

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 834**

51 Int. Cl.:

A23C 9/123

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2012 PCT/GB2012/051730**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2013 WO13011320**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2012 E 12753549 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2734057**

54 Título: **Formulación probiótica**

30 Prioridad:

21.07.2011 GB 201112487

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

30.11.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF BRISTOL (100.0%)
Beacon House, Queens Road
Bristol BS8 1QU, GB**

72 Inventor/es:

**COGAN, TRISTAN y
BAILEY, JENNY**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

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

ES 2 796 834 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

Formulación probiótica

5 Esta invención se refiere a una formulación probiótica. Más particularmente, la presente invención describe un organismo probiótico que es capaz de proliferar en un entorno que generalmente es desfavorable para los organismos probióticos.

10 Los probióticos son organismos, generalmente bacterias, que se consideran beneficiosos en lugar de perjudiciales para su huésped animal. En términos de salud digestiva, el concepto de consumo de bacterias beneficiosas ha sido popular en los últimos años, a pesar de que Elie Metchnikoff propuso por primera vez el beneficio de consumir cepas específicas de bacterias en 1907. Sugirió que, dado que las bacterias ácido lácticas pueden prevenir la putrefacción de los alimentos almacenados, también pueden beneficiar el tracto gastrointestinal; el bacilo búlgaro (más tarde identificado como *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*) aislado de un producto lácteo fermentado fue de particular interés. Metchnikoff propuso que era la cepa óptima para consumir debido a su capacidad para producir grandes cantidades de ácido láctico con poco ácido succínico o acético; su capacidad de coagular la leche rápidamente, y la falta de alcohol y acetona producidos (1). El interés en los probióticos disminuyó con la llegada de los antibióticos. Sin embargo, con la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, hay un renovado interés en las bacterias probióticas, que ahora se definen como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped" (2). Ahora es un concepto popular que la acumulación de organismos probióticos en el intestino es beneficiosa para la salud general del organismo huésped y hay informes que indican que la administración de probióticos es útil en el tratamiento de la enfermedad intestinal.

25 Por ejemplo, siguiendo el trabajo de Metchnikoff, los probióticos, particularmente *Lactobacillus* spp., han sido probados en el tratamiento de varias enfermedades. Los probióticos de *Lactobacillus* spp. también han tenido éxito en el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda en niños (3) y en la prevención de la diarrea del viajero (4) y la diarrea asociada a antibióticos (DAA) (5), pero no la enfermedad de Crohn (6). Por el contrario, dos preparaciones probióticas que no se basan en *Lactobacillus* spp., VSL#3 y *Escherichia coli* Nissle 1917, han demostrado ser prometedoras en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (7-10). La enfermedad de Crohn se considera una respuesta a un desencadenante ambiental en un huésped genéticamente susceptible. Se cree que el desencadenante ambiental son las bacterias y la investigación actual ahora se centra en la *E. coli* invasiva adherente (ECIA) (11). Los presentes inventores consideraron que, si la enfermedad de Crohn es realmente desencadenada por bacterias, entonces es un candidato atractivo para el tratamiento con un probiótico que podría superar a las bacterias desencadenantes o podría desviar la respuesta inmune para prevenir la inflamación no controlada, que es un rasgo característico de la enfermedad de Crohn y otras afecciones inflamatorias del intestino. Sin embargo, para que cualquier probiótico lleve a cabo cualquiera de estas funciones, debe ser capaz de sobrevivir y competir en este entorno desafiante.

40 Se ha descrito que otras bacterias tienen tolerancia al hierro, tal como el *S. thermophilus* descrita por Sieuwerts et al., (38) por Herve-Jimenez et al., (39) y por Simova et al., (37). Sin embargo, cuando se discute la notable expresión diferencial de los genes de la proteína de transporte de hierro, Sieuwerts (38) describe que esta es una respuesta al peróxido de hidrógeno y el uso de *S. thermophilus* en cocultivo no mostró un efecto de respuesta al hierro. Simova (37) describe que la presencia de fortificación con hierro o la concentración de lactato ferroso no tuvieron un efecto significativo en el tiempo necesario para alcanzar un pH de 4,5 y, por lo tanto, en las tasas de crecimiento. Los presentes inventores probaron la cepa descrita por Herve-Jiménez et al., (39) y descubrieron que esta cepa no respondía al hierro (cepa BAA250 en la Figura 17).

50 A este respecto, los presentes inventores señalaron que los probióticos *Lactobacillus* spp., de uso general generalmente no eran capaces de sobrevivir y competir en el ambiente hostil del intestino inflamado asociado con tales enfermedades, y especialmente en presencia de hierro de la sangre en el intestino inflamado. Los presentes inventores se propusieron investigar más a fondo esta observación.

55 Las bacterias ácido lácticas (BAL) son organismos inusuales en el sentido de que no parecen tener un requerimiento de hierro (12-14) aunque mantienen una alta demanda de manganeso (15). En el cuerpo humano, el hierro es secuestrado por las transferrinas y la lactoferrina (16). El secuestro de hierro se considera el factor principal que limita la tasa de crecimiento bacteriano en el cuerpo. Un aumento en la disponibilidad de hierro en el intestino mediante suplementos dietéticos, hemorragia intestinal, cirugía, trauma o cuando está bajo estrés, conducirá a un aumento en la abundancia de muchas especies bacterianas. Esto está mediado por una mayor disponibilidad de hierro libre, o por la presencia de noradrenalina, que descarga el hierro de los quelantes y puede suministrarlo a algunas especies de bacterias (17-18). En estas condiciones de alto contenido de hierro, las BAL son sacadas de competencia rápidamente a medida que otras especies aumentan su tasa de crecimiento en respuesta a la disponibilidad de hierro y predominan. Por lo tanto, los presentes inventores determinaron que para que se mantengan niveles adecuados o terapéuticos de bacterias probióticas en condiciones altas de hierro, deben ser capaces de responder a este elemento aumentando la tasa de crecimiento para competir con la flora normal. Luego postularon que la incapacidad de competir con posibles patógenos en condiciones de estrés y trauma, y especialmente en aquellas condiciones que dan como resultado un

aumento en los niveles de hierro, puede contribuir a la falta de eficacia demostrada por muchos probióticos basados en BAL en el tratamiento de enfermedades.

Las cepas de bacterias ácido lácticas son conocidas en la técnica como se describe, por ejemplo, en Bolotin et al., (2004), Nature Biotechnology, vol. 22, número 12, páginas 1554-1558.

Como se describirá a continuación, los presentes inventores han demostrado que la mayoría de las BAL no responden a la disponibilidad de hierro mediada por noradrenalina aumentando la tasa de crecimiento. Muchas enfermedades intestinales, tanto crónicas como agudas, están asociadas con hemorragias intestinales que conducirán a niveles más altos de hierro presentes en el intestino. Por lo tanto, esto no presentará un entorno adecuado para la colonización por probióticos convencionales basados en BAL, contribuyendo aún más a la falta de eficacia observada con muchos probióticos convencionales basados en BAL en el tratamiento de tales enfermedades.

Después de haber identificado este problema nunca antes visto, los presentes inventores investigaron la posibilidad de identificar un probiótico que de hecho fuera capaz de aumentar la tasa de crecimiento en respuesta a la disponibilidad de hierro. Los presentes inventores identificaron y seleccionaron especies de bacterias que pueden aumentar la tasa de crecimiento en estas condiciones.

Por consiguiente, la presente invención proporciona el *Streptococcus thermophilus* depositado como NCIMB 41856. Este puede aumentar la tasa de crecimiento en respuesta a una mayor disponibilidad de hierro, especialmente en un entorno competitivo *in vivo* en el que hay competencia por alimentos y otros requisitos para el crecimiento y la reproducción.

