM 29103 (BIF038), 1.1; DSM 29104 (BIF129), 2.8; BIF056, 1.1; BIF059, 1.1; BIF027, 1.3; DSM 29102 (BIF123), 1.1; BIF016, 1.1; DSM 29107 (BIF106), 1.6).

Resumen de resultados in vitro seleccionados

La tabla 9 presenta un resumen de los resultados *in vitro* de las cepas depositadas. Se seleccionaron cepas que eran capaces de aumentar la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de una monocapa de células Caco-2 después de 10 h de tratamiento a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento, capaces de inducir secreción de > 200 pg/ml de IL-10, cuando se coincubaban con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, o capaces de inducir una proporción IL-10:IL-12 > 1, cuando se coincubaban con células dendríticas derivadas de CMSP humanas, o una combinación de dos o más de estas tres funciones.

Cepa	TER _{10h} (%)	IL-10 (pg/ml)	IL-10:IL-12
DSM 29102	148	99	1,1
DSM 29107	146	63	1,6
DSM 29103	142	238	1,1
DSM 29106	115	368	1,1
DSM 29104	95	210	2,8
DSM 29105	95	746	0,8
DSM 29111	n.d.	1413	2,1

Ejemplo 8 – Efecto de *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) sobre colitis inducida por DSS

In vivo, se ensayó *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) en un modelo de colitis por sulfato sódico de dextrano (DSS) en ratas. La colitis por DSS es un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria, incluyendo colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn, para la que se ha mostrado que la incidencia y prevalencia mundiales aumentan (Molodecky et al., 2012). Los mecanismos patofisiológicos subyacentes de la colitis por DSS incluyen inflamación, destrucción de criptas y permeabilidad intestinal aumentada. Los síntomas de la enfermedad en colitis por DSS se corresponden a lo que se observa en CU humana, incluyendo pérdida de peso corporal, diarrea y pérdida de sangre en heces (Herias et al., 2005).

En este estudio, ratas Wistar macho de 8 semanas de edad (N = 18 para grupos de DSS, N = 6 para los controles sanos) recibieron una dieta humanizada semipurificada (alta en grasas, baja en fibra) para mimetizar las condiciones humanas. Los animales se enjaularon individualmente en jaulas metabólicas con un suelo de acero inoxidable para facilitar la recogida de heces y orina completamente separadas. Las jaulas metabólicas tenían túneles de alimentación para evitar derrame de pienso y asegurar la medida correcta de la ingesta de pienso. Se dosificaron aproximadamente 10¹⁰ UFC/día de *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) o placebo como polvo liofilizado suspendido en solución salina. Después de dos semanas de dosificación de *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) o vehículo (solución salina) por alimentación forzada oral se introdujo la colitis añadiendo DSS al 3% en el agua de beber durante 9 días. Durante la

exposición a DSS los pesos corporales se registraron a diario para medir la anorexia inducida por inflamación. La consistencia de las heces y la sangre en las heces se puntuaron a diario durante la colitis como medidas de la gravedad de la enfermedad. Se puntuó la consistencia de las heces según los siguientes parámetros 0; heces formadas y duras, 1; heces formadas, pero blandas, 2; heces sueltas, 3; diarrea leve (acuosa) y 4; diarrea fuerte. Se añadió cromo inerte CrEDTA (2 g/kg de pienso) a la dieta para cuantificar la permeabilidad gastrointestinal. La ingesta de CrEDTA de la dieta se determinó a diario pesando el pienso de los animales y la permeabilidad gastrointestinal se evaluó por determinación de CrEDTA una vez antes (día -1/-2) y dos veces durante la colitis (día 4/5 y día 7/8) en muestras de orina de 24 horas. Para la medida de Cr, la orina se acidificó con ácido tricloroacético 50 g/l, se centrifugó a 14.000 g durante 2 min y se diluyó con CsCl 0,5 g/l. El cromo se analizó por espectrofotometría de emisión atómica acoplada a plasma inductivamente.

Al final se examinó el colon para evaluar las lesiones macroscópicas según los criterios de Wallace (Wallace et al., 1989), que se basa en diarrea, adhesión, hiperemia, engrosamiento del intestino y grado de ulceración. Además, se cortó un trozo de 2 cm de la mitad del colon, se almacenó en paraformaldehído al 4%, se embebió en parafina, se cortó y tiñó con hematoxilina y eosina. Los cortes histológicos se enmascararon y puntuaron según la puntuación de Cooper (Cooper et al., 1993).

Los resultados se presentan como media + EEM y la evaluación estadística de los datos sin procesar se realizó como sigue: para datos emparejados se realizó la prueba de Wilcoxon de datos emparejados no paramétrica para el grupo dosificado con bacterias y los controles sanos frente a DSS (grupo de vehículo). Los datos no emparejados se comprobaron para normalidad usando la prueba de Shapiro Wilk y para varianzas uniformes en los grupos por la prueba de Barlett. Cuando se cumplieron los criterios se realizó la prueba de t de Student entre el grupo dosificado con bacterias y los controles sanos frente DSS. Si los criterios no se cumplían se usó la prueba U de Mann Whitney.

Resultados

El peso corporal se registró a diario durante la exposición a DSS y *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) inhibió significativamente la pérdida de peso corporal inducida por DSS ($p = 0,002$) comparado con el grupo de DSS (Figura 6).

B. adolescentis DSM 29103 (BIF038) tuvo significativamente menor ($p = 0,048$) heces sueltas y diarrea en términos de área bajo la curva de puntuación de consistencia de heces en aproximadamente el 10% comparado con el grupo de DSS (Figura 7). Además, el número de animales con una puntuación de sangre en heces al final estaba disminuido en el 30%; 7 de 18 animales en grupo de *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) frente a 10 de 18 en el grupo de DSS (Figura 8).

La permeabilidad intestinal completa aumentó durante la exposición a DSS, y el día 7,5 CrEDTA en orina por ingesta media de agua había aumentado en el 129% en el grupo de DSS comparado con los controles sanos. El límite de *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) significativamente ($p = 0,057$) disminuyó la permeabilidad inducida por DSS en el 30% el día 7,5 (Figura 9).

También se observó diferencia estadísticamente significativa del 26% al comparar la puntuación histológica al final entre el grupo de *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) y el grupo de DSS ($p = 0,049$), mientras que la puntuación macroscópica al final disminuyó en el 19% en el grupo de *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) comparado con el DSS (Figura 10 y Figura 11, respectivamente).

En conjunto, esta intervención con *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) llevó a mejoras en anorexia inducida por enfermedad, consistencia de heces, número de animales, sangre en heces, puntuación macro y microscópica y permeabilidad intestinal comparado con ratas que recibieron el tratamiento de DSS solo.

Estos datos indican que *B. adolescentis* DSM 29103 (BIF038) previene y/o inhibe la inflamación y daño tisular en el aparato digestivo, así como que inhibe diarrea e induce un efecto global de fomento de la salud en términos de peso corporal.

Depósito y solución experta

El solicitante solicita que una muestra de los microorganismos depositados para la presente solicitud como se describe a continuación se pueda hacer disponible solo a un experto, hasta la fecha en la que se conceda la patente.

CHCC12845 se depositó con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares GmbH; Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el no. de registro DSM 29102.

CHCC12855 se depositó con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares GmbH; Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el no. de registro DSM 29103.

CHCC12867 se depositó con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares GmbH; Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el no. de registro DSM 29104.

CHCC12895 se depositó con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares GmbH; Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el no. de registro DSM 29105.

CHCC12957 se depositó con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares GmbH; Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el no. de registro DSM 29106.

CHCC12999 se depositó con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares GmbH; Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el no. de registro DSM 29107.

CHCC12876 se depositó con DSMZ-Colección Alemana de Microorganismo y Cultivos Celulares GmbH; Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, el 16 de julio, 2014 con el no. de registro DSM 29111.

Los depósitos se hicieron según el tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines de procedimiento de patentes.

Referencias

Adawi, D., Ahrne, S., Molin, G. (2001) Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. *Int. J Food Microbiol* 70:213-220.

Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W.J., Roy, N.C. (2010) *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* 10:316.

Arrieta, M.C., Bistritz, L., Meddings, J.B. (2006) Alterations in intestinal permeability. *Gut*. 55:1512-1520.

Bansal, T., Alaniz, R.C., Wood, T.K., Jayaraman, A. (2010) The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:228-233.

Bashashati, M., Rezaei, N., Bashashati, H., Shafieyoun, A., Daryani, N.E., Sharkey, K.A., Storr, M. (2012) Cytokine gene polymorphisms are associated with irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol. Mol.* 24(12): 1102-1111.

Bashashati, M., Rezaei, N., Shafieyoun, A., Mckernan, D.P., Chang, L., Ohman, L., Quigley, E.M., Schmulson, M., Sharkey, K.A., Simren, M. (2014) Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol. Motil.* 26:1036-1048.

Beaudoin, M., Goyette, P., Boucher, G., Lo, K.S., Rivas, M.A., Stevens, C., Alikashani, A., Ladouceur, M., Ellinghaus, D., Torkvist, L., Goel, G., Lagace, C., Annese, V., Bitton, A., Begun, J., Brant, S.R., Bresso, F., Cho, J.H., Duerr, R.H., Halfvarson, J., McGovern, D.P., Radford-Smith, G., Schreiber, S., Schumm, P.L., Sharma, Y., Silverberg, M.S., Weersma, R.K., Quebec IBD Genetics Consortium; NIKKD IBD Genetics Consortium; International IBD Genetics Consortium, D'Amato, M., Vermeire, S., Franke, A., Lettre, G., Xavier, R.J., Daly, M.J., Rioux, J.D. (2013) Deep resequencing of GWAS loci identified rare variants in CARD9, IL23R and RNF186 that are associated with ulcerative colitis. *PLoS Genet*, 9(9):e1003723.

Bergmann, K.R., Liu, S.X.L., Tian, R., Kushnir, A., Turner, J.R., Li, H.-L., Chou, P.M., (2013) *Bifidobacteria* stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *The American Journal of Pathology*, 182, 5:1595-1606.

Biavati, B., Mattarelli, P., (1991) *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the ruminants of cattle. *Int J Syst Bacteriol.* 41:163-168.

Brosius, J., Palmer, M.L., Kennedy, P.J., Noller, H.F. (1978) Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(10):4801-5.

Camilleri, M., Gorman, H. (2007) Intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 19:545-552.

Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Greenwood-Van Meerveld, B., Verne, G.N. (2012) Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil.* 24(6):503-12.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C., Waget, A., Delnnee, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrieres, J., Tanti, J.F., Gibson, G.R., Casteilla, L.,

- Delzenne, N.M., Alessi, M.C., Burcelin, R. (2007) Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 56(7):1761-72.
- 5 Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L., Gewirtz, A.T. (2014) Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology*, 59(1):328-339.
- Chen,L-L., Wang,X-H., Cui,Y., Lian, G-H., Zhang,J., Quyang,C-H., and Lu,F-G. (2009) Therapeutic effects of four strains of probiotics on experimental colitis in mice. *World. J. Gastroenterol.* 15(3):321-327.
- 10 Cirera,I., Bauer,T.M., Navasa,M., Vila,J., Grande,L., Taura,P., Fuster,J., Garcia-Valdecasa,J.C., Lacy,A., Suarez,M.J., Rimola,A., Rodes,J. (2001) Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol.* 34:32-37.
- Cleenwerck,I., vandemeulebroecke,K., janssens,D., Swings,J. (2002) Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisia* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52:1551-1558.
- 15 Cooper,H.S., Murthy,S.N., Shah,R.S., Sedergran,D.J. (1993) Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69:238-249.
- 20 de Kort,S., Keszthelyi,D., Masclee,A.A. (2011) aky gut and diabetes mellitus: what is the link? *Obes Rev.* 12(6):449-58.
- Dicksved,J., Schreiber,O., Willing,B., Petersson,J., Rang,S., Phillipson,M., Holm,L., Roos,S. (2012) *Lactobacillus reuteri* maintains a functional mucosal barrier during DSS treatment despite mucus layer dysfunction. *PLoS One.* 7(9):e46399.
- 25 Ding,S., Chi,M.M., Scull,B.P., Rigby,R., Schwerbrock,N.M.J., Magness,S., Jobin,C., Lund,P.K. (2010) High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PLoS ONE* 5(8):e12191.
- 30 Ding,S., Lund,P.K. (2011) Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14(4):328-333.
- Donato,K.A., Gareau,M.G., Wang,Y.J., and Sherman,P.M. (2010) *Lactobacillus rhamnosus* GG attenuates interferon- γ and tumour necrosis factor- α -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signaling. *Microbiology* 156:3288-3297.
- 35 Esplugues,E., Huber,S., Gagliani,N., Hauser,A.E., Town,T., Wan,Y.Y., O'Connor Jr,W., Rongvaux,A., Van Rooijen,N., Haberman,A.M., Iwakura,Y., Kuchroo,V.K., Kolls,J.K., Bluestone,J.A., Herold,K.C., Flavell,R.A. (2011) Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 475:514-518.
- 40 Ezaki,T., Hashimoto,Y., Yabuuchi,E. (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Evol Microbiol.* 39:224-229.
- 45 FAO/WHO (2001) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- 50 Fasano,A. (2012) Leaky gut and autoimmune diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 42:71-78.
- Fasano,A., Shea-Donohue,T. (2005) Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2(9) :416-22.
- 55 Frances,R., Munoz,C., Zapater,P., Uceda,F., Gascon,I., Pascual,S. et al. (2004) Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut.* 53:860-864.
- Gassler,N., Rohr,C., Schneider,A., Kartenbeck,J., Bach,A., Obermuller,N., Otto,H.F., Autschbach,F. (2001) Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 281:G216-G228.
- 60 Gecse,K., Róka,R., Séra,T., Rosztóczy,A., Annaházi,A., Izbéki,F., Nagy,F., Molnár,T., Szepes,Z., Pávics,L., Bueno,L., Wittmann T. (2011) Leaky gut in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome and inactive ulcerative colitis. *Digestion.* 2012;85(1):40-6.
- 65