Ventajosamente, el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de esta invención presenta una alternativa a los probióticos tradicionales de BAL spp., porque es, de hecho, activo y funcional en la población de cultivo mixto que se encuentra en el verdadero ambiente intestinal, incluso durante períodos de mayor concentración de hierro por hemorragia intestinal, trauma, estrés u otros factores. Por lo tanto, el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención es adecuado para su uso en el tratamiento de enfermedades intestinales en general y especialmente para su uso en aquellas enfermedades asociadas o complicadas por niveles elevados de hierro resultantes, por ejemplo, de la presencia de sangre debido a sangrado intestinal o epitelios con fugas o por la presencia de hierro suplementado de un suplemento nutricional o alimento fortificado.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención es capaz de mantener su aumento en la tasa de crecimiento en un entorno de población mixta en presencia de hierro durante más de un día y más preferiblemente durante varios días. El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención puede crecer y competir con otras bacterias intestinales, tales como los organismos comensales, pero especialmente en presencia de bacterias patógenas, a las concentraciones de hierro que pueden encontrarse durante los períodos de hemorragia intestinal.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 es capaz de sobrevivir, reproducirse y crecer en un medio de crecimiento rico en hierro en presencia de otros organismos durante un tiempo equivalente al del tránsito digestivo normal, tal como al menos uno y hasta tres días. El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención puede crecer en presencia de bacterias endógenas y patógenas en un ambiente intestinal hostil o enfermo, así como en un ambiente intestinal saludable. Un ambiente intestinal "hostil" tiene la intención de describir un ambiente intestinal en el que los organismos probióticos generalmente luchan para competir con otros organismos y, por lo tanto, tienen una tasa de crecimiento más baja o no pueden sobrevivir. Los ejemplos, que no pretenden ser limitantes, de un ambiente intestinal hostil, incluyen la presencia de sangre, la presencia de niveles de minerales inducidos artificialmente, especialmente hierro y vitaminas, por ejemplo, de un suplemento, la presencia de agentes quelantes, la presencia de medicamentos u otros medicamentos que impactan en el ambiente intestinal, cambios causados por enfermedades gastrointestinales crónicas y cambios inducidos hormonalmente, tal como el estrés.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención es tolerante al pH bajo para permitir el paso a través del estómago durante la digestión y, en consecuencia, el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 puede sobrevivir a un pH de 2. El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 puede sobrevivir a un pH por debajo de 2 tal como 1,5 o incluso más bajo. Esto se puede lograr en un entorno de población mixta como el que se encuentra *in vivo*. Alternativamente, para superar los problemas asociados con el pH gástrico bajo, el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 se puede proporcionar en una formulación que es en sí misma resistente al pH gástrico bajo, tal como por ejemplo con un recubrimiento entérico resistente a la digestión o especialmente en forma de comprimido o cápsula. Tal recubrimiento puede ser de tipo convencional para una cápsula o comprimido para administración oral.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 puede sobrevivir, reproducirse y crecer en un medio de crecimiento de pH bajo equivalente al pH gástrico típico durante al menos el tiempo típico del tránsito gástrico que es de aproximadamente dos horas. Esto se puede lograr en un entorno de población mixta como el que se encuentra *in vivo*.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención es conocido por la designación interna de *Streptococcus thermophilus* JB010. El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 (JB010) de la invención puede identificarse mediante secuenciación de ADN total o parcial, tal como el análisis de ADN polimórfico amplificado

aleatoriamente (RAPD) en el que los cebadores M13 y MSP se usaron para amplificar aleatoriamente fragmentos de ADN de cepas de *S. thermophilus*. El patrón de bandas único generado por *S. thermophilus* NCIMB 41856 (JB010) demuestra diferencias genéticas entre esta cepa y todas las demás cepas examinadas. Esto muestra que el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención es diferente de la cepa VSL#3 disponible comercialmente. Los detalles de este análisis RAPD se expondrán con más detalle en los siguientes ejemplos.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención ha sido depositado en el Cultivo Nacional de Bacterias Industriales (Ferguson Building Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9YA UK, una Autoridad de Depósito Internacional registrada bajo el Tratado de Budapest) bajo el número de acceso NCIMB 41856.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención puede proporcionarse en una composición adecuada para uso como alimento, suplemento alimenticio, producto lácteo, producto lácteo fermentado, yogur, un producto alimenticio de formulación no lácteas, un nutracéutico o como un compuesto terapéutico. Dicha composición puede basarse en un producto lácteo, tal como es convencional para los probióticos. El producto lácteo es preferiblemente un producto lácteo fermentado tal como yogur. La composición puede contener el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 como único ingrediente probiótico, tal como el probiótico principal o puede contener una mezcla de probióticos. Las formulaciones no lácteas, las formulaciones con base en alternativas lácteas tales como la leche de soja y los yogures, las formulaciones con base en frutas y similares también se consideran suplementos alimenticios. Especialmente cuando la composición es un suplemento alimenticio, la composición puede comprender otros ingredientes tales como saborizantes u otros ingredientes alimenticios convencionales para mejorar el sabor, la palatabilidad, la textura u otras propiedades organolépticas de la composición.

Como alternativa, el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención puede proporcionarse en forma de polvo, cápsula o comprimido, y por lo tanto los ingredientes convencionales para ese sistema de administración estarán presentes, por ejemplo, gelatina, celulosa, almidones, excipientes, aglutinantes, sabores, antiaglomerantes, conservantes y otros vehículos e ingredientes de administración farmacéuticamente aceptables.

Más específicamente, la presente invención proporciona un alimento, un suplemento alimenticio, nutracéutico o un compuesto terapéutico que comprende el *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856.

Se prevé que la presente invención sea utilizable en el tratamiento de enfermedades intestinales, asociadas con un aumento en la disponibilidad de hierro en el intestino, o de enfermedades intestinales en las que el aumento en la biodisponibilidad del hierro se debe a hemorragia intestinal, cirugía, trauma, estrés, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, enfermedad celíaca, gastroenteritis, pancreatitis u otra enfermedad intestinal crónica o de enfermedades intestinales tales como úlcera, o pueden ser agudas tales como lesiones, infección (por ejemplo infección por *C. difficile* o infección por *Helicobacter*) o infestación por protozoos o gusanos.

El alimento, suplemento alimenticio, nutracéutico o compuesto terapéutico puede proporcionarse en una formulación adecuada para uso en humanos o en animales.

El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención también puede actuar localmente para reducir el nivel de inflamación crónica en el intestino. Esto es preferible ya que permite que el sistema inmunitario adaptativo elimine cualquier infección de manera controlada y promueva la regulación y resolución de la inflamación intestinal.

Los mecanismos a través de los cuales se ha supuesto que actúan los probióticos son numerosos e incluyen una influencia en el tiempo de tránsito intestinal, la competencia con los patógenos y la modulación inmune. No está claro qué efecto sobre el sistema inmune es más deseable. Es posible que se requiera una respuesta proinflamatoria para eliminar la infección de manera más efectiva (19-20), sin embargo, la activación prolongada de NF- κ B y la posterior producción de IL-8, RANTES y CXCL10 se ha implicado en modelos animales de EII (21). Por el contrario, se ha demostrado que las cepas de bacterias probióticas actúan específicamente sobre los componentes de la respuesta inmune adaptativa para reducir la inflamación y promover la regulación. *Faecalibacterium prausnitzii* es una cepa probiótica capaz de reducir la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-12 e IFN γ por las PBMC (22). La sobreexpresión de IEL reguladoras en un modelo de colitis en ratones fue inducida por dos mezclas de probióticos: *L. acidophilus* y *B. longum*; *L. plantarum*, *S. thermophilus* y *B. animalis* subespecie *lactis* (23). Además, una combinación de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *B. bifidum* y *S. thermophilus* subregularon las respuestas de citocinas Th1, Th2 y Th17, indujeron la generación de Tregs CD4⁺ Foxp3⁺ y promovieron células dendríticas reguladoras que expresan altos niveles de las citocinas reguladoras IL-10 y TGF β (24).