- Geier, M.S., Butler, R.N., Giffard, P.M., Howarth, G.S. (2007) *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *Int. J. Food. Microbiol.* 114:267-274.
- 5 Generoso, S.V., Viana, M., Santos, R., Martins, F.S., Machado, J.A., Arantes, R.M. et al. (2010) *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. *Arch. Microbiol.* 192:477-484.
- 10 Gerova, V.A., Stoyanov, S.G., Katsarov, D.S., Svinarov, D.A. (2011) Increased intestinal permeability in inflammatory bowel diseases assessed by iohexol test. *World J Gastroenterol.* 17(17):2211-5.
- Gevers, D., Huys, G., Swings, J. (2001) Application of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett.* 205:31-36.
- 15 Goepf, J., Fowler, E., McBride, T., Landis, D. (2014) Frequency of abnormal fecal biomarkers in irritable bowel syndrome. *Glob. Adv. Health Med.* 3(3): 9-15.
- Goris, J., Suzuki, K., De Vos, P., Nakase, T., Kersters, K. (1998) Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Can J Microbiol.* 44:1148-1153.
- 20 Hartmann, P., Haimerl, M., Mazagova, M., Brenner, D.A., Schnabl, B. (2012) Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor I contribute to liver fibrosis in mice. *Gastroenterol.* 143(5):1330-1340.
- 25 Hawkesworth, S., Moore, S.E., Fulford, A.J., Barclay, G.R., Darboe, A.A., Mark, H., Nyan, O.A., Prentice, A.M. (2013) Evidence for metabolic endotoxemia in obese and diabetic Gambian women. *Nutr Diabetes.* 3:e83. doi:10.1038/nutd.2013.24.
- Herias, M.V., Koninkx, J.F., Vos, J.G., Huis in't Veld, J.H., van Dijk, J.E. (2005) Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *Int. J. Food. Microbiol.* 103:143-155.
- 30 Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., Rotter, J.I. (1986) Increased intestinal permeability in Crohn's patients and their relatives: an ethiological factor. *Ann. Int. Med.* 105:883-885.
- Iwaya, H., Maeta, K., Hara, H., Ishizuka, S. (2012) Mucosal permeability is an intrinsic factor in susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Exp. Biol. Med.* 237:451-460.
- 35 Jayashree, B., Bibin, Y.S., Prabhu, D., Shanthirani, C.S., Gokulakrishnan, K., Lakshmi, B.S., Mohan, V., Balasubramanyam, M. (2014) Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem.* 388(1-2):203-10.
- 40 Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Sjöberg, K.E., Petersson, J., Holm, L., Sjövall, H., Hansson, G.C. (2010) Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One.* 5:e12238.
- Johansson, M.E.V., Gustafsson, J.K., Holmen-Larsson, J., Jabbar, M.E.V., Xia, L., Xu, H., Ghishan, F.K., Carvalho, F.A., Gewirtz, A.T., Sjövall, H., Hansson, G.C. (2014) Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and patients with ulcerative colitis. *Gut.* 63:281-291.
- 45 Karczewski, J., Troost, F.J., Konings, I., Dekker, J., Kleerebezem, M., Brummer, R.J., and Wells, J.M. (2010) Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298:G851-G859.
- 50 Keri, S., Szabo, C., Kelemen, O. (2014) Expression of Toll-Like Receptors in peripheral blood mononuclear cells and response to cognitive-behavioral therapy in major depressive disorder. *Brain, Behavior, and Immunity* 40:235-243.
- 55 Kiechl, S., Egger, G., Mayr, M., Wiedermann, C.J., Bonora, E., Oberhollenzer, F., Muggeo, M., Xu, Q., Wick, G., Poewe, W., Willeit, J. (2001) Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from a large population study. *Circulation.* 103(8):1064-70.
- Killer, J., Sedláček, I., Rada, V., Havlík, J., Kopečný, J. (2013) Reclassification of *Bifidobacterium stercoris* Kim et al. 2010 as a later heterotypic synonym of *Bifidobacterium adolescentis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:4350-3.
- 60 Kim, M.-S., Roh, S.W., Bae, J.-W. (2010) *Bifidobacterium stercoris* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 60:2823-2827.
- 65 Kim, S.W., Kim, H.M., Yang, K.M., Kim, S.-A., Kim, S.-K., An, M.J., Park, J.J., Lee, S.K., Kim, T.I., Kim, W.H., Cheon, J.H. (2010) *Bifidobacterium lactis* inhibits NF-kappaB in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflamm. Bowel. Dis.* 16:1514-1525.

- Koltun, W.A., Tilberg, A.F., Page, M.J., Poritz, L.S. (1998) Bowel permeability is improved in Crohn's disease after ileocelectomy. *Dis. Colon. Rectum*. 41:687-690.
- 5 Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G., Stolte, M. (1997) Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11(5):853-858.
- Kruis, W., Schutz, E., Fric, P., Fixa, B., Judmaier, G., Kascák, M., Kamm, M.A., Weismueller, J., Beglinger, C., Stolte, M., Wolff, C., Schulze, J. (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*. 53:1617-1623.
- 10 Kucharzik, T., Walsh, S.V., Chen, J., Parkos, C.A., Nusrat, A. (2001) Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease in association with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am. J. Pathol.* 159:2001-2009.
- 15 Kwon, H.-K., Kim, G.-C., Kim, Y., Hwang, W., Jash, A., Sahoo, A., Kim, J.-E., Nam, J.-H., Im, S.-H. (2013) Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis by probiotic mixture is mediated by a shift in T helper cell immune response. *Clin Immunol.* 146:217-227.
- 20 Laroui, H., Ingersoll, S.A., Liu, H.C., Baker, M.T., Ayyadurai, S., Charania, M.A., Laroui, F., Yan, Y., Sitaraman, S.V., Merlin, D. (2012) Dextran Sodium Sulphate (DSS) induces colitis in mice by forming Nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One* 7:e32084-e32084.
- 25 Lata, J., Novotny, I., Pribramska, V., Jurankova, J., Fric, P., Kroupa, R., Stiburek, O. (2007) The effect of probiotics on gut flora, level of endotoxin and Child-Pugh score in cirrhotic patients: results of a double-blind randomized study. *Eur. J Gastroenterol. Hepatol.* 19:1111-1113.
- Lin, R.-S., Lee, F.-Y., Lee, S.-D., Tsai, Y.-T., Lin, H.-C., Lu, R.-H., Hsu, W.-C., Huang, C.-C., Wang, S.-S., Lo, K.-J. (1995) Endotoxemia in patients with chronic liver diseases: relationship to severity of liver diseases, presence of esophageal varices, and hyperdynamic circulation. *J Hepatol.* 22:165-172.
- 30 Liu, Q., Duan, Z.P., Ha, D.K., Bengmark, S., Kurtovic, J., Riordan, S.M. (2004) Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 39:1441-1449.
- 35 Liu, Z., Shen, T., Zhang, P., Ma, Y., Qin, H. (2010a) *Lactobacillus plantarum* surface layer adhesive protein protects intestinal epithelial cells against tight junction injury induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Biol Rep.* 38(5):3471-80.
- 40 Liu, Z., Zhang, P., Ma, Y., Chen, H., Zhou, Y., Zhang, M. et al. (2011) *Lactobacillus plantarum* prevents the development of colitis in IL-10-deficient mouse by reducing the intestinal permeability. *Mol. Biol Rep.* 38:1353-1361.
- Liu, Z.H., Shen, T.Y., Zhang, P., Ma, Y.L., Moyer, M.P., Qin, H.L. (2010b) Protective effects of *Lactobacillus plantarum* against epithelial barrier dysfunction of human colon cell line NCM460. *World. J Gastroenterol.* 16:5759-5765.
- 45 Maes, M., Kubera, M., Leunis, J.-C., Berk, M. (2012) Increased IgA and IgM responses against gut commensals in chronic depression: Further evidence for increased bacterial translocation or leaky gut. *J Affective Disorders* 141:55-62.
- Mennigen, R., Nolte, K., Rijcken, E., Utech, M., Loeffler, B., Senninger, N., Bruewer, M. (2009) Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296:G1140-G1149.
- 50 Miele, L., Valenza, V., La Torre, G., Montalto, M., Cammarota, G., Ricci, R. et al. (2009) Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 49:1877-1887.
- 55 Miyauchi, E., Morita, H., Tanabe, S. (2009) *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo. *J Dairy Sci.* 92:2400-2408.
- Miyauchi, E., Ogita, T., Miyamoto, J., Kawamoto, S., Morita, H., Ohno, H., Suzuki, T., Tanabe, S. (2013) *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PLoS One*. 8(11):e79735.
- 60 Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W., Kaplan, G.G. (2012) Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. 142:46-54.

- Neves,A.L., Coelho,J., Couto,L., Leite-Moreira,A., Roncon-Albuquerque,R. Jr. (2013) Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *Mol Endocrinol.* 51(2):R51-64.
- 5 Odenwald,M.A., Turner,J.R. (2013) Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(9):1075-83.
- Osman,N., Adawi,D., Ahrne,S., Jeppsson,B., Molin,G. (2007) Endotoxin- and d-galactosamine-induced liver injury improved by the administration of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and blueberry. *Digestive and Liver Disease* 39:849-856.
- 10 Pendyala,S., Neff,L.M., Suarez-Farinas,M., Holt,P.R. (2011) Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Clin Nutr.* 93:234-242.
- 15 Poritz,L.S., Garver,K.I., Green,C., Fitzpatrick,L., Ruggiero,F., Koltun,W.A. (2007) Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res.* 140(1):12-9.
- Piche,T., Barbara,G., Aubert,P., Bruley des Varannes,S., Dainese,R., Nano,J.L., Cremon,C., Stanghellini,V., De Giorgio,R., Galmiche,J.P., Neunlist,M., (2009) Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 58:196-201.
- 20 Qin,S.Y., Jiang,H.X., Lu,D.H., Zhou,Y. (2013) Association of interleukin-10 polymorphisms with risk of irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 19(48): 9472-9480.
- 25 Rana,S.V., Sharma,S., Sinha,S.K., Parsad,K.K., Malik,A., Singh,K. (2012) Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine response in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome patients. *Trop. Gastroenterol.* 33(4): 251-256.
- Reuter,G., (1971) Designation of type strains for *Bifidobacterium* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21: 273-275.
- 30 Sapone,A., de Magistris,L., Pietzak,M., Clemente,M.G., Tripathi,A., Cucca,F., Lampis,R., Kryszak,D., Carteni,M., Generoso,M., Iafusco,D., Prisco,F., Laghi,F., Riegler,G., Carratu,R., Counts,D., Fasano,A. (2006) Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes.* 55(5):1443-9.
- 35 Schmulson,M., Pulido-London,D., Rodriguez,O., Morales-Rochlin,N., Martinez-Garcia,R., Gutierrez-Ruiz,M.C., Lopez-Alvarenga,J.C., Gutierrez-Reyes,G. (2013) IL-10 and TNF-alpha polymorphisms in subjects with irritable bowel syndrome in Mexico. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 105(7):392-399.
- Schnabl,B. (2013) Linking intestinal homeostasis and liver disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 29(3):264-270.
- 40 Schnabl,B., Brenner,D.A. (2014) Interactions between intestinal microbiome and liver disease. *Gastroenterology* 146:1513-1524.
- 45 Seki,E., De Minicis,S., Osterreicher,C.H., Kluwe,J., Osawa,Y., Brenner,D.A., Schwabe,R.F (2007) TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 13(11):1324-1332.
- Seo,Y.S., Shah,V.H. (2012) The role of gut-liver axis in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension. *Clinical and Molecular Hepatology* 18:337-346.
- 50 Smith,I.M., Christensen,J.E., Arneborg,N., Jespersen,L. (2014) Yeast modulation of human dendritic cell cytokine secretion: An in vitro study. *PLoS One* 9(5):e96595.
- So,J-S., Lee,C-G., Kwon,H-K., Yi,H-J., Chae,C-S., Park,J-A., Hwang,K-C., Im,S-H. (2008) *Lactobacillus casei* potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. *Mol Immunol.* 46:172-180.
- 55 Song,L., Zhou,R., Huang,S., Zhou,F., Xu,S., Wang,W., Yi,F., Wang,X., and Xia,W. (2013) High intestinal and systemic levels of interleukin-23/T-helper 17 pathway in Chinese patients with inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm.* 2013; 425915.
- 60 Spagnuolo,M.I., Cicalese,M.P., Caiazzo,M.A., Franzese,A., Squeglia,V., Assante,L.R., Valerio,G., Merone,R., Guarino,A. (2010) Relationship between severe obesity and gut inflammation in children: what's next. *Ital J Pediatr.* 36:66.
- Sudo,N., Chida,Y., Aiba,Y., Sonoda,J., Oyama,N., Yu,X.-N., Kubo,C., Koga,Y., (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol* 588:263-275.
- 65

Turroni, F., Foroni, E., Pizzetti, P., Giubellini, V., Ribbera, A., Merusi, P., Cagnasso, P., Bizzarri, B., de'Angelis, G.L. (2009) Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 75: 1534-1545.