Como se expuso anteriormente, las BAL tiene requisitos únicos muy bajos para el hierro (12-14). El aumento de la biodisponibilidad del hierro durante el sangrado intestinal puede aumentar la tasa de crecimiento y la virulencia de muchos patógenos gastrointestinales (25); En estas condiciones, las BAL pueden ser superadas. Los resultados obtenidos por los presentes inventores indican que la mayoría de las BAL no pueden responder al aumento de la biodisponibilidad de hierro (véase la Tabla 1 a continuación), con la excepción de *Lactobacillus acidophilus* ASF360 y *Strep. thermophilus* de la presente invención, *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856. Se cree que uno de los principales mecanismos para la acción de los probióticos es la exclusión competitiva de los patógenos. Los resultados de los presentes inventores respaldan su teoría de que los probióticos basados en BAL son ineficientes durante la

enfermedad inflamatoria activa debido a su incapacidad para competir con los patógenos en presencia de hierro, debido a hemorragias o a los suplementos.

Para que un probiótico sea eficaz en el tratamiento de la EII, los presentes inventores consideran que debe ser capaz de competir eficazmente con los patógenos en las condiciones que se encuentran en el intestino no sano. También debería ser capaz de controlar las respuestas inmunes a los patógenos y restaurar la normalidad. Estas son las propiedades principales que se investigaron en este trabajo. Utilizando un proceso de selección racional, los presentes inventores determinaron que la cepa sensible al hierro de *S. thermophilus* NCIMB 41856 muestra potencial probiótico. Este *S. thermophilus* NCIMB 41856 funcionó al menos tan bien, y en muchos casos, mejor que las cepas más ampliamente investigadas de *L. acidophilus* y *E. coli* Nissle 1917. Se sabe que *E. coli* puede responder al hierro (25), y los presentes inventores han demostrado que *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) también puede responder al hierro (Tabla 1). Sin embargo, mientras que los presentes inventores han descubierto que *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) promovió una respuesta antiinflamatoria, encontraron que, de acuerdo con los hallazgos de otros grupos (26), *E. coli* Nissle 1917 provocó una respuesta proinflamatoria del intestino y de las células y líneas celulares derivadas del intestino. Los presentes inventores han planteado la hipótesis de que la activación de las células epiteliales, como se demuestra en el presente documento, por la capacidad de *E. coli* Nissle 1917 para inducir una respuesta de NF- κ B e IL-8, conduce a un aumento de las defensas inmunes innatas, mejorando así la función de barrera (27). Sin embargo, se han planteado preocupaciones sobre la seguridad de *E. coli* Nissle 1917 como probiótico, particularmente en pacientes inmunocomprometidos (28).

Los resultados presentados aquí muestran que la cepa de los presentes inventores de *S. thermophilus* (NCIMB 41856, también denominada JB010), es un probiótico prometedor en los experimentos *in vitro*. *S. thermophilus* se ha pasado por alto en gran medida como una cepa de bacterias probióticas a favor de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* spp y se ha realizado poco trabajo para determinar el modo de acción de este probiótico. A pesar de esto, *S. thermophilus* spp. es un constituyente de la preparación probiótica VSL # 3, que es una de las pocas terapias probióticas que tiene un efecto significativo en el tratamiento de la EII (10). La literatura publicitaria para VSL#3 sugiere que es la combinación o mezcla de las ocho cepas de bacterias que componen VSL#3 junto con el aumento en el número de bacterias presentes en una sola dosis del producto lo que proporciona este efecto beneficioso al proporcionando la "flora intestinal óptima". Además, los presentes inventores han demostrado que el *S. thermophilus* presente en VSL#3 no responde al hierro de la misma manera que el *S. thermophilus* NCIMB 41856 de la presente invención.

Los presentes inventores también han demostrado mediante análisis de ADN RAPD, como se describe a continuación, que su cepa de *S. thermophilus* (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856) no es la misma que la presente en VSL#3 (véase la Figura 10 que muestra la diferencia en el análisis de ADN entre los dos).

Los presentes inventores también han determinado las secuencias de genes parciales de los genes *sodA*, *dpr*, 16S y *rpoB* de *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 y han determinado, por alineación, que difieren de las mismas secuencias en las cepas de bacterias ácido lácticas LMG 18311, CNRZ1066, JIM 8232 y VSL#3 (véanse las Figuras 11-16). Los genes *sodA* y *dpr* se han asociado con el uso de hierro y/o manganeso en bacterias, especialmente BAL, mientras que los genes 16S y *rpoB* son representativos del linaje bacteriano.

El *S. thermophilus* también está presente en la mayoría de los productos lácteos fermentados, algunos de los cuales se han utilizado con éxito como tratamientos terapéuticos (29); sin embargo, los niveles de esta subespecie bacteriana presente en esos productos son demasiado bajos para tener un efecto probiótico (30). Los presentes inventores han encontrado que el efecto beneficioso ejercido por *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 depende de la dosis, con una dosis *in vitro* óptima 1000 veces más concentrada que la encontrada en la mayoría de los productos lácteos fermentados previamente probados. Pocos estudios han analizado el efecto probiótico de *S. thermophilus* solo, sin embargo, se informó que la leche fermentada con esta cepa de bacterias era equivalente a los inhibidores de la bomba de protones en la reducción de la gastritis inducida por medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (31).

Los presentes inventores creen que el efecto predominante de *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) sería reducir la inflamación en el intestino, en primer lugar, ejerciendo sus efectos desde el lumen del intestino y, en segundo lugar, cuando la función de barrera intestinal se ve comprometida, por el cruce a través del epitelio e interactuando con las células subyacentes. En el presente documento, los presentes inventores han demostrado que esta cepa de bacterias probióticas es capaz de reducir la muerte de células epiteliales, así como la respuesta de NF- κ B e IL-8 al patógeno, lo que limita la respuesta proinflamatoria iniciada por el sistema inmune innato. Además, actúa sobre el sistema inmunitario adaptativo modulando la respuesta de las células T, promoviendo la regulación y reduciendo la inflamación. La respuesta proinflamatoria a *E. coli* patógena se canceló esencialmente mediante la adición de *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856, devolviendo los niveles de los subconjuntos de células T variables a los observados en condiciones normales en el sistema *ex vivo* de los presentes inventores. Esto se enfatizó aún más por la capacidad de *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) para reducir la transcripción de ARNm que codifica TNF α en respuesta a ECIA. Como se mencionó anteriormente, ECIA se ha implicado en la patogénesis de la enfermedad de Crohn, por lo tanto, la capacidad de *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) para reducir la producción de TNF α , la principal citocina proinflamatoria presente en esta afección, es muy importante.

En conclusión, *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) es una cepa de bacterias probióticas sensibles al hierro con aplicaciones de largo alcance, capaz de reducir la salida de bacterias patógenas del lumen del intestino, mejorar la función de barrera y reducir la inflamación intestinal.

5 Por consiguiente, la presente descripción proporciona un *Streptococcus thermophilus* spp. que puede actuar localmente para reducir el nivel de inflamación crónica en el intestino.

Por lo tanto, la presente invención proporciona *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 para usar como medicamento para la reducción de la inflamación crónica en el intestino.

10 El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856 también puede aumentar la tasa de crecimiento en respuesta a la disponibilidad de hierro.

La invención se describirá ahora con referencia a y como se ilustra en los dibujos adjuntos, de los cuales:

15 La Figura 1 es una serie de gráficos que ilustran el efecto de los probióticos sobre la proliferación y muerte de las células epiteliales en respuesta a la *E. coli* patógena. a) Proliferación de células T84; b) proliferación de células Caco-2; c) muerte de las células T84; d) muerte de las células Caco-2. Los resultados se muestran a partir de 3 experimentos replicados y se expresan como la media $\pm$ M.E.E. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$;

20 La Figura 2 es una serie de gráficos que detallan aún más los resultados mostrados en la Figura 1 para las células Caco-2 que ilustran el cambio en la TEER en respuesta a *E. coli* y el efecto de los probióticos en esta respuesta. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$;

25 La Figura 3 es una serie de gráficos que detallan aún más los resultados mostrados en la Figura 1 para las células T84 que ilustran el cambio en la TEER en respuesta a *E. coli* y el efecto de los probióticos en esta respuesta. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$;

30 La Figura 4 es una serie de gráficos que ilustran el efecto de los probióticos sobre la respuesta de NF- κ B (a) e IL-8 (b) al patógeno. Los resultados se muestran a partir de 6 experimentos replicados y se expresan como la media $\pm$ M.E.E. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$;

35 La Figura 5 es una serie de gráficos que ilustran el cambio porcentual en los niveles de ARNm de citocinas inducidos por las células T en respuesta a *E. coli* con y sin probiótico. Los resultados se expresan como la media $\pm$ M.E.E. * $p \leq 0,05$;

40 La Figura 6 es una serie de gráficos que ilustran la translocación de bacterias a través de una monocapa de células epiteliales Caco-2 o T84. Los resultados se muestran a partir de 3 réplicas y se expresan como las medias. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ y *** $p \leq 0,001$;

La Figura 7 es una serie de fotografías que muestran la expresión de ocludina (originales de color rojo; gris claro en blanco y negro) en monocapas de células epiteliales (a). b) Proporción de píxeles positivos para la tinción de ocludina en relación con todo el campo de visión. Los resultados se expresan como la media $\pm$ M.E.E. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$;

45 La Figura 8 es una serie de gráficos que ilustran el cambio porcentual en la expresión del ARNm del factor de transcripción de T-box21 (Th1), RORC (Th17) y Foxp3 (Treg) en respuesta a *E. coli* y el efecto de los probióticos en su expresión. Los resultados se expresan como la media $\pm$ M.E.E. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$;

50 La Figura 9 es una serie de gráficos que ilustran el cambio porcentual en los niveles de ARNm de citocina inducidos por las células T en respuesta a *E. coli* con y sin probiótico. Los resultados se expresan como la media $\pm$ M.E.E. * $p \leq 0,05$ y ** $p \leq 0,01$;

55 La Figura 10 es una fotografía de un gel que muestra los fragmentos de ADN producidos después de la PCR de RAPD;

La Figura 11 muestra el listado de secuencias de los genes *sodA*, *dpr*, 16S y *rpoB* de *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856;

60 La Figura 12 muestra la alineación comparativa del gen *sodA* de las cepas bacterianas ácido lácticas LMG 18311, CNRZ1066, JIM 8232, VSL#3 y JMB010 (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856);

La Figura 13 muestra la alineación comparativa del gen *dpr* de las cepas bacterianas ácido lácticas LMG 18311, CNRZ1066, JIM 8232, VSL#3 y JMB010 (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856);

65 La Figura 14 muestra la alineación comparativa del gen 16S de las cepas bacterianas ácido lácticas LMG 18311, CNRZ1066, JIM 8232, VSL#3 y JMB010 (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856);

La Figura 15 muestra la alineación comparativa del gen *rpoB* de las cepas bacterianas ácido lácticas LMG 18311, CNRZ1066, JIM 8232, VSL#3 y JMB010 (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856);

La Figura 16 muestra los cambios básicos específicos entre las cepas bacterianas ácido lácticas LMG 18311, CNRZ1066, JIM 8232, VSL#3 y JMB010 (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856) en los genes *sodA*, *dpr*, *16S* y *rpoB* (linaje);

La Figura 17 es un gráfico que muestra las tasas de respuesta al de crecimiento de JMB010 (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856) y VSL#3 y BAA-250 en presencia de hierro, en las que la línea azul (*) define el nivel medio de hierro en las heces de las personas que no toman suplementos de hierro y la línea roja (**) definen el nivel medio de hierro en las heces de las personas que toman suplementos de hierro, y las líneas punteadas representan el nivel de hierro utilizado para fortificar el yogur en la descripción de Simova et al., (37), y

La Figura 18 es un gráfico que muestra la adherencia de las cepas bacterianas *S. thermophilus* JB010 (*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856), *S. thermophilus* JB021, *E. coli* K12, *E. coli* HM427 y *E. coli* HM615 a las células Caco 2.

Ejemplos

Las bacterias

Se usaron especies de bacterias ácido lácticas que se han empleado como probióticos. Estas fueron: *L. bulgaricus* JB005, *L. casei* JB006, *L. casei* JB008, *B. animalis* JB007 y *B. bifidum* JB009 (aisladas de yogur por los presentes inventores); *L. plantarum* JB011 y *L. helveticus* JB012 (aisladas por los presentes inventores a partir de cápsulas probióticas); y los aislados comensales *L. acidophilus* ASF360 y *L. salivarius* ASF361 (componentes de la flora Schaedler). Los inventores aislaron del yogur dos cepas de *S. thermophilus* (JB004 y JB010 [*Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856]). Se utilizaron dos cepas de ECIA: HM427 y HM615 (amablemente proporcionadas por el Dr. Barry Campbell y el profesor Jon Rhodes, de la Universidad de Liverpool), al igual que *E. coli* K12 y *E. coli* Nissle 1917 (aisladas de Mutaflor (Ardeypharm GmbH, Herdecke, Alemania). Todas las cepas de *E. coli* se cultivaron en volúmenes de 10 ml de caldo LB (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) a 37 °C durante la noche. *S. thermophilus* se cultivó en caldo M17 suplementado con lactosa (Oxoid) y *Lactobacillus* spp se cultivaron en caldo MRS (Oxoid) durante la noche en una atmósfera microaeróbica. Las bacterias ácido lácticas se cultivaron en medio de suero-SAPI con y sin (-)noradrenalina 100 µM (Sigma, Poole, Reino Unido) para determinar si eran capaces de responder a ella. Se tomaron medidas de DO a las 24, 48 y 72 horas para determinar el crecimiento bacteriano. Las diferencias se analizaron utilizando un ANOVA de medidas repetidas.

Identificación de *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856

El *Streptococcus thermophilus* spp. NCIMB 41856 se determinó que era diferente a la cepa conocida VSL#3 mediante el uso de análisis de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) en el que los cebadores M13 y MSP se usaron para amplificar aleatoriamente fragmentos de ADN de diversas cepas de *S. thermophilus*. El patrón de bandas único generado por *S. thermophilus* NCIMB 41856 demuestra las diferencias genéticas entre esta cepa y todas las demás cepas examinadas, incluida VSL#3 (véase la Figura 10).

RAPD

El análisis del ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) es una técnica utilizada para determinar las diferencias entre especies en los aislamientos de *S. thermophilus*. Dos conjuntos de cebadores descritos anteriormente, M13 (5'-gaggtggcggttct-3') y MSP (5'-gtaaaacgacggccagt-3') (36), se usaron colectivamente para producir fragmentos aleatorios que generan un patrón de huellas dactilares característico después de la electroforesis en gel. Se extrajo el ADN de los aislados de *S. thermophilus* resuspendiendo un pequeño barrido de colonias en 500 µl de agua libre de nucleasas y calentándolo a 100 °C durante 10 minutos. La PCR se realizó usando GoTaq Hot Start Polymerase (Promega), 0,2 µM de cada cebador y 5 µl de ADN en un volumen final de 25 µl por reacción. Las concentraciones de cloruro de magnesio se ajustaron a 7,2 mM en la reacción final mediante la adición de MgCl₂ 50 mM. Las incubaciones de las muestras se realizaron en un termociclador de efecto Peltier DNA de Engine DYAD (MJ Research) a 95 °C durante 2 minutos y luego 60 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 45 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 80 segundos, seguido de un período final de 4 minutos a 72 °C. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1,5 % para visualizar fragmentos de ADN. Los resultados se muestran en la Figura 10 en la que el control es el agua de la mezcla de PCR y contiene una banda amplificada del ADN residual de *E. coli* presente en la mezcla de PCR.

Proliferación y muerte de células epiteliales

El aumento de la renovación de las células epiteliales es una respuesta común a la infección, por lo tanto, se evaluó el efecto de *E. coli* patógena sobre la proliferación y muerte de líneas celulares epiteliales y el efecto de los probióticos

en esto. Todos los reactivos de cultivo celular se adquirieron a través de PAA Laboratories (Austria) a menos que se especifique lo contrario. Se cultivaron células T84 (una célula intestinal metastásica en el pulmón) y células de adenocarcinoma humano Caco-2 (colónicas) en DMEM/F-12 de Ham's o DMEM respectivamente, suplementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100U/ml de penicilina/estreptomicina en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a una densidad inicial de $2,4 \times 10^4$ células por pocillo. Después de 3 días de incubación, el medio se cambió por uno que no contenía antibióticos y las células se marcaron con BrdU para cuantificar la proliferación. Se agregaron bacterias a los cultivos de células epiteliales a una MOI de 30 y se incubaron durante 24 horas a 37 °C con 5 % de CO₂. Después de 24 horas, se recogieron los sobrenadantes para determinar los efectos citotóxicos de las bacterias utilizando el kit de ensayo de citotoxicidad no radiactivo Cytotox 96 (Promega, Southampton, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la incorporación de BrdU en las células se determinó usando el sistema ELISA de proliferación celular BioTrack (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las diferencias se analizaron mediante pruebas t pareadas (GraphPad Prism 5, California, EE. UU.).