5 Ukabam, S.O., Clamp, J.R., Cooper, B.T. (1983) Abnormal small intestinal permeability to sugars in patients with Crohn's disease of the terminal ileum and colon. *Digestion* 27(2): 70-74.

10 Ukena, S.N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F., Westendorf, A.M. (2007) Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 2(12):e1308.

Vaarala, O., Atkinson, M.A., Neu, J. (2008) The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes.* 57(10):2555-62.

15 Wallace, J.L., MacNaughton, W.K., Morris, G.P., Beck, P.L. (1989) Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 96(1):29-36.

20 Wang, Y., Liu, Y., Sidhu, A., Ma, Z., McClain, C., Feng, W. (2012) *Lactobacillus rhamnosus* GG culture supernatant ameliorates acute alcohol-induced intestinal permeability and liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 303(1):G32-41.

25 Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M., Moore, M.I., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., et al. (1987) International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 37:463-464.

Wigg, A.J., Roberts-Thomson, I.C., Dymock, R.B., McCarthy, P.J., Grose, R.H., and Cummins, A.G. (2001) The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut.* 48:206-211.

30 Yao, J., Wang, J.-Y., Lai, M.-G., Li, Y.-X., Zhu, H.-M., Shi, R.-Y., Mo, J., Xun, A.-Y., Jia, C.-H., Feng, J.-L., Wang, L.-S., Zeng, W.-S., Liu, L. (2011) Treatment of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis with human interleukin 10 secreted by transformed *Bifidobacterium longum*. *Mol. Pharmaceutics.* 8:488-497.

35 Zeng, J., Li, Y.-Q., Zuo, X.-L., Zhen, Y.-B., Yang, J., Liu, C.-H. (2008) Clinical trial: effect of active lactic acid bacteria on mucosal barrier function in patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 28:994-1002.

Zhang, Y.-Z., Li, Y.-Y. (2014) Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 20(1): 91-99.

40 Zhao, H.-Y., Wang, H.-J., Lu, Z., Xu, S.-Z. (2004) Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. *Chin. J Dig. Dis.* 5:64-67.

Lista de secuencias

45 <110> Chr. Hansen A/S

<120> Nuevos probióticos de *Bifidobacterium*

<130> P5040PC00

50 <160> 25

<170> BiSSAP 1.3

55 <210> 1

<211> 60

<212> ARN

<213> *Bifidobacterium adolescentis*

60 <400> 1

aagucgaacg ggaucggcug gagcuugcuc cggccgugag aguggcgaac gggugaguaa 60

<210> 2

<211> 58

65 <212> ARN

	<213> Bifidobacterium adolescentis	
	<400> 2	
5	aagucgaacg ggauccagg agcuugcucc ugggugagag uggcgaacgg gugaguaa	58
	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Bifidobacterium adolescentis	
	<400> 3	
	ugcuccaguu ggaugcaug	19
	<210> 4	
15	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Bifidobacterium adolescentis	
	<400> 4	
20	ugcuccaguu gaccgcaug	19
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ARN	
25	<213> Bifidobacterium adolescentis	
	<400> 5	
	ugcuccgaca ugacgcaug	19
30	<210> 6	
	<211> 29	
	<212> ARN	
	<213> Bifidobacterium adolescentis	
35	<400> 6	
	uccuucuggg aaagauucua ucgguaugg	29
	<210> 7	
	<211> 28	
40	<212> ARN	
	<213> Bifidobacterium adolescentis	
	<400> 7	
45	guccucuggg aaagcuuug cgguaugg	28
	<210> 8	
	<211> 28	
	<212> ARN	
	<213> Bifidobacterium adolescentis	
50	<400> 8	
	uccuucuggg aaagauucau cgguaugg	28
	<210> 9	
55	<211> 29	
	<212> ARN	
	<213> Bifidobacterium adolescentis	
	<400> 9	
60	ucguguuggg aaagauucua ucgguaugg	29
	<210> 10	
	<211> 60	
	<212> ARN	

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 10

uccuaucaagc uugauggcg gguaacggcc caccauggcu ucgacgggua gccggccuga 60

<210> 11

<211> 60

<212> ARN

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 11

uccuaucaagg uagucggcg gguaacggcc caccgagccu acgacgggua gccggccuga 60

<210> 12

<211> 91

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 12

Met	Glu	Thr	Lys	Gln	Lys	Pro	Glu	Gln	Asp	Leu	Asp	Gln	Arg	Ser	Phe
1			5					10					15		
Glu	Arg	Met	Met	Asp	Gly	Ser	Met	Leu	Asp	Met	Leu	Arg	Ala	Asn	Arg
		20					25					30			
Asp	Arg	Leu	Gln	Lys	Ala	Met	Asp	Thr	Ser	Thr	Pro	Ala	Asn	Ala	
		35				40					45				
Leu	Pro	Ala	Ile	Ser	Arg	Gln	Leu	Ile	Asp	Val	Cys	Glu	Arg	Ile	Glu
	50				55				60						
Ser	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Leu	Thr	Asp	Leu	Leu	Asp	Asp	Glu	Glu	Asp
65				70				75						80	
Glu	Val	Thr	Asp	Asp	Val	Gly	Ala	Ser	Ile	Val					
			85					90							

<210> 13

<211> 134

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 13

Met	Thr	Met	Thr	Asp	Glu	Pro	Asp	Met	Phe	Ala	Thr	Ser	Asp	Asp	Leu
1			5					10					15		
Glu	Arg	Arg	Trp	His	Lys	Leu	Thr	Asp	Glu	Glu	Arg	Glu	Lys	Ala	Asp
		20					25					30			
Thr	His	Leu	Ala	Asp	Val	Thr	Asp	Tyr	Ile	Lys	Glu	Arg	Ser	Pro	Asn
		35				40					45				
Trp	Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Glu	Arg	Pro	Arg	Leu	Leu	Thr	Lys	Ile	Thr
	50				55				60						
Cys	Asp	Ile	Val	Arg	Arg	Ile	Met	Gln	Ala	Asp	Pro	Tyr	Asp	Ile	Pro
65				70				75						80	
Gly	Gly	Ile	Thr	Gln	Met	Asn	Gln	Thr	Thr	Gly	Ser	Phe	Ser	Glu	Gln
			85				90					95			
Tyr	Ser	Phe	Gly	Ala	Pro	Thr	Gly	Asp	Leu	Trp	Leu	Arg	Asp	Asp	Glu
		100				105					110				
Lys	Arg	Ile	Leu	Gly	Ile	Asn	Ala	Gln	Arg	Ala	Phe	Ser	Val	Asp	Met
		115				120					125				
Ala	Thr	Gly	Glu	Thr	Ser										
		130													

<210> 14

<211> 206

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 14

ES 2 768 690 T3

Met	Ser	Asp	Asn	Asn	Glu	Lys	Thr	Thr	Val	Ala	Ala	Gln	Gly	Ala	Thr
1				5					10					15	
Asp	Tyr	Gly	Tyr	Val	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Gly	Asn	Val	Arg	Leu
			20					25					30		
Ile	Lys	Asn	Tyr	Ala	Leu	Phe	Leu	Phe	Pro	Lys	Gly	Asp	Ser	Thr	Phe
		35					40					45			
Val	Ala	Pro	Thr	Gly	Val	Ala	Trp	Thr	Pro	Pro	Ala	Ser	Lys	Lys	Pro
	50					55					60				
Ile	Gly	Tyr	Ser	Thr	Glu	Asp	Gly	Ala	Val	Leu	His	Pro	Glu	Pro	Gly
65					70					75				80	
Asp	Ser	Thr	Asp	Tyr	Lys	Ala	His	Asn	Gly	Asp	Ile	Val	Leu	Ser	Asp
			85						90					95	
Thr	Asp	Pro	Gly	Tyr	Trp	Thr	Leu	Gln	Leu	Ala	Ala	Met	Glu	Gly	Arg
			100					105						110	
Lys	Asp	Val	Val	Ser	Ala	Tyr	Phe	Asp	Val	Asp	Val	Asp	Ser	Asp	Gly
		115					120					125			
Gly	Ile	Ser	Ile	Lys	Gly	Ala	Gly	Leu	Lys	Lys	Glu	Trp	Ile	Leu	Val
	130					135					140				
Leu	Val	Ala	Leu	Asp	Gln	Gln	Asp	Arg	Pro	Phe	Leu	Leu	Tyr	Gly	Thr
145					150					155				160	
Asn	Ala	Lys	Val	Ser	Asp	Arg	Asp	Asp	Val	Ser	Leu	Lys	Ser	Ser	Glu
			165					170						175	
Ile	Met	Asn	Phe	Ser	Met	Thr	Phe	Lys	Met	Leu	Lys	Gly	Thr	Asn	Gly
		180						185					190		
Glu	Gln	Phe	His	Ala	Trp	Gly	Leu	Val	Thr	Glu	Asp	Ala	Lys		
		195					200					205			

<210> 15

5 <211> 472

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 15

Met	His	Ile	Gln	Phe	Pro	Thr	Arg	Gln	Thr	Leu	Thr	Ile	Met	Thr	Thr
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gln	Asn	Thr	His	Glu	Thr	Asp	Thr	Ala	Asn	Asn	Ala	Ser
			20					25				30			
Tyr	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr	Ile	Leu	Thr	Leu	Ala	Ile	Pro	Thr	Phe	Gly
		35					40					45			
Gln	Leu	Ile	Ala	Glu	Pro	Ala	Phe	Val	Leu	Ile	Asp	Thr	Ala	Ile	Val
	50					55					60				
Gly	His	Ile	Gly	Gly	Gln	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Ser	Val	Gly	Ser	Thr
65					70				75					80	
Ile	Val	Leu	Thr	Val	Val	Gly	Leu	Cys	Val	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Thr
				85				90					95		
Thr	Thr	Gln	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Lys	Arg	Gly	Glu	Gly
		100						105					110		
Leu	Glu	Ala	Gly	Ile	Asp	Gly	Leu	Trp	Leu	Ala	Gly	Ile	Ile	Gly	Val
		115				120						125			
Val	Val	Ser	Val	Ala	Leu	Phe	Val	Ile	Ala	Arg	Pro	Leu	Cys	Thr	Ala
	130					135					140				
Met	Gly	Ala	Gln	Gly	Ser	Val	Leu	His	Asn	Ala	Val	Asp	Tyr	Val	Arg
145					150				155					160	
Ala	Val	Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Gly	Met	Leu	Leu	Val	Tyr	Ala	Ala	Asn
			165					170					175		
Gly	Ile	Phe	Arg	Gly	Leu	Gln	Lys	Val	Arg	Ile	Thr	Leu	Ile	Ala	Ala
		180					185					190			
Met	Val	Gly	Ala	Ile	Leu	Asn	Thr	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Ile	Leu
	195					200					205				
Gly	Phe	Gly	Trp	Gly	Val	Phe	Gly	Ser	Gly	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Ser
	210				215					220					
Gln	Trp	Phe	Met	Ala	Val	Ala	Leu	Ile	Val	Pro	Ser	Val	Leu	Trp	Thr
225				230					235				240		
Arg	Ala	Glu	Gly	Ala	Arg	Leu	Gln	Pro	Arg	Leu	Ser	Gly	Val	Leu	Asn
			245					250					255		
Ser	Ala	Gly	Asp	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	Leu	Arg	Thr	Leu	Ala	Leu	Arg
		260					265					270			
Ala	Cys	Leu	Val	Ala	Asn	Val	Val	Leu	Ala	Thr	His	Met	Gly	Val	Glu
	275				280						285				
Val	Leu	Ala	Ala	Tyr	Gln	Val	Val	Asn	Ser	Ser	Trp	Asn	Phe	Val	Leu
	290				295					300					
Asn	Met	Leu	Asp	Ala	Ile	Gly	Ile	Ala	Gly	Gln	Thr	Leu	Val	Ala	Ala
305				310					315					320	
Gln	Ile	Gly	Ala	Arg	Lys	Glu	Asp	Glu	Ala	Met	Arg	Leu	Thr	Arg	Ile
			325					330					335		
Ala	Gly	Lys	Ala	Gly	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Ile	Gly	Leu
		340					345					350			
Met	Ile	Ala	Gly	Trp	Cys	Ala	Ser	Pro	Leu	Phe	Ser	Gln	Ser	Thr	Glu
	355				360						365				
Ile	Gln	His	Leu	Leu	Thr	Val	Gly	Met	Met	Val	Val	Gly	Val	Thr	Leu
	370				375					380					
Pro	Leu	Ala	Gly	Trp	Met	Trp	Ala	Val	Asp	Gly	Ile	Leu	Ile	Gly	Ala
385				390					395					400	
Gly	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Ala	Leu	Thr	Cys	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ile
			405					410					415		
Tyr	Val	Pro	Cys	Leu	Val	Thr	Ile	Gly	Trp	Ile	Cys	Asp	Ala	Met	Gln
		420					425					430			
Ala	Ser	Ser	Ala	Leu	Arg	Met	Ala	Leu	Leu	Trp	Leu	Ala	Val	Asn	Leu
		435				440					445				
Leu	Phe	Val	Gly	Leu	Arg	Ala	Ile	Phe	Asn	Gly	Phe	Arg	Ile	Gly	Thr
	450				455					460					
Ser	Thr	Trp	Leu	His	Ile	Val	His								
465					470										

<210> 16
<211> 330

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 16

```

Met Ala Pro Ile Ser Val Pro Arg Gln Arg Leu Lys Leu Ile Asp Arg
1      5      10      15
Val Ser Ala Ile Asn Trp Asn Arg Leu Glu Asp Asp Lys Asp Leu Glu
20      25      30
Val Trp Asp Arg Leu Thr Gly Asn Phe Trp Leu Pro Glu Lys Val Pro
35      40      45
Val Ser Asn Asp Leu Pro Val Trp Arg Ser Met Gly Glu Ala Glu His
50      55      60
Thr Leu Thr Met Arg Val Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Asp Thr Ile
65      70      75      80
Gln Gly Thr Val Gly Ala Val Ser Leu Ile Pro Asp Ala Leu Thr Pro
85      90      95
His Glu Glu Ala Val Tyr Thr Asn Ile Val Phe Met Glu Ser Val His
100     105     110
Ala Lys Ser Tyr Ser Ser Ile Phe Ser Thr Leu Cys Ser Thr Arg Gln
115     120     125
Ile Asp Glu Ala Phe Ser Trp Ser Glu Glu Asn Glu Tyr Leu Gln Lys
130     135     140
Lys Ala Arg Ile Val Leu Asp Tyr Tyr Glu Gly Asp Ser Pro Leu Lys
145     150     155     160
Arg Lys Val Ala Ser Thr Leu Leu Glu Ser Phe Leu Phe Tyr Ser Gly
165     170     175
Phe Tyr Leu Pro Met Tyr Phe Ser Ala His Ala Lys Leu Thr Asn Thr
180     185     190
Ala Asp Val Ile Arg Leu Ile Ile Arg Asp Glu Ala Val His Gly Tyr
195     200     205
Tyr Ile Gly Tyr Lys Tyr Gln Lys Gly Leu Glu Arg Val Asp Asp Gly
210     215     220
Lys Arg Ala Glu Leu Arg Asp Tyr Thr Tyr Asp Leu Leu Asn Asp Leu
225     230     235     240
Tyr Asp Asn Glu Val Glu Tyr Thr Arg Ser Leu Tyr Glu Pro Val Gly
245     250     255
Leu Thr Gln Asp Val Glu Lys Phe Leu Arg Tyr Asn Gly Asn Lys Ala
260     265     270
Leu Met Asn Leu Gly Tyr Pro Ala Leu Phe Pro Gln Glu Ile Cys Asp
275     280     285
Val Asn Pro Ser Ile Leu Ala Ala Leu Ser Pro Asn Ala Asp Glu Asn
290     295     300
His Asp Phe Phe Ser Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Val Met Gly Lys Ser
305     310     315     320
Val Glu Thr Asp Asp Asp Asp Trp Asp Phe
325     330

```

5

<210> 17

<211> 766

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 17

```

Met Pro Cys Ala Pro Ala Leu Pro Val Arg Thr Asp Gly His Ala Gly
1      5      10      15
Arg Arg Leu Asp Arg Thr Arg Arg Pro Ala Asn Ile Leu Arg Arg Thr
20      25      30
Leu Thr Thr Gly Thr Thr Ile Thr Met Thr Asp Asn Pro Thr Thr Asn
35      40      45

```

10

Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asp	Arg	Ala	His	Asp	Trp	His
50						55					60				
Ala	Leu	Asn	Ala	Met	Leu	Asn	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Gly	Arg	Ile	Gln
65					70				75						80
Phe	Asp	Lys	Asp	Arg	Gln	Ala	Glu	Arg	Glu	Tyr	Ile	Glu	Lys	His	Val
			85						90					95	
Arg	Pro	Asn	Thr	Ile	Ser	Phe	Glu	Ser	Thr	His	Asp	Arg	Leu	Asp	Tyr
			100						105					110	
Leu	Ile	Ala	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Lys	Pro	Val	Phe	Asp	Arg	Tyr	Asp
		115					120					125			
Asp	Asp	Phe	Leu	Asp	Asp	Phe	Tyr	Asn	Asp	Val	Asn	Asp	Cys	Gly	Phe
130						135					140				
Glu	Phe	Asp	Thr	Phe	Leu	Gly	Ala	Phe	Lys	Phe	Tyr	Gln	Ser	Tyr	Ala
145					150					155					160
Leu	Lys	Thr	Phe	Asp	Gly	Met	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asp	Phe	Pro	Gln	Arg
			165						170					175	
Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Leu	Ala	Asp	Gly	Asp	Lys	Thr	Arg	Ala
			180					185						190	
Lys	Ala	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ile	Val	Ser	Gly	Arg	Phe	Gln	Pro	Ala	Thr
		195					200					205			
Pro	Thr	Phe	Leu	Asn	Leu	Gly	Lys	Ala	Gln	Arg	Gly	Glu	Ala	Val	Ser
210						215					220				
Cys	Phe	Leu	Val	Arg	Ile	Glu	Asp	Asn	Met	Glu	Ser	Ile	Ser	Arg	Gly
225					230					235					240
Ile	Asn	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Ser	Lys	Arg	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Leu
			245						250					255	
Leu	Leu	Ser	Asn	Leu	Arg	Glu	Ala	Gly	Ala	Pro	Ile	Lys	Arg	Ile	Lys
			260					265					270		
His	Gln	Ser	Ser	Gly	Val	Val	Pro	Val	Met	Lys	Leu	Leu	Glu	Asp	Ser
		275					280						285		
Phe	Ser	Tyr	Ala	Asn	Gln	Leu	Gly	Ala	Arg	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Val
290						295					300				
Tyr	Leu	Ser	Ala	His	His	Pro	Asp	Ile	Met	Arg	Phe	Leu	Asp	Thr	Lys
305					310					315					320
Arg	Glu	Asn	Ala	Asp	Glu	Lys	Ile	Arg	Ile	Lys	Ser	Leu	Ala	Leu	Gly
			325						330					335	
Val	Val	Ile	Pro	Asp	Ile	Thr	Phe	Glu	Leu	Ala	Lys	Arg	His	Glu	Arg
			340					345					350		
Met	Ala	Leu	Phe	Ser	Pro	Tyr	Asp	Val	Glu	Arg	Val	Met	Gly	Lys	Pro
		355					360					365			
Phe	Ala	Asp	Ile	Pro	Ile	Ser	Glu	Asn	Tyr	Gln	Thr	Met	Val	Asp	Asp
370						375					380				
Asp	Arg	Ile	Gly	Lys	Thr	Tyr	Ile	Asp	Ala	Arg	Glu	Phe	Phe	Met	Thr
385					390					395					400
Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Phe	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Met	Val	Phe	Glu
			405						410					415	
Asp	Thr	Val	Asn	Arg	Ala	Asn	Pro	Ile	His	Gly	Arg	Ile	Ala	Met	Ser
			420					425					430		
Asn	Leu	Cys	Ser	Glu	Ile	Leu	Gln	Val	Gln	Glu	Pro	Ser	Thr	Tyr	His
		435					440					445			
Glu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Ala	His	Val	Gly	Arg	Asp	Val	Ser	Cys	Asn	Leu
450						455					460				
Gly	Ser	Leu	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Met	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Arg	Thr
465					470					475					480
Val	Glu	Arg	Ala	Ile	Arg	Ala	Leu	Thr	Ser	Val	Ser	Glu	His	Thr	Asp
			485						490					495	
Ile	Ala	Cys	Val	Pro	Ser	Ile	Arg	Arg	Ala	Asn	Ser	Glu	Gly	His	Ala
			500					505					510		
Ile	Gly	Leu	Gly	Gln	Met	Asn	Leu	His	Gly	Phe	Leu	Ala	Arg	Glu	Ser
		515					520					525			
Ile	Met	Tyr	Gly	Ser	Pro	Glu	Ala	Leu	Asp	Phe	Thr	Asp	Met	Tyr	Phe
530						535					540				
Met	Thr	Val	Ala	Tyr	His	Ala	Tyr	Arg	Ala	Ser	His	Ala	Leu	Ala	Val

545		550		555		560
Glu Arg Gly Thr	Arg Phe Val Gly Phe	Glu Arg Ser Ala Tyr Ala Lys				
	565	570	575			
Pro Thr Gly Ala Gly Asn Tyr Phe Asp Lys Tyr Thr Asn Gly Glu Arg						
	580	585	590			
Ser Leu Ala Pro Lys Thr Gly Lys Ile Ala Ser Leu Phe Thr Arg Arg						
	595	600	605			
Gly Ile His Ile Pro Asp Glu Asp Asp Trp Arg Arg Leu Arg Asp Asp						
	610	615	620			
Ile Ile Arg Asp Gly Ile Phe Asn Gln Tyr Leu Gln Ala Val Pro Pro						
625	630	635	640			
Thr Gly Ser Ile Ser Tyr Ile Asn His Ser Thr Ser Ser Ile His Pro						
	645	650	655			
Ile Ala Ser Lys Ile Glu Ile Arg Lys Glu Gly Lys Ile Gly Arg Ile						
	660	665	670			
Tyr Tyr Pro Ala Pro Tyr Met Thr Asn Asp Asn Leu Gln Tyr Phe Ala						
	675	680	685			
Asp Ala Tyr Glu Ile Gly Trp Lys Ala Ile Val Asp Thr Tyr Ala Glu						
	690	695	700			
Ala Thr Arg His Val Asp Gln Gly Leu Ser Leu Thr Leu Phe Phe Pro						
705	710	715	720			
Asp Thr Ala Thr Thr Arg Asp Leu Asn Lys Ala Gln Ile Tyr Ala Trp						
	725	730	735			
Arg Lys Gly Val Lys Thr Leu Tyr Tyr Ile Arg Ile Arg Gln Gln Ala						
	740	745	750			
Leu Ser Gly Thr Glu Val Gln Gly Cys Val Ser Cys Met Leu						
	755	760	765			