Ensayos de NF-κB

El NF-κB se activa después de la señalización de TLR en las células epiteliales y desempeña un papel clave en la regulación de la respuesta inmune a la infección, en particular induciendo una respuesta proinflamatoria. Con el fin de determinar el efecto del patógeno y el probiótico en esta señal proinflamatoria, se midió la actividad de NF-κB mediante ensayos de luciferasa. Se sembraron células Caco-2 (células de adenocarcinoma de colon humano) en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos a una densidad inicial de 6×10^5 células por pocillo. Después de 2 días de cultivo, las células se transfectaron con un plásmido indicador que tenía un elemento de respuesta de NF-κB, pGL4.32 (Promega), y el indicador de control interno pGL4.74 (Promega) usando lipofectamina (Invitrogen, California, EE. UU.). Veinticuatro horas después, se reemplazó el medio con 1x HBSS (Invitrogen) y se agregaron bacterias a una MOI de 30. Después de 40 horas, se lisaron las células y se cuantificó la actividad de luciferasa usando un ensayo dual informador de luciferase (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las diferencias se analizaron mediante pruebas t pareadas (GraphPad Prism 5). Las células T84 no pudieron transfectarse eficazmente usando estos plásmidos informadores y, por lo tanto, no se muestran los resultados.

Detección de IL-8

La IL-8 es liberada por las células epiteliales después de la señalización de NF-κB y su liberación provoca el reclutamiento de células inflamatorias. Con el fin de determinar el efecto de posibles cepas probióticas en la producción de IL-8, se sembraron células T84 en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos a una densidad inicial de 6×10^5 células por pocillo. Después de 3 días de cultivo, el medio se reemplazó con medio libre de antibióticos y se agregaron bacterias a una MOI de 30. Después de 6 horas, se recogieron los sobrenadantes. La citotoxicidad se determinó como anteriormente y la producción de IL-8 se cuantificó por ELISA usando el DuoSet de IL-8/CXCL8 humana (R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La producción de IL-8 se corrigió por la muerte celular y se analizaron las diferencias mediante pruebas t pareadas (GraphPad Prism 5). Las células Caco-2 no produjeron niveles suficientes de IL-8 y, por lo tanto, no se muestran los resultados.

Crecimiento de monocapas de células epiteliales y desafío con bacterias

Para determinar si las cepas probióticas candidatas de los presentes inventores podrían cruzar la barrera epitelial y si tenían algún efecto sobre el paso de cepas patógenas de *E. coli*, se sembraron células Caco-2 y T84 sobre membranas Transwell de 12 mm (12 mm de diámetro, tamaño de poro de 3 μm; Corning Glass Works, Corning, NY) en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos a una densidad inicial de 3×10^5 células por inserto. Las placas se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 8-10 días hasta que las células formaron monocapas confluentes y la resistencia transepitelial (TEER) fue superior a 300 Ω/cm² medida con un voltímetro epitelial como indicador de permeabilidad de membrana. Luego, el medio se cambió a uno que no contenía antibióticos y se agregaron bacterias al pocillo apical del inserto Transwell a una MOI de 30. Se midió la TEER de todas las monocapas a intervalos de 2 horas hasta 12 horas y se analizaron las bacterias en el pocillo basal enumerado cada 2 horas hasta 10 horas. Las diferencias se evaluaron en cada punto de tiempo usando pruebas t pareadas (GraphPad Prism 5). En un experimento separado, se retiró el medio de las Transwell después de 10 horas y se examinaron las monocapas como se detalla a continuación.

Tinción de ocludina

La ocludina es un componente de casi todas las uniones celulares estrechas, por lo tanto, para determinar la descomposición de la unión estrecha, se fijaron los insertos Transwell en metanol enfriado con hielo a 4 °C durante la noche. Los insertos se lavaron en PBS y las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 % durante 10 minutos antes de volver a lavarlas. El anticuerpo monoclonal anti-occludina de ratón (Zymed, California, EE. UU.) se diluyó 1/200 y se añadió a la cámara apical del inserto y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos. Los insertos se lavaron luego en PBS y se incubaron durante 45 minutos más con anticuerpo anti-ratón de cabra específico del isotipo conjugado con TRITC (Southern Biotech, Birmingham, AL, EE. UU.) diluido 1/100 en la cámara apical. Luego se lavaron los insertos con PBS y se cortaron las membranas de los insertos con un bisturí y se montaron en portaobjetos con Vectashield que contenía DAPI (Vector Laboratories, California, EE. UU.). La tinción fluorescente se examinó en un microscopio Leica DMRA equipado con una cámara monocromática Hamamatsu Orca-ER. Se

digitalizaron diez campos de visión por portaobjetos con un aumento de 40x utilizando el software Leica Q-Fluoro. Las imágenes se observaron utilizando el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y los píxeles positivos se contaron automáticamente como se describió anteriormente (32). La importancia de las diferencias se determinó mediante ANOVA unidireccional (GraphPad Prism 5).

Aislamiento y cultivo de células T

Se aislaron leucocitos de la lámina propia del intestino para determinar el efecto de las cepas patógenas de *E. coli* y los posibles probióticos sobre la respuesta inmune adaptativa. Se recogió tejido intestinal resecado de pacientes sometidos a cirugía por complicaciones asociadas con la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa y de pacientes con cáncer colorrectal después del consentimiento informado y con la aprobación ética adecuada. La mucosa se separó del músculo, se cortó en pequeños fragmentos y se incubó en collagenasa (100 U/ml; Sigma) durante 2 horas a 37 °C. Las células se lavaron en PBS y los leucocitos se purificaron sobre gradientes discontinuos de Percoll (35-75 %; GE Healthcare). El recuento celular y la viabilidad se determinaron mediante exclusión con azul de tripano. Las células se resuspendieron a una concentración final de 5×10^6 /ml en RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 %, piruvato sódico 1 mM, L-glutamina 2 mM y 50 µg/ml de gentamicina y se cultivaron sobre un gel de colágeno tipo I (PureCol; Nutacon BV, Países Bajos). Se ha demostrado previamente que el cocultivo de células T de lámina propia con componentes de la ECM previene la apoptosis inducida por activación (33) y, en particular, la ligadura de integrinas β_1 (34); el colágeno tipo I se utiliza como material de soporte para permitir que los leucocitos sobrevivan y proliferen. Se agregaron sonificados de células bacterianas a cada pocillo a una concentración equivalente a una MOI de 30 y las células se cultivaron durante 5 días a 37 °C con 5 % de CO₂. Después de 5 días, los leucocitos se liberaron del gel de colágeno mediante la adición de collagenasa (1000 U/ml). Las células fueron lavadas y contadas antes de la extracción del ARN.