<210> 18

<211> 362

5 <212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 18

Met Glu Phe Glu Glu Ser Leu Asn Gln Val Ala Ala Lys Val Arg Asp		
1	5	10
Leu Lys Glu Gly Ile Glu Thr Glu Glu Ala Thr Lys Asn Ala Phe Ile		
	20	25
Met Pro Phe Ile Gly Gln Val Leu Gly Tyr Asp Val Phe Asn Pro Thr		
	35	40
Glu Val Val Pro Glu Phe Thr Ala Asp Val Gly Val Lys Lys Gly Glu		
	50	55
Lys Val Asp Tyr Ala Leu Val His Asp Gly Gln Val Gln Ile Leu Ile		
65	70	75
Glu Cys Lys Lys Ile Gly Val Pro Leu Ser Leu Glu Asn Ala Ser Gln		
	85	90
Leu Tyr Arg Tyr Phe Ala Val Thr Asn Ala Arg Ile Gly Val Leu Thr		
	100	105
Asn Gly Gln Val Trp Asn Phe Tyr Met Asp Ile Asp Glu Pro Asn Arg		
	115	120
Met Asp Ser Lys Pro Phe Leu Val Leu Asp Leu Leu Asp Ile Asp Pro		
	130	135
Thr Ile Ile Pro Ala Leu Gln Lys Leu Thr Lys Pro Ala Phe Asp Leu		
145	150	155
Asp Ser Ile Ala Ser Ser Ala Glu Glu Leu Lys Tyr Val Gly Ala Leu		
	165	170
Lys Arg Ala Val Gly Asp Glu Phe Lys Glu Pro Ser Asp Glu Phe Val		
	180	185
Lys Leu Leu Ala Ser His Val Tyr Glu Gly Ala Phe Tyr Ala Ser Val		
	195	200
Met Glu Lys Phe Arg Pro Leu Val Ala Lys Ala Leu Lys Gln Tyr Leu		
	210	215
Ser Asp Gln Val Asn Asp Arg Leu Lys Thr Ala Leu Gly Ala Asp Asp		
	220	

```

225          230          235          240
Ile Lys Ile Asp Thr Ile Glu Pro Asp Ala Asn Glu Glu Thr Asn Asp
          245          250          255
Gly Asp Glu Ser Asp Gly Asn Asp Asp Asp Gly Ile Val Thr Thr Glu
          260          265          270
Glu Glu Ile Ala Gly Tyr Arg Ile Ile Lys Ala Ile Ala Cys Ser Asp
          275          280          285
Val Asp Pro Glu Arg Val Thr Met Arg Asp Ala Lys Lys Tyr Cys Ala
          290          295          300
Ile Phe Leu Asp Asp Asn Asn Arg Lys Pro Ile Val Arg Leu Tyr Phe
305          310          315          320
Asn Thr Lys Gln Lys Tyr Leu Gly Val Phe Asp Glu Asn Lys Asn Cys
          325          330          335
Glu Arg Met Pro Ile Asp Thr Leu Asn Gly Ile Tyr Ala Tyr Ser Glu
          340          345          350
Gln Ile Arg Glu Glu Val Arg Arg Leu Leu
          355          360

```

<210> 19
 <211> 66
 5 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium adolescentis

```

<400> 19
Met Thr Lys Glu Gln Ile Asn Arg Leu Ala Gln Leu Ile Thr Asp Thr
1          5          10          15
Ala Glu Thr Ala Ala Asn Ile Glu Leu Gln Ala Leu Ala Gly Gly Lys
          20          25          30
Ala Asp Asn Gly Ile Ala Ala Met Ala Ser Gly Leu Arg Thr Asn Cys
          35          40          45
Thr Ser Cys Leu Val Leu Val Asn Gly Leu Met Gln Glu Gly Ala Arg
          50          55          60
Cys Glu
65

```

10 <210> 20
 <211> 60
 <212> PRT
 15 <213> Bifidobacterium adolescentis

```

<400> 20
Met Gly Val Gly Arg Ser Ile Trp Phe Asp Glu Gly Tyr Thr Leu Ile
1          5          10          15
Val Glu Ser Gln Pro Phe Ala Arg Met Met Asp Leu Leu Lys Val Asp
          20          25          30
Val His Pro Pro Leu Tyr Tyr Leu Leu Leu Arg Met Trp Ile Ser Val
          35          40          45
Phe Gly Ser Asp Val Met Ala Leu Arg Ala Met Ser
          50          55          60

```

20 <210> 21
 <211> 462
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium adolescentis

```

<400> 21
Met Phe Cys Gly Leu Thr Val Leu Met Ser Met Val Leu Leu Arg Phe
1          5          10          15
Met Ala Cys Glu Arg His Ala Leu Leu Ala Ser Pro Phe Val Met Phe
          20          25          30
Ala Pro Leu Met Leu Arg Tyr Gly Tyr Glu Ile Arg Met Tyr Ser Leu
          35          40          45
Ile Pro Phe Leu Ser Val Leu Gly Thr Tyr Leu Leu Leu Arg Ala Met
25

```

50	55	60
Arg Glu Asp Gly Met	Arg Pro Asp Arg Arg Arg	Ser Gly Arg Gly Ser
65	70	75
Thr Ala Leu Arg Arg	Ile Ala Asp Arg Arg Trp	Trp Ile Ala Tyr Ala
85	90	95
Ile Val Val Ala Leu	Gly Met Tyr Ser Gln Tyr	Met Met Ala Phe Val
100	105	110
Trp Met Thr His Val	Leu Trp Leu Tyr Val Ala	Leu Arg Arg His Gly
115	120	125
His Ala Arg Arg Phe	Pro Arg Met Leu Ile Pro	Tyr Ala Leu Ala Val
130	135	140
Ala Leu Tyr Ile Pro	Trp Ile Pro Ser Ala Val	Gly Gln Phe Ala Ser
145	150	155
Ser Ala Leu Pro Pro	Leu Lys Glu Thr Met Asn	Leu Ser Glu Leu Thr
165	170	175
Ser Val Phe Ser Ile	Leu Thr Thr Gly Phe Asp	Ala Lys Arg Leu Thr
180	185	190
Ser Gly Met Thr Val	Ala Leu Leu Ala Met Leu	Ala Val Leu Ile Ala
195	200	205
Gly Ser Ser Arg Leu	Arg Asp Thr Ala Gly Ser	Thr Val Arg Ser Gly
210	215	220
Met Glu Pro Ser Ala	Ala Gly Ser Val Ala Ala	Glu Asp Arg Ala
225	230	235
Asp Ser Gly Arg Ala	Ala Arg His Leu Ala Phe	Phe Ala Phe Val Pro
245	250	255
Leu Ser Leu Leu Leu	Val Phe Ala Ala Val Arg	Glu Pro Phe Thr Ala
260	265	270
Pro Tyr Gly Phe Phe	Thr Ile Arg Tyr Val Cys	Pro Phe Ala Pro Phe
275	280	285
Ser Tyr Met Phe Leu	Gly Leu Cys Ser Arg Ile	Val Leu Gly Thr
290	295	300
Arg Glu Thr Gly Ala	Gly Asp Phe Cys Gly Lys	Ala Thr Arg Phe Leu
305	310	315
Arg Arg Trp Ser Ala	Trp Leu Leu Ser Ile Ala	Val Leu Ala Gly Gly
325	330	335
Ser Ile Gly Phe Ala	Phe Gln Gly Asn Tyr Ile	Tyr Glu Gln Gln Thr
340	345	350
Thr Pro Gln Thr Ala	Arg Thr Ala His Thr Val	Ala Cys Asp Ala Asp
355	360	365
Asn Ala Val Val Thr	Ser Ser Glu Phe Asp Tyr	Ile Glu Ser Leu Tyr
370	375	380
Tyr Phe Arg Ser Cys	Gly Asn Tyr His Phe Leu	Lys Asp Gly Glu Val
385	390	395
Ser Thr Arg Gly Gly	Tyr Ala Pro Leu His Gly	Ser Pro Ala Gln Ile
405	410	415
Arg His Ile Asp Asp	Leu Asp Thr Glu Arg Val	Thr Tyr Leu Val Arg
420	425	430
Gly Gly Glu Lys Ile	Pro Glu Thr Arg His Tyr	Arg Ile Val Gly Thr
435	440	445
Thr Val Asn Gly Ser	Asn Lys Ala Ile Thr Leu	Glu Arg Arg
450	455	460

<210> 22
 <211> 612
 <212> PRT
 <213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 22
 Met Asn Thr Ile Phe Lys Arg Val Ile Ser Gly Ala Ala Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Ile Ala Val Ser Gly Leu Ala Ile Gly Val Ser Thr Ala Tyr Ala Ala
 20 25 30
 Asp Pro Ala Thr Gly Ser Ile Thr Ile Asn Lys Ser Asp Ala Gly Gln

		35				40				45					
Val	Asp	His	Ser	Phe	Asp	Gly	Trp	His	Leu	Ala	Ser	Leu	Thr	Asn	Val
50						55					60				
Thr	Lys	Asp	Ser	Ala	Gly	Lys	Ile	Asn	Gly	Phe	Leu	Ile	Asp	Thr	Asp
65					70					75					80
Asp	His	Met	Val	Gly	Thr	Ile	Val	Ala	Ala	Met	Thr	Ser	Asn	Gln	Lys
				85					90					95	
Ala	Ala	Tyr	Glu	Asn	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Asp	Asn	Ala	Val	
			100				105					110			
Ala	Asn	Pro	Met	Gly	Tyr	Leu	Val	Glu	Lys	Val	Phe	Lys	Asp	Glu	Ser
		115					120					125			
Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Thr	Ser	Pro	Trp	Gly	Gly	Asp	Ser	Ser
	130					135					140				
Ala	Leu	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Ser	Leu	Ser	Lys	Glu	Leu	Ala	Lys	Thr
145					150					155					160
Ser	Ala	Pro	Thr	Ala	Asp	Lys	Thr	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Gly
				165					170					175	
Glu	Asn	Lys	Glu	Leu	Lys	Gln	Gly	Leu	Trp	Phe	Leu	Lys	Asp	Val	Thr
			180					185					190		
Pro	Thr	Asp	Asp	Thr	Lys	Gly	Thr	Asn	Ser	Ile	Pro	Ile	Ile	Thr	Pro
		195					200						205		
Thr	Thr	Phe	Asp	Gly	Ala	Asp	Ser	Trp	Gly	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asn
	210					215					220				
Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Asp	Lys	Lys	Leu	Val	Asp	Ser	Lys	Asp	Asp	Gly
225					230					235					240
Thr	Tyr	Thr	Pro	Asn	Thr	Gln	Pro	Asp	Tyr	Ala	Val	Gly	Asp	Asp	Val
				245					250					255	
Tyr	Tyr	Glu	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Pro	Val	Tyr	Thr	Gly	Tyr	Asp	Ile
			260					265					270		
Asp	Pro	Thr	Met	Lys	Asp	Ala	Ala	Lys	Thr	Arg	Ile	Phe	Lys	Ile	Asn
		275					280					285			
Asp	Thr	Ala	Ser	Lys	Ala	Leu	Thr	Val	Ser	Thr	Gly	Thr	Val	Ile	Glu
	290					295					300				
Ser	Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Ala	Gln	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Leu	Val	Lys
305					310					315					320
Asp	Asn	Asp	Tyr	Thr	Val	Thr	Val	Thr	Asp	Tyr	Gly	Asp	Val	Asn	Thr
				325					330					335	
Pro	Asp	Thr	Asp	Ala	Tyr	Lys	Gly	Gly	His	Val	Thr	Thr	Ile	Asp	Leu
		340						345					350		
Gly	Lys	Tyr	Val	Asn	Lys	Ala	Lys	Gly	Ser	Lys	Ser	Ala	Thr	Asp	Gly
		355					360					365			
Ile	Leu	Glu	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Ile	Val	Lys	Ala	Lys	Leu	Asn
	370					375					380				
Lys	Asp	Ala	Leu	Ile	Ser	Glu	Pro	Asp	Asn	Leu	Gln	Lys	Asn	Pro	Asn
385					390					395				400	
Lys	Val	Asp	Leu	Glu	Tyr	Ser	Asn	His	Pro	Glu	Glu	Val	Asn	His	Ala
			405						410					415	
His	Lys	Val	Pro	Gly	Pro	Glu	Val	Pro	Val	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Phe	Asp
			420						425					430	
Ile	Leu	Lys	Thr	Asp	Lys	Ala	Gly	Thr	Thr	Lys	Leu	Pro	Gly	Ala	Lys
		435					440					445			
Phe	Thr	Ile	Glu	Ala	Val	Ser	Gly	Thr	Ser	Lys	His	Asp	Gly	Lys	Tyr
	450					455					460				
Leu	Gly	Ser	Tyr	Gly	Lys	Asp	Gly	Trp	Asn	Tyr	Leu	Asp	Asn	Lys	Pro
465					470					475					480
Ala	Val	Ala	Asp	Thr	Asp	Gly	Val	Phe	Thr	Thr	Gly	Thr	Asp	Gly	Lys
				485					490					495	
Ile	Asn	Val	Ser	Gly	Leu	Asp	Ala	Gly	Thr	Tyr	Glu	Val	His	Glu	Ile
			500					505					510		
Ala	Pro	Pro	Asp	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ile	Ser	Leu	Pro	Lys	Phe	Gln	Phe
		515					520					525			
Thr	Ile	Thr	Pro	Thr	Val	Ser	Asn	Glu	Val	Ala	Gly	Arg	Lys	Thr	Ile
	530					535					540				

Thr Val Val Ala Leu Ser Leu Ala Lys Gly Ala Asp Val Arg Ala Ser
 545 550 555 560
 Leu Ser Gln Asp Gly Lys Thr Leu Asn Ile Trp Asn Ala Lys Asn Ile
 565 570 575
 Thr Glu Leu Pro Lys Thr Gly Gly Ala Gly Leu Ala Met Ile Val Ala
 580 585 590
 Val Gly Ala Leu Phe Ile Ala Ala Ser Gly Ile Phe Ala Leu Arg Ala
 595 600 605
 Arg Arg Lys Ala
 610

<210> 23

<211> 256

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 23

Met Thr Gly Glu Lys Gly Gly Leu Leu Ala Gly Leu Arg Ala Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Arg His Ala Ala Pro Val Arg Leu Ala Val Leu Met Ala
 20 25 30
 Leu Pro Leu Pro Leu Leu Gly Ala Met Pro Tyr Arg Gly Val Gln Ile
 35 40 45
 Phe Ser Ala Trp Asn Tyr Trp Tyr Ala Leu Phe Leu Pro Val Ala Leu
 50 55 60
 Ser Leu Val Val Ala Cys Val Ala Arg Ala Asp Ala Arg Thr Arg Met
 65 70 75 80
 Arg Gly Leu Leu Gly Leu Gly Phe Pro Leu Arg Arg Ala Trp Trp Ala
 85 90 95
 Lys Ala Leu Trp Cys Leu Ala Leu Cys Thr Leu Ser Asn Leu Val Val
 100 105 110
 Phe Gly Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ala Phe Ser Ser Gln Gly Leu Thr
 115 120 125
 Val Ala Gly Thr Leu Thr Met Leu Leu Cys Ala Leu Val Asn Thr Val
 130 135 140
 Thr Ala Ala Trp Met Ile Pro Ala Gly Leu Phe Leu Thr Ala Arg Leu
 145 150 155 160
 Gly Met Leu Ala Gly Ile Phe Cys Pro Leu Ala Ala Gln Leu Val Gly
 165 170 175
 Gly Phe Ala Trp Ser Leu Met Pro Leu Pro Gln Leu Phe Pro Pro Ser
 180 185 190
 Ala Ser Met Val Ile Pro Thr Ser Phe Ile Pro Val Leu Pro Ser Gly
 195 200 205
 Glu Pro Leu Ala Ala Asp Met Ala Leu Gly Gly Ala Leu Ala Ala Asp
 210 215 220
 Gly Met Leu Thr Leu Ala Gly Leu Ala Val Cys Ala Leu Ala Phe Ala
 225 230 235 240
 Ala Leu Thr Ala Ala Gly Ala Ala Trp Phe Ala Arg Ser Glu Glu Arg
 245 250 255

<210> 24

<211> 1156

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 24

Met Glu Gly Leu Thr Ser Met Gly Ile Lys Asn Ala Met Val Arg Met
 1 5 10 15
 Ala Asp Lys Ala Gly Asn Ala Val Ala Lys Val Ser Ala Leu Ser Ser
 20 25 30
 Ala Gln Leu Asp Glu Ile Glu Arg Lys Arg Glu Ala Tyr Leu Ser Glu

		35					40					45					
Lys	Pro	Asp	Pro	Ser	Asp	Pro	Gln	Ala	Ile	Glu	Leu	Thr	Asn	Arg	Leu		
	50					55					60						
Leu	Ala	Thr	Ala	Gly	Val	Glu	Ile	His	Gly	Ala	Tyr	Leu	Pro	Gln	Leu		
65					70					75					80		
Arg	Asp	Val	Tyr	Cys	Pro	Val	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Tyr	Pro	Asp	Ser		
				85					90					95			
Phe	Asp	Ala	Leu	His	Asn	Ile	Arg	His	Met	Asn	Ile	Thr	Lys	Trp	Ile		
			100					105					110				
Val	Asp	Pro	Lys	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Lys	Leu	Ile	Asn	Val	Tyr	Asp		
		115					120					125					
Val	Leu	Ala	Asp	Glu	Asp	Cys	Asn	Ile	Ala	Leu	Val	Phe	Asn	Arg	Thr		
	130					135					140						
Ser	Ser	Thr	Thr	Asn	Val	Tyr	Leu	Ala	Val	Val	Asp	Thr	Asn	Asn	Thr		
145					150					155					160		
Glu	Asp	Asn	Ile	Asp	Val	Asp	Asn	Phe	Thr	Lys	Arg	Ile	Ser	Asp	Ala		
				165					170					175			
Val	Lys	Gly	Asn	Phe	Pro	Gly	Ser	Glu	Ile	Ser	Asp	Pro	Gln	Arg	Gly		
			180					185					190				
Ser	Ile	Pro	Cys	Leu	Gln	Glu	Arg	His	Pro	Phe	Ser	Val	Ala	Ala	Val		
		195					200					205					
Ser	Asn	Val	Pro	Thr	Glu	Lys	Asn	Asp	Arg	Phe	Met	Thr	Gln	Thr	Ile		
	210					215					220						
Glu	Lys	Val	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Pro	Arg	Asn	Arg	Ser	Glu	Asp	Tyr		
225				230						235					240		
Thr	Ile	Val	Leu	Leu	Ala	Thr	Pro	Ile	His	Asp	Val	Glu	Glu	Arg	Lys		
				245					250					255			
Leu	Arg	Leu	Ala	Glu	Leu	His	Ser	Met	Leu	Thr	Pro	Tyr	Ala	Ser	Trp		
			260					265					270				
Met	Thr	Asn	Tyr	Val	Tyr	His	Arg	Asn	Asp	Ser	Ile	Gly	Ser	Ser	Ala		
		275					280					285					
Thr	Ile	Gly	Val	Asn	Ala	Gly	Val	Ser	Ala	Gly	Thr	Gln	Asn	Gly	Thr		
		290				295					300						
Ser	Gln	Thr	Ile	Gly	Asn	Asn	Tyr	Asn	Glu	Thr	Asp	Ser	Ser	Asn	Glu		
305					310					315					320		
Ser	Thr	Ser	Gln	Ser	Glu	Ser	Gln	Gly	Thr	Ser	Asp	Ser	Thr	Ser	Ser		
				325					330					335			
Ser	Glu	Ser	Ile	Thr	Asp	Thr	Asp	Ser	Asn	Gly	Thr	Asn	Glu	Ser	Ser		
			340					345					350				
Gln	Val	Asp	Val	Ser	Gly	Gly	Phe	Asp	Leu	Lys	Ile	Ala	Arg	Val	Gly		
		355					360					365					
Ala	Ser	Leu	Asn	His	Ser	His	Gly	Ser	Ser	His	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala		
		370				375					380						
Lys	Gly	Thr	Thr	Asp	Thr	Val	Gly	Gln	Ala	Val	Thr	Lys	Ser	Leu	Gly		
385					390					395							

Arg	His	Pro	Ile	Phe	Ala	Leu	Asn	Pro	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	His	Pro
545					550					555					560
Ser	Phe	Ser	Val	Tyr	Pro	Ala	Thr	Val	Thr	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	Ser
				565					570						575
Gly	Lys	Glu	Leu	Ala	Tyr	Ser	Leu	Asn	Phe	Pro	Lys	Lys	Ser	Val	Pro
			580					585					590		
Gly	Leu	Pro	Val	Ile	Glu	Cys	Ala	Ala	Phe	Gly	Arg	Asn	Val	Ser	Thr
		595					600					605			
Phe	Asp	Gly	Thr	Gln	Pro	Asp	Lys	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Arg	Ile	Phe
610						615					620				
His	Met	His	Arg	Glu	Glu	Pro	Ala	Lys	Val	Leu	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser
625					630					635					640
Leu	Ala	Ser	His	Val	Phe	Val	Thr	Gly	Ser	Thr	Gly	Ala	Gly	Lys	Thr
				645					650						655
Asn	Thr	Val	Cys	Arg	Ile	Leu	Asp	Glu	Ala	Tyr	Asp	Gln	Gly	Val	Gly
			660					665					670		
Phe	Leu	Val	Ile	Glu	Pro	Ala	Lys	Gly	Glu	Tyr	Lys	Asp	Val	Phe	Gly
		675					680					685			
Gly	Leu	Asp	Asp	Val	His	Val	Phe	Gly	Thr	Asn	Pro	Ala	Phe	Thr	Pro
690						695					700				
Leu	Leu	Arg	Ile	Asp	Pro	Phe	Ser	Phe	Pro	Gln	Gly	Ile	His	Val	Leu
705					710					715					720
Glu	His	Leu	Asp	Arg	Leu	Val	Glu	Ile	Phe	Asn	Val	Cys	Trp	Pro	Met
				725					730						735
Tyr	Ala	Ala	Met	Pro	Ala	Val	Leu	Lys	Asp	Ala	Ile	Ser	Arg	Ser	Tyr
			740					745							750
Glu	Asp	Cys	Gly	Trp	Asn	Leu	Thr	Thr	Ser	Glu	Asn	Ser	Phe	Gly	Glu
		755					760					765			
Gly	Leu	Tyr	Pro	Ser	Phe	Ala	Asp	Val	Ala	Arg	Asn	Val	Arg	Glu	Ile
770					775						780				
Leu	Asp	Ser	Ser	Glu	Tyr	Asp	Ala	Glu	Asn	Lys	Gly	Ala	Tyr	Lys	Gly
785					790					795					800
Ser	Leu	Leu	Thr	Arg	Leu	Asn	Ser	Leu	Thr	Asn	Gly	Leu	Asn	Gly	Met
				805					810						815
Met	Leu	Thr	Ser	Asp	Gly	Val	Asp	Asp	Ala	Thr	Leu	Phe	Asp	Gly	Asn
			820					825					830		
Thr	Ile	Ile	Asp	Leu	Ser	Arg	Val	Gly	Ser	Thr	Glu	Thr	Lys	Ser	Leu
			835				840						845		
Phe	Met	Gly	Leu	Ile	Val	Leu	Lys	Leu	Gln	Glu	His	Arg	Met	Ala	Ala
850						855					860				
Ala	Asp	Gly	Met	Asn	Gln	Pro	Leu	Arg	His	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Glu
865					870					875					880
Ala	His	Asn	Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Ser	Met	Glu	Gln	Ser	Thr	Glu	Gly
				885						890					895
Gly	Asn	Leu	Leu	Gly	Lys	Ser	Val	Glu	Met	Leu	Ser	Asn	Ser	Ile	Ala
			900					905					910		
Glu	Met	Arg	Thr	Tyr	Gly	Glu	Gly	Phe	Ile	Ile	Ala	Asp	Gln	Ala	Pro
			915				920					925			
Gly	Leu	Leu	Asp	Met	Ala	Ala	Ile	Arg	Asn	Thr	Asn	Thr	Lys	Ile	Ile
					935						940				
His	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Asp	Arg	Glu	Leu	Val	Gly	Arg	Ala	Ala
945					950					955					960
Asn	Leu	Asn	Ala	Pro	Gln	Ile	Val	Glu	Leu	Ala	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly
				965						970					975
Val	Ala	Ala	Val	Tyr	Gln	Asn	Asp	Trp	Val	Glu	Pro	Val	Met	Cys	Lys
			980					985					990		
Val	Ser	Lys	Ala	Asp	Asp	Ala	Glu	Pro	Leu	Val	Tyr	Thr	His	Ser	Glu
			995				1000					1005			
Thr	Lys	Glu	Lys	Ser	Ala	Asn	Ala	Asn	Asp	Ala	Phe	Asp	Val	Ala	Glu
					1015						1020				
Val	Leu	Ala	Lys	Gly	Asp	Arg	Ile	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Leu	Arg	Asp
1025					1030					1035					1040
Leu	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Arg	Ile	Asp	Leu	Asp	Ser	Ser	Met	Lys	Val

```

                1045                1050                1055
Arg Ile Leu Arg Thr Ile Gln Asn Pro Pro Glu Glu Pro Arg Met Leu
                1060                1065                1070
Ser Leu Ala Pro Ile Met Gly Ala Leu Phe Pro Asn Val Arg Glu Ala
                1075                1080                1085
Thr Lys Asp Glu Ile Lys Arg Cys Thr Asp Val Arg Gln Trp Thr Val
                1090                1095                1100
Ala Ala Asp Ser Ala Leu Arg Ala Ser Val Ser His Arg Ile Asp Asp
1105                1110                1115                1120
Ile Val Arg Thr Val Val Ile Gln Gly Ile Met Thr Asp Ile Leu His
                1125                1130                1135
Val Gln Glu Gln Asn Asp Lys Ala Phe Ser Asp Trp His Glu Asn Gly
                1140                1145                1150
Arg Leu Ile Arg
                1155

```

<210> 25

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentis

<400> 25

```

Met Gly Thr Gly Glu Leu Ile Arg Lys Tyr Arg Lys Met Arg Gly Leu
1                5                10                15
Thr Gln Ser Glu Leu Ala Glu Lys Cys Gly Leu Thr Asp Ser Ala Ile
                20                25                30
Arg Asn Tyr Glu Leu Gly Asn Arg Thr Pro Gly Glu Asn Gln Val Lys
                35                40                45
Glu Ile Ala Ser Ala Leu His Val Ala Pro Glu Ser Leu Phe Asp Val
                50                55                60
Pro Ala Ala Thr Ala Arg Glu Ala Leu Glu Leu Ile Phe Arg Ile Asp
65                70                75                80
Glu Glu Phe Gly Leu Lys Pro Lys Glu Ile Asp Gly Glu Val Val Leu
                85                90                95
Ala Ile Asp Pro Ser Ser Lys Lys Ala Pro Lys Leu Val Gln Thr Leu
                100                105                110
Lys Ala Trp Leu Ala Gln Ile Asp Ser Glu Lys Ser Gly Lys Ile Thr
                115                120                125
Ala Glu Gln Leu Ala Glu Trp Lys Ala Lys Phe Gly Ala
                130                135                140