RT-qPCR

Se usó RT-qPCR para determinar la expresión relativa de ARNm en relación con las respuestas de Th1, Th2, Th17 y Treg y las citocinas asociadas. El ARN se extrajo de los leucocitos cultivados usando un kit de aislamiento de ARN II Macherey-Nagel NucleoSpin (ABgene, Epsom, Reino Unido). La síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando 500 ng de hexámeros aleatorios utilizando el sistema de transcripción inversa ImProm-II (Promega) en un volumen final de 20 µl. Todas las reacciones se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante produciendo una concentración final de cloruro de magnesio de 3 mM. Todos los ADNc se diluyeron hasta un volumen final de 100 µl (dilución 1/5) usando tensoactivo EB (Tris HCl 10 mM, pH 8,4; Qiagen Ltda, Crawley, Reino Unido). Los cebadores y las sondas se diseñaron usando Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) y M-Fold usando las secuencias específicas humanas del GenBank para T-box21 (número de acceso NM_013351), GATA-3 (número de acceso NM_001002295), RORC (número de acceso NM_005060), Foxp3 (número de acceso NM_017009), IFN γ (número de acceso NM_000619), TNF α (número de acceso NM_000594), IL-4 (número de acceso NM_000589), IL-4 δ 2 (número de acceso NM_172348), IL-17A (número de acceso NM_002190), IL-10 (número de acceso NM_000572) y TGF β (número de acceso NM_000660). El gen de mantenimiento de hidroximetilbilano sintasa (HMBS) se utilizó como control interno. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando HotStarTaq Master Mix (Qiagen Ltd.). La amplificación específica del gen se realizó usando 0,2 µM de cada cebador, 0,1 µM de sonda o SYBR Green 1 (1/100.000; Sigma) y 5 µl de ADNc diluido en un volumen final de 25 µl. Las concentraciones de cloruro de magnesio se ajustaron a 4,5 mM en la reacción final mediante la adición de MgCl₂ 50 mM. Las incubaciones de muestra se realizaron en un MxPro3005P (Stratagene, California, EE. UU.) a 95 °C durante 15 minutos y luego 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 30 segundos durante los cuales se recogieron los datos de fluorescencia. Los datos se expresan como el cambio relativo en la transcripción de ARNm después del tratamiento y se normalizaron para el número de células. No se observaron diferencias significativas entre las células aisladas de los tres estados de enfermedad y, por lo tanto, los resultados se agruparon para su análisis. Las diferencias se analizaron mediante pruebas t pareadas (GraphPad Prism 5).

Crecimiento de bacterias con noradrenalina

La noradrenalina puede eliminar el hierro de los quelantes y suministrarlo a las bacterias. Se cultivaron varios BAL con y sin noradrenalina para determinar si eran capaces de responder a ella o al hierro proporcionado por esta (Tabla 1). Si bien la adición de noradrenalina no tuvo efecto en la mayoría de las BAL estudiadas, dos cepas aumentaron significativamente su crecimiento en respuesta a ella: *L. acidophilus* ASF360 aumentó su crecimiento más de 7 veces a las 48 horas y *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) aumentó el crecimiento en todos los puntos de tiempo estudiados, con un aumento máximo de casi 5 veces a las 48 horas (Tabla 1). Estas dos cepas fueron elegidas para una mayor caracterización de su potencial probiótico, junto con *E. coli* Nissle 1917, que se ha utilizado para el tratamiento de la EII (7). * indica que la tasa de crecimiento de la cepa es significativamente mayor que el promedio de todas las cepas en ese momento.

Tabla 1: Respuesta de las bacterias ácido lácticas a la noradrenalina.

	24 Horas	48 Horas	72 Horas
<i>L. bulgaricus</i> JB005	1,227 ± 0,215	1,328 ± 0,279	1,266 ± 0,125
<i>L. casei</i> JB006	0,848 ± 0,144	1,191 ± 0,180	1,440 ± 0,017

<i>L. casei</i> JB008	1,140 ± 0,074	1,035 ± 0,125	1,357 ± 0,446
<i>L. acidophilus</i> ASF360	1,285 ± 0,179	7,725 ± 2,519 *	2,375 ± 0,937
<i>L. salivarius</i> ASF361	1,021 ± 0,128	0,865 ± 0,175	1,187 ± 0,173
<i>L. plantarum</i> JB012	1,014 ± 0,170	0,943 ± 0,115	1,112 ± 0,250
<i>L. helveticus</i> JB011	0,999 ± 0,114	1,003 ± 0,097	1,004 ± 0,214
<i>B. animalis</i> JB007	0,998 ± 0,313	1,246 ± 0,398	1,037 ± 0,326
<i>B. bifidum</i> JB009	1,175 ± 0,134	1,209 ± 0,172	1,190 ± 0,169
<i>S. thermophilus</i> JB004	0,986 ± 0,296	1,374 ± 0,109	1,576 ± 0,439
<i>S. thermophilus</i> NCIMB 41856	1,700 ± 0,242 *	4,798 ± 0,868 *	3,869 ± 1,954 *

Proliferación y muerte de células epiteliales

Las células de adenocarcinoma T84 y Caco-2 se incubaron con los probióticos potenciales *L. acidophilus* ASF360, *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) y *E. coli* Nissle 1917 para determinar su efecto sobre la respuesta celular proliferativa o apoptótica a cepas de *E. coli* patógenas, K12 y la cepa ECIA HM615 asociada a la enfermedad de Crohn (35). Todas las cepas de *E. coli*, incluida *E. coli* Nissle 1917, redujeron la proliferación de células epiteliales T84: *E. coli* K12 redujo la proliferación en un 78 % en comparación con las células no tratadas ($p = 0,002$); ECIA HM615 redujo la proliferación en un 80 % ($p = 0,0001$); y *E. coli* Nissle 1917 en un 82 % ($p = 0,001$) (Figura 1A). Se observó una reducción similar en la proliferación de células Caco-2 después del tratamiento con *E. coli*: *E. coli* K12 indujo una reducción del 77 % en comparación con las células no tratadas ($p = 0,003$); ECIA HM615 indujo una reducción del 76 % ($p = 0,003$); y *E. coli* Nissle 1917 en un 78 % ($p = 0,004$) (Figura 1C). Simultáneamente, la muerte celular aumentó tanto en las células T84 como en las células Caco-2; *E. coli* K12 indujo un aumento del 254 % en la muerte celular en células Caco-2 ($p = 0,0005$); ECIA HM615 indujo un aumento del 498 % en la muerte en células T84 ($p = 0,0003$) y un aumento del 254 % en la muerte de las células Caco-2 ($p = 0,001$); *E. coli* Nissle 1917 indujo un aumento del 498 % en la muerte de células T84 ($p < 0,0001$) y un aumento del 218 % en la muerte de células Caco-2 ($p = 0,001$) (Figura 1D). *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo la proliferación de células Caco-2 tratadas con *E. coli* K12 o ECIA HM615 en un 35 % ($p = 0,003$) y 31 % ($p = 0,05$), respectivamente; mientras que *E. coli* Nissle 1917 redujo la proliferación inducida por *E. coli* K12 en un 32 % ($p = 0,007$) y un 37 % en respuesta al tratamiento con ECIA HM615 ($p = 0,03$) (Figura 1B). Además, *L. acidophilus* ASF360 redujo aún más la proliferación de células Caco-2 tratadas con ECIA HM615 en un 22 % ($p = 0,02$) (Figura 1B). *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo la proliferación de células T84 tratadas con ECIA HM615 y *E. coli* Nissle 1917 en un 33 % ($p = 0,03$) y 48 % ($p = 0,03$), respectivamente (Figura 1A). Es importante destacar que las tres cepas probióticas redujeron la muerte de las células Caco-2 después del desafío con *E. coli* K12 y HM615: *L. acidophilus* ASF360 redujo la muerte de las células epiteliales en un 14 % ($p = 0,04$) después del tratamiento con *E. coli* K12 y 16 % después de la infección con ECIA HM615 ($p = 0,03$); *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo la muerte de las células epiteliales después del tratamiento con *E. coli* K12 y ECIA HM615 en un 10 % ($p = 0,01$) y 18 % ($p = 0,007$), respectivamente; *E. coli* Nissle 1917 redujo la muerte de las células epiteliales después del tratamiento con *E. coli* K12 en un 26 % ($p = 0,006$) y 27 % ($p = 0,003$), respectivamente (Figura 1D). Además, *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) pudo reducir la proliferación y muerte celular de las células Caco-2 no tratadas en un 24 % ($p = 0,008$) y 22 % ($p = 0,02$) respectivamente (Figura 1B y D).

Inducción de NF- κ B e IL-8

Las monocapas de células Caco-2 y T84 se trataron con las tres cepas bacterianas probióticas potenciales en combinación con cepas patógenas de *E. coli* para determinar el efecto de los probióticos en cualquiera de estos eventos de señalización proinflamatoria. La señalización de NF- κ B en las células Caco-2 se incrementó en un 491 % ($p = 0,002$) en comparación con los controles después de la infección con *E. coli* K12 y en un 247 % ($p = 0,002$) después del tratamiento con ECIA HM427. Sin embargo, esta inducción se redujo mediante la adición de las tres cepas probióticas: *L. acidophilus* ASF360 redujo la respuesta de NF- κ B a *E. coli* K12 en un 50 % ($p = 0,006$) y ECIA HM427 en un 28 % ($p = 0,007$); *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo la respuesta de NF- κ B a *E. coli* K12 en un 58 % ($p = 0,002$) y ECIA HM427 en un 49 % ($p = 0,005$); y *E. coli* Nissle 1917 redujo la respuesta de NF- κ B a *E. coli* K12 en un 79 % ($p = 0,0005$) y ECIA HM427 en un 68 % ($p = 0,004$) (Figura 4A). *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) también redujo la señalización de NF- κ B en un 48 % en las células no tratadas ($p = 0,003$) (Figura 4A). Después de la señalización de NF- κ B, la producción de IL-8 aumentó en un 1566 % en respuesta a *E. coli* K12 ($p = 0,001$), 1104 % en respuesta a ECIA HM427 ($p = 0,004$) y 363 % en respuesta a HM615 ($p = 0,02$), así como un aumento de 1498 % después de la adición de *E. coli* Nissle 1917 ($p = 0,004$). La respuesta de IL-8 a *E. coli* K12 se redujo en un 22 % después de la adición de *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) ($p = 0,02$) y la respuesta a ECIA HM427 se redujo tanto por *L. acidophilus* ASF360 como por *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) en 17 % ($p = 0,02$) y 39 % ($p = 0,02$) respectivamente (Figura 4B).

Mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial

Para determinar el efecto de nuestras cepas probióticas sobre la integridad de la barrera epitelial, se cultivaron células Caco-2 y T84 en un sistema Transwell y se expusieron a *E. coli* K12 o ECIA HM615 en combinación con cada uno de los probióticos potenciales; se midieron TEER y la translocación bacteriana. Tanto las células Caco-2 como T84 formaron monocapas estables después de 8-10 días. Ni *L. acidophilus* ASF360 ni *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) tuvieron ningún efecto en la TEER sola. Sin embargo, *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) bloqueó el paso

de *E. coli* K12 a través de la monocapa, un fenómeno no visto con *L. acidophilus* ASF360 que mejoró el paso de *E. coli* K12 a través de la barrera (Figura 6). Además, *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo la respuesta a *E. coli* K12, al aumentar la TEER, de una manera que *L. acidophilus* ASF360 no lo hizo; cuando *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) y *E. coli* K12 se agregaron a la monocapa simultáneamente, se observó un aumento de la TEER (alcanzando un máximo de 33 % en células Caco-2 a las 6 horas y 30 % en células T84 a las 10 horas en comparación a las células estimuladas con K12), mientras que *L. acidophilus* ASF360 y *E. coli* K12 juntas causaron una disminución en la TEER (alcanzando un máximo del 56 % en las células Caco-2 a las 8 horas y el 11 % en las células T84 a las 6 horas en comparación con las células estimuladas con K12) (Figuras 2 y 3). Mientras que ECIA HM615 solo migró lentamente a través de la monocapa, tanto *L. acidophilus* ASF360 como *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) parecían interactuar con esta cepa y facilitar su migración a través de la monocapa epitelial. En esta situación, la translocación de *L. acidophilus* ASF360 y *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) se incrementó hasta que estas cepas probióticas estuvieron presentes en cantidades iguales a la cepa patógena (Figura 6). La cepa de *E. coli* potencialmente probiótica Nissle 1917, de manera similar a *L. acidophilus* ASF360 y *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856), no tuvo efecto en la TEER (Figuras 2 y 3) pero fue capaz de translocar rápidamente sin la necesidad de interactuar con cepas patógenas de *E. coli* (Figura 6).

Mantenimiento de uniones celulares estrechas

Las células Caco-2 y T84 se cultivaron en un sistema Transwell y se infectaron con ECIA HM615; se añadió *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) para determinar su efecto sobre la proteína ocludina de unión celular estrecha. ECIA HM615 causó la descomposición de las uniones celulares estrechas en las monocapas de Caco-2 y T84, ilustrada por la disminución de ocludina (61 % y 56 % respectivamente) (Figura 7). ECIA HM615 también causó una disminución del 24 % en la tinción nuclear de las células T84 (datos no mostrados), lo que indica que estaba induciendo la muerte celular. La adición de *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) a las monocapas junto con ECIA HM615 evitó la descomposición de la unión celular estrecha inducida por ECIA y la muerte celular; los niveles de tinción nuclear y ocludina no cambiaron de las monocapas de control (Figura 7).

Sesgo de las respuestas de las células T efectoras

Los leucocitos se aislaron de la lámina propia intestinal y se desafiaron con antígenos bacterianos de *E. coli* K12 y ECIA HM615 para determinar el efecto de los antígenos probióticos competidores de *L. acidophilus* ASF360, *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) y *E. coli* Nissle 1917. Tanto *E. coli* K12 como ECIA HM615 indujeron una respuesta de Th1, indicada por la sobreexpresión del ARNm que codifica el factor de transcripción específico de Th1 T-box21 en la población de leucocitos cultivados (16 % ($p = 0,003$) y 13 % ($p = 0,007$) respectivamente); esto se redujo significativamente mediante la adición de *L. acidophilus* ASF360 o *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856). *L. acidophilus* ASF360 redujo la respuesta a *E. coli* K12 y ECIA HM615 en un 13 % ($p = 0,003$) y 11 % ($p = 0,02$), respectivamente. *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo la respuesta de Th1 a *E. coli* K12 y ECIA HM615 en un 10 % ($p = 0,03$) y 13 % ($p = 0,04$), respectivamente. *E. coli* Nissle 1917 también disminuyó la respuesta de Th1 a ECIA HM615 en un 21 % ($p = 0,009$). Además, *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo el nivel basal de transcripción de T-box21 en células no tratadas en un 6 % ($p = 0,03$). Ninguna de las cepas de *E. coli* indujo una respuesta significativa de Th2, pero el factor de transcripción específico de Th17, RORC, también se incrementó después del tratamiento con los antígenos de *E. coli* K12 o ECIA HM615 (9 % y 13 % ($p = 0,02$), respectivamente). La respuesta de Th17 a *E. coli* K12 se redujo en un 12 % después de la adición de antígenos de *L. acidophilus* ASF360 ($p = 0,009$) y la respuesta a ECIA HM615 se redujo mediante la adición de cualquiera de las tres cepas probióticas potenciales: *L. acidophilus* ASF360 redujo la respuesta en un 18 % ($p = 0,0002$), *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) en un 15 % ($p = 0,003$) y *E. coli* Nissle 1917 en un 26 % ($p = 0,003$). Además, tanto *L. acidophilus* ASF360 como *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) fueron capaces de reducir el nivel basal de transcripción de RORC en células no tratadas en un 10 % ($p = 0,003$ y $p = 0,04$, respectivamente). ECIA HM615 también indujo una fuerte respuesta de Treg, mostrada por la sobreexpresión de Foxp3 en un 30 % ($p = 0,0009$) en leucocitos cultivados. Sin embargo, esto se redujo mediante la adición de cualquiera de las tres cepas probióticas potenciales: *L. acidophilus* ASF360 causó una reducción del 18 % en la expresión de Foxp3 ($p = 0,02$), *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) una reducción del 21 % ($p = 0,03$) y *E. coli* Nissle 1917 una reducción del 27 % ($p = 0,02$) (Figura 8).