```

10

REIVINDICACIONES

1. Una cepa aislada de *Bifidobacterium adolescentis* seleccionada del grupo que consiste en DSM 29103 y un mutante de dicha cepa que es capaz de
5
 - i) aumentar la resistencia eléctrica transepitelial (TER) de una monocapa de células Caco-2 después de 10 h de tratamiento a más del 120% de la TER al inicio del tratamiento;
 - ii) inducir secreción de >200 pg/ml de IL-10 cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas; e
 - 10 iii) inducir una proporción IL-10:IL-12 > 1 cuando se coincuba con células dendríticas derivadas de CMSP humanas.
2. Una cepa aislada según la reivindicación 1 que es la cepa de *Bifidobacterium adolescentis* depositada como DSM 29103.
15
3. Un producto probiótico que comprende una cepa aislada según la reivindicación 1 o 2 y un crioprotector.
4. Un producto probiótico según la reivindicación 3 en donde el crioprotector es un sacárido.
- 20 5. Una cepa aislada según la reivindicación 1 o 2 o un producto probiótico según la reivindicación 3 o 4 para uso en mejorar la función barrera intestinal.
6. Una cepa aislada según la reivindicación 1 o 2 o un producto probiótico según la reivindicación 3 o 4 para uso en provocar una respuesta inmunitaria antiinflamatoria.
25
7. Una cepa aislada según la reivindicación 1 o 2 o un producto probiótico según la reivindicación 3 o 4 para uso en la prevención, alivio de síntomas, y/o tratamiento de una afección inflamatoria intestinal tal como EII o SII, una enfermedad hepática tal como EGHNA, EHNA, cirrosis, o enfermedad hepática alcohólica, un trastorno metabólico tal como síndrome metabólico, resistencia a insulina, diabetes de tipo 2, obesidad, aterosclerosis cardiovascular, una enfermedad autoinmunitaria, tal como enfermedad celiaca, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple o artritis reumatoide, y/o una afección mental tal como trastorno depresivo mayor, un trastorno del estado de ánimo, un trastorno cognitivo, síndrome de fatiga crónica, o ansiedad.
30

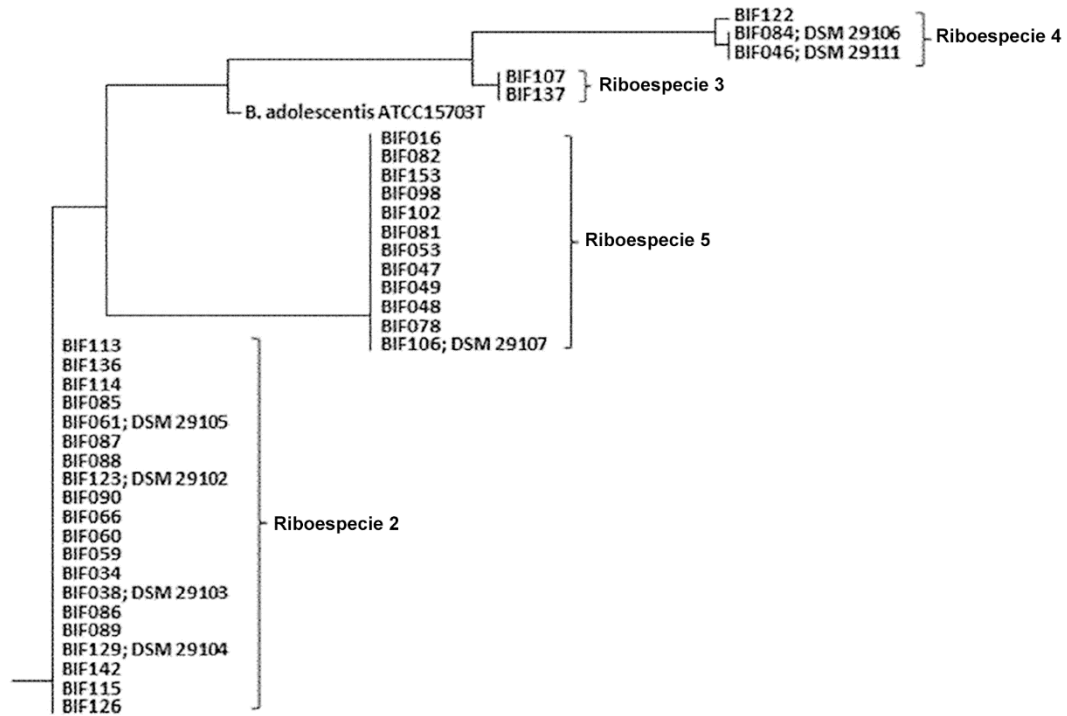


Figura 1

	59	69	79	89	99	109	119
ATCC15703	AAGUCGAACGGGAUCGGCUGGAGCUUGCUCGGCCGUGAGAGUGGCGAACGGGUGAGUAA						
RIBO2	AAGUCGAACGGGAUCC-CAGGAGCUUGCUCUG-GGUGAGAGUGGCGAACGGGUGAGUAA						
RIBO5	AAGUCGAACGGGAUCC-CAGGAGCUUGCUCUG-GGUGAGAGUGGCGAACGGGUGAGUAA						
RIBO3	AAGUCGAACGGGAUCGGCUGGAGCUUGCUCGGCCGUGAGAGUGGCGAACGGGUGAGUAA						
RIBO4	AAGUCGAACGGGAUCGGCUGGAGCUUGCUCGGCCGUGAGAGUGGCGAACGGGUGAGUAA						
	*****	*	*****	*	*****	*****	*****
	181	191	201	211	221	231	241
ATCC15703	UGCUCAGUUGGAUGCAUG-----UCCUUCUGGGAAGAUUCUAUCGGUAUGG						
RIBO2	UGCUCAGUUGACCGCAUG-----GUCCUCUGGGAAGAUUCU-GCGUAUGG						
RIBO5	UGCUCAGUUGGAUGCAUG-----UCCUUCUGGGAAGAUUCA-UCCGUAUGG						
RIBO3	UGCUCAGUUGGAUGCAUG-----UCCUUCUGGGAAGAUUCUAUCGGUAUGG						
RIBO4	UGCUCGACAUAGCGCAUG-----UCGUGUUGGGAAGAUUCUAUCGGUAUGG						
	*****	*****		*****	*****	*****	*****
	253	263	273	283	293	303	313
ATCC15703	UCCUAUCAGCUUGAUGGCGGGGUAACGGCCACCAUGGCUUCGACGGGUAGCCGCCUGA						
RIBO2	UCCUAUCAGCUUGAUGGCGGGGUAACGGCCACCAUGGCUUCGACGGGUAGCCGCCUGA						
RIBO5	UCCUAUCAGCUUGAUGGCGGGGUAACGGCCACCAUGGCUUCGACGGGUAGCCGCCUGA						
RIBO3	UCCUAUCAGCUUGAUGGCGGGGUAACGGCCACCGAGCCUACGACGGGUAGCCGCCUGA						
RIBO4	UCCUAUCAGCUUGAUGGCGGGGUAACGGCCACCGAGCCUACGACGGGUAGCCGCCUGA						
	*****	*	*****	*	*****	*****	*****

Figura 2

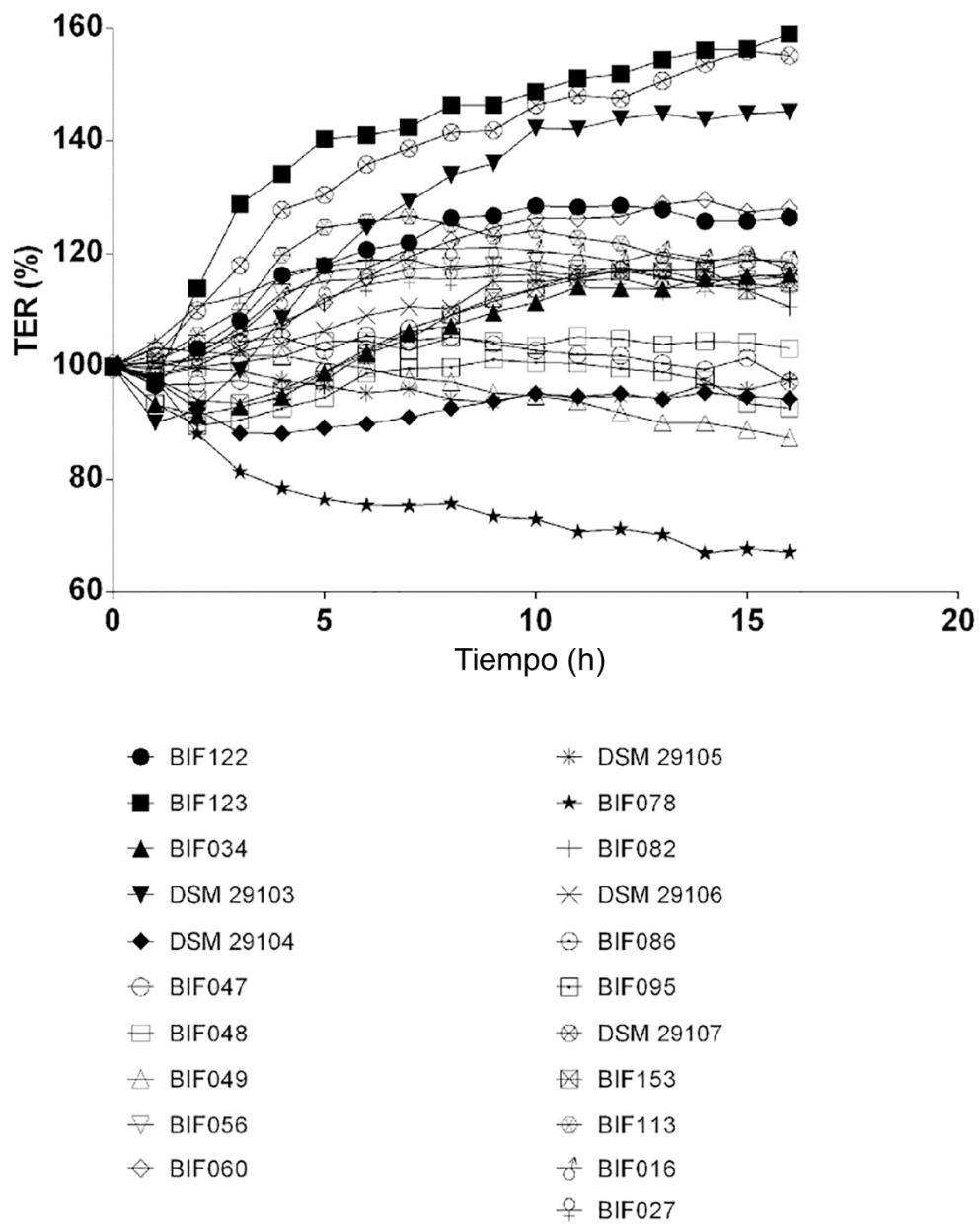


Figura 3

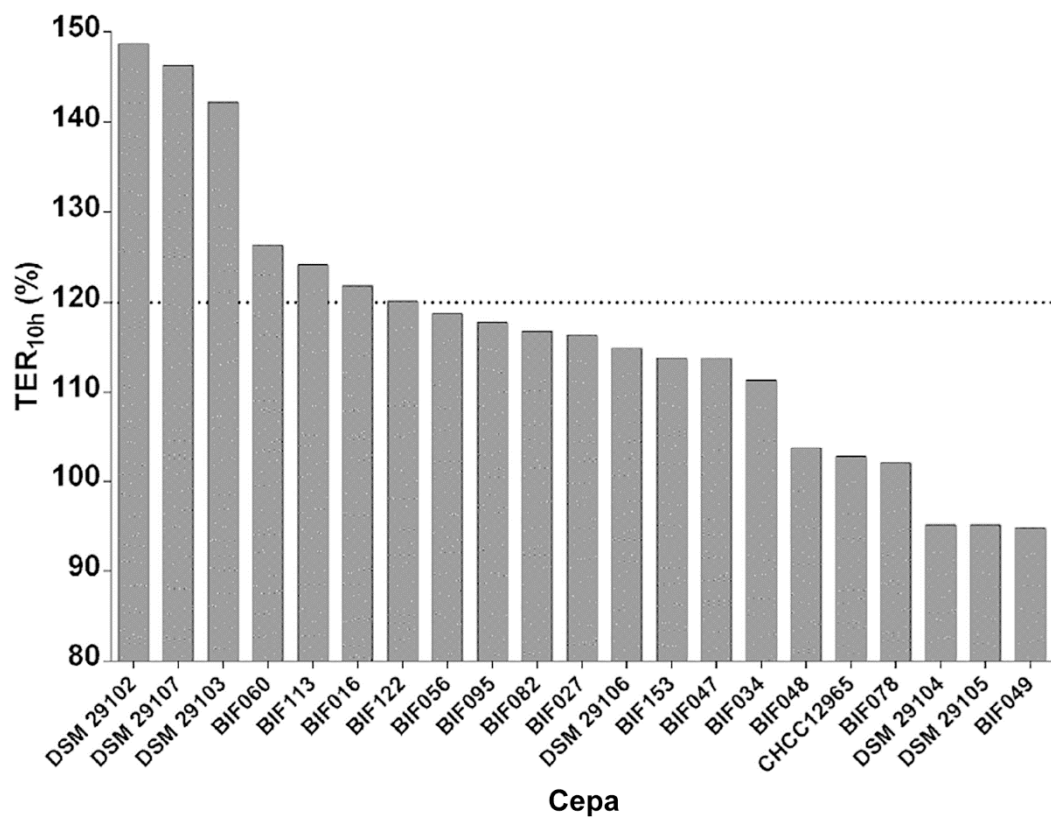


Figura 4

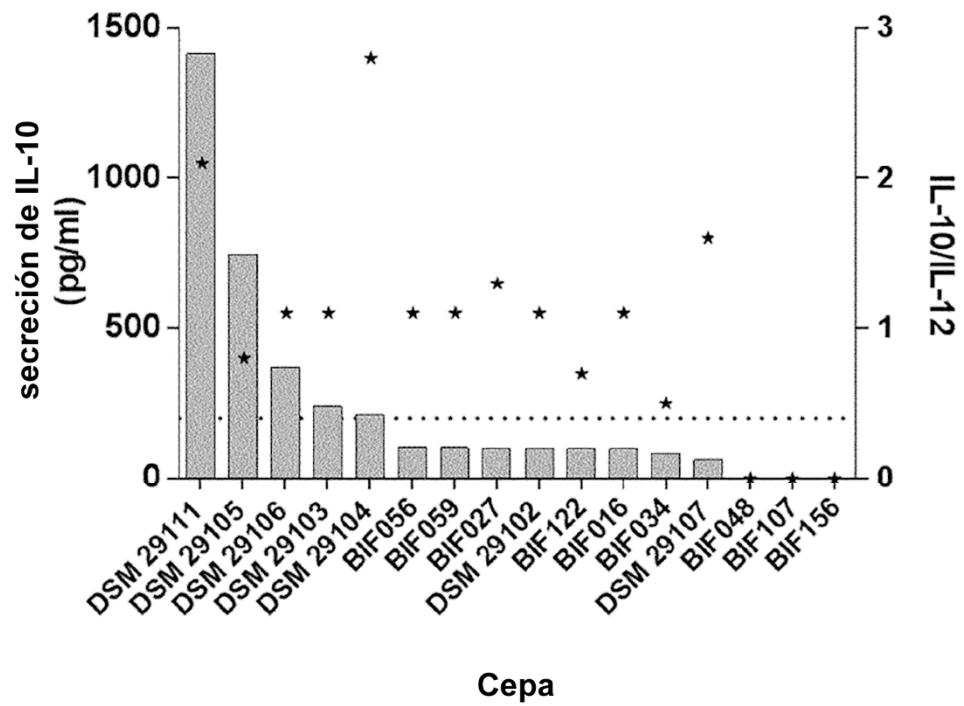


Figura 5

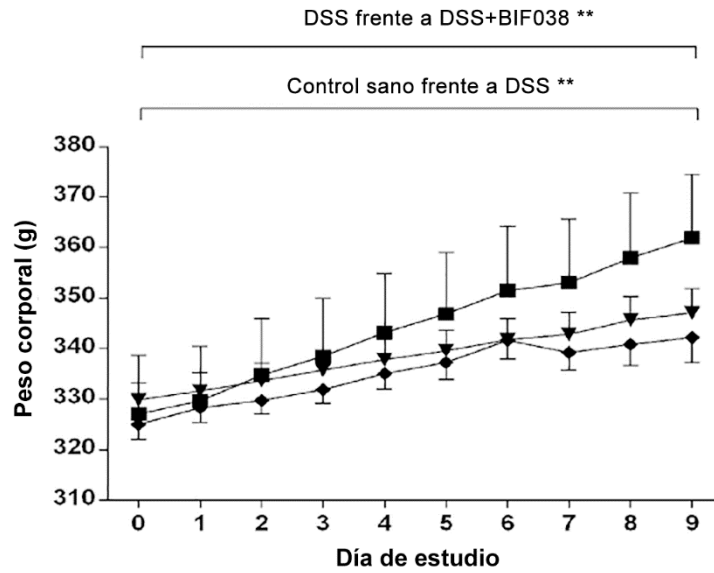


Figura 6

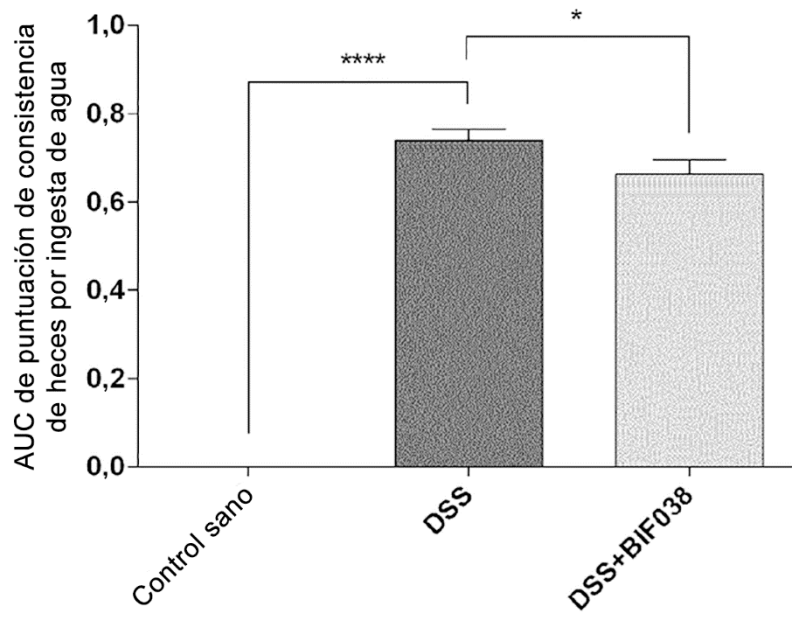


Figura 7

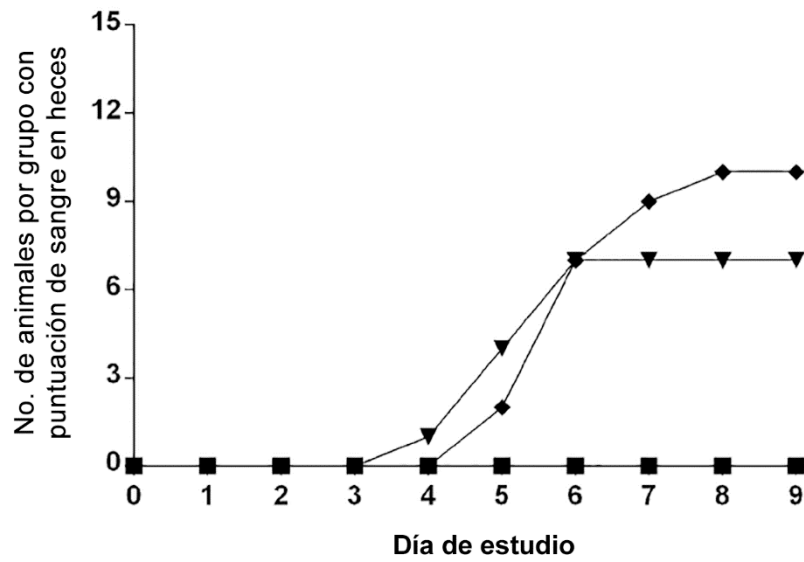


Figura 8

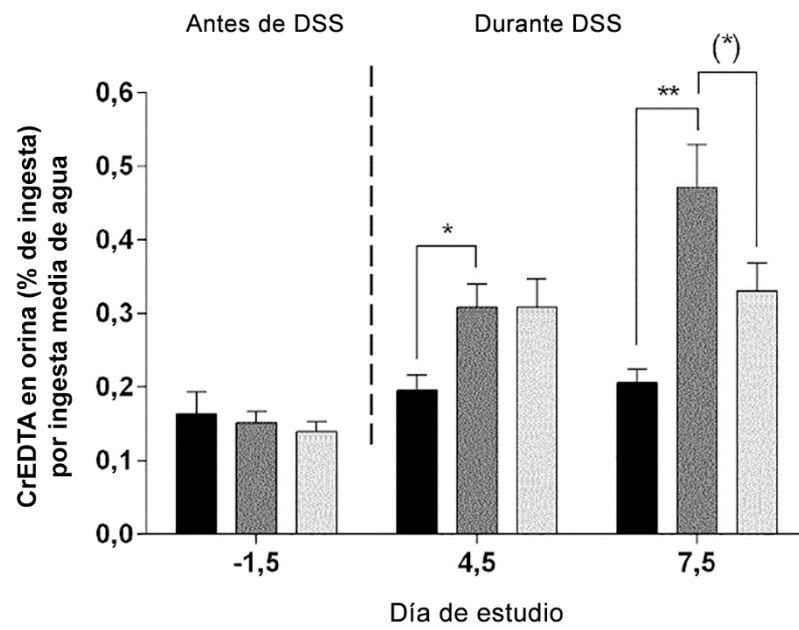


Figura 9

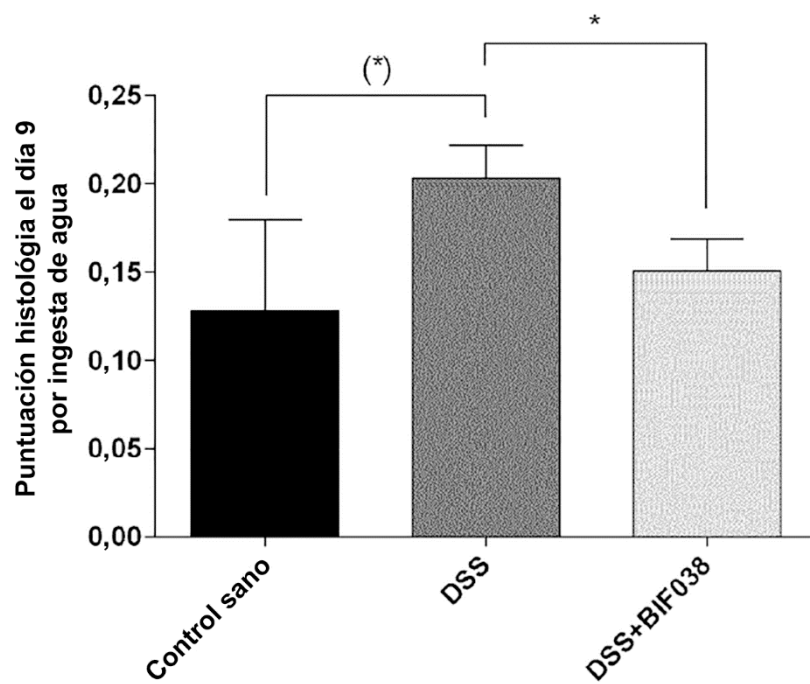


Figura 10

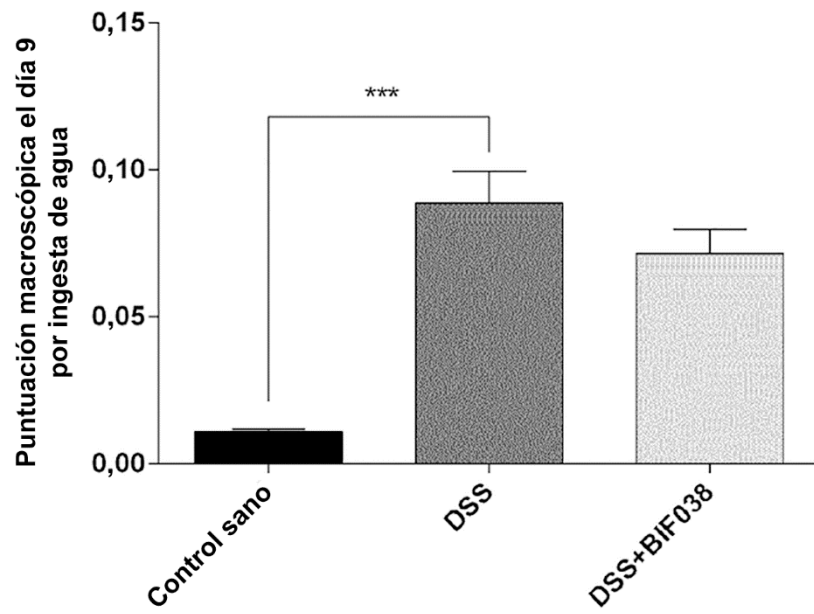


Figura 11