Producción de citocinas de células T

De acuerdo con los datos del factor de transcripción descritos previamente, tanto *E. coli* K12 como ECIA HM615 indujeron la sobreexpresión del ARNm de TNF α en poblaciones de leucocitos cultivados (9 % y 12 % respectivamente), lo que indica una respuesta de Th1. A pesar de esto, ni *E. coli* K12 ni ECIA HM615 indujeron una respuesta significativa de IFN γ , aunque la producción de ARNm de IFN γ aumentó en un 15 % cuando *E. coli* K12 y Nissle 1917 se usaron en combinación ($p = 0,04$) y disminuyeron en un 16 % después del tratamiento con *L. acidophilus* ASF360 ($p = 0,01$) o en un 10 % después del tratamiento con *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) ($p = 0,02$) solo. La respuesta de TNF α a *E. coli* K12 se redujo en un 16 % mediante la adición de *L. acidophilus* ASF360 ($p = 0,03$) mientras que *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) redujo el nivel de ARNm de TNF α producido en respuesta a ECIA HM615 en 20 % ($p = 0,03$) (Figura 9). Como se esperaba, no hubo cambios significativos en la producción de la citocina IL-4 relacionada con Th2. Aunque no fue significativo, ambas cepas de *E. coli* parecieron aumentar la expresión del ARNm de IL-4 δ 2, el antagonista natural de IL-4, lo que indica un sesgo hacia una respuesta de Th1. Sin embargo, se

observó evidencia de una respuesta de Th17 en el aumento de la expresión del ARNm de IL-17 en un 45 % ($p = 0,04$) después del tratamiento con antígenos derivados de ECIA HM615; esto pareció reducirse mediante la adición de cualquiera de las tres cepas probióticas, aunque esto no fue estadísticamente significativo. No se observaron cambios significativos en la expresión del ARNm de IL-10, aunque *E. coli* Nissle 1917 redujo la expresión de IL-10 en un 29 % cuando se cultivó en combinación con ECIA HM615; sin embargo, HM615 no indujo la expresión de IL-10 (Figura 5). La transcripción de TGF β aumentó significativamente por los leucocitos de la lámina propia en un 14 % en respuesta a *E. coli* K12 ($p = 0,01$) y en un 11 % en respuesta al tratamiento con ECIA HM615 ($p = 0,009$). *L. acidophilus* ASF360 y *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) pudieron reducir la inducción de ARNm de TGF β por *E. coli* K12 en 12 % ($p = 0,01$) y 9 % ($p = 0,006$) a niveles comparables a aquellos de las células de control. De manera similar, *L. acidophilus* ASF360 y *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) también redujeron la respuesta de TGF β a ECIA HM615 en un 12 % ($p = 0,04$) y 10 % ($p = 0,009$) respectivamente. *E. coli* Nissle 1917 también fue capaz de reducir la expresión de ARNm de TGF β inducida por ECIA HM615 en un 23 % ($p = 0,01$) (Figura 9).

Adherencia a las células

En general, se considera que los organismos probióticos tienen buena adherencia a las células intestinales de la misma manera que los organismos intestinales comensales y posiblemente incluso imitan la adherencia de cepas invasoras de bacterias entéricas. A este respecto, los presentes inventores probaron la adherencia de *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856), *S. thermophilus* JB021, *E. coli* K12, *E. coli* HM427 y *E. coli* HM615 a las células Caco-2.

Se cultivaron células de adenocarcinoma humano Caco-2 en DMEM suplementado con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina en placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos a una densidad inicial de 3×10^5 células/pocillo. Después de 3 días de cultivo, el medio se reemplazó con DMEM libre de antibióticos y se agregaron cepas de *S. thermophilus* o *E. coli* a una MOI de 30. Las placas se prepararon por duplicado (cada una contenía 3 pocillos/tratamiento replicados) y después de 4 horas de incubación a 37 °C con 5 % de CO₂, se lisó un conjunto de células con PBS que contenía Triton X-100 al 1 % y se contó el número de bacterias vivas utilizando el procedimiento de Miles y Misra para obtener el número total de bacterias. Para obtener el número de bacterias que habían invadido las células epiteliales, el segundo conjunto de células se trató con PBS que contenía 100 µg/ml de gentamicina durante 2 horas a temperatura ambiente antes de ser lisadas y contadas las bacterias. El número de bacterias adherentes se calculó restando el número de bacterias invasivas del número total de bacterias. Los resultados se muestran en la Figura 18. De los resultados se puede ver que las cepas invasivas adherentes de *E. coli* tales como *E. coli* HM427 y *E. coli* HM615 mostraron un nivel de adherencia significativamente mayor que cualquiera de las cepas de *S. thermophilus* y que, sorprendentemente, la *S. thermophilus* JB010 (NCIMB 41856) mostró la peor adherencia de todas las cepas probadas, lo que demuestra que normalmente no se consideraría una cepa probiótica útil.

Referencias

1. E. Metchnikoff, P. C. Mitchell, The prolongation of life; optimistic studies. (W. Heinemann; G.P. Putnam's Sons, Londres, Nueva York, 1907).
2. 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 (Octubre 2001).
3. H. Szajewska, A. Skorka, M. Ruszczynski, D. Gieruszczak-Bialek, Aliment Pharmacol Ther 25, 871 (Abril 15, 2007).
4. L. V. McFarland, Travel Med Infect Dis 5, 97 (Marzo, 2007).
5. M. Hickson et al., BMJ 335, 80 (Julio 14, 2007).
6. D. Haller et al., J Nutr 140, 690S (Marzo, 2010).
7. B. J. Rembacken, A. M. Snelling, P. M. Hawkey, D. M. Chalmers, A. T. Axon, Lancet 354, 635 (Agosto 21, 1999).
8. A. Venturi et al., Aliment Pharmacol Ther 13, 1103 (Agosto, 1999).
9. A. Tursi et al., Med Sci Monit 10, PI126 (Noviembre, 2004).
10. R. Bibiloni et al., Am J Gastroenterol 100, 1539 (Julio, 2005).
11. G. Pineton de Chambrun, J. F. Colombel, D. Poulain, A. Darfeuille-Michaud, CURR. OPIN. GASTROENTEROL. 24, 440 (Julio, 2008).
12. A. Pandey, F. Bringel, J. M. Meyer, Appl Microbiol Biot 40, 735 (Enero, 1994).
13. B. Bruyneel, M. Vandewoestyne, W. Verstraete, Biotechnol Lett 11, 401 (Junio, 1989).
14. M. Imbert, R. Blondeau, Curr Microbiol 37, 64 (Julio, 1998).
15. F. Archibald, Crit Rev Microbiol 13, 63 (1986).
16. K. G. Wooldridge, P. H. Williams, FEMS Microbiol Rev 12, 325 (Noviembre, 1993).
17. P. P. Freestone, R. D. Haigh, P. H. Williams, M. Lyte, FEMS Microbiol Lett 172, 53 (Marzo 1, 1999).
18. S. M. Sandrini et al., J Bacteriol 192, 587 (Enero, 2010).
19. M. Hoffmann et al., J Nutr 138, 1684 (Septiembre, 2008).
20. P. van Baaren et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 2371 (Febrero 17, 2009).
21. U. P. Singh, C. Venkataraman, R. Singh, J. W. Lillard, Jr., Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 7, 111 (Junio, 2007).
22. H. Sokol et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 16731 (Octubre 28, 2008).

23. M. Roselli et al., *Inflamm Bowel Dis* 15, 1526 (Octubre, 2009).
24. H. K. Kwon et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 2159 (Febrero 2, 2010).
25. P. P. Freestone et al., *Shock* 18, 465 (Noviembre, 2002).
- 5 26. M. Hafez, K. Hayes, M. Goldrick, R. K. Grencis, I. S. Roberts, *Infect Immun* 78, 2153 (Mayo, 2010).
27. C. Pagnini et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 454 (Enero 5, 2010).
28. K. Gronbach et al., *Infect Immun* 78, 3036 (Julio, 2010).
29. K. C. Anukam, E. O. Osazuwa, H. B. Osadolor, A. W. Bruce, G. Reid, *Journal of Clinical Gastroenterology* 42, 239 (Marzo, 2008).
- 10 30. J. P. Furet, P. Quenee, P. Tailliez, *Int J Food Microbiol* 97, 197 (Diciembre 15, 2004).
31. C. Rodriguez, M. Medici, F. Mozzi, G. Font de Valdez, *World J Gastroenterol* 16, 1622 (Abril 7, 2010).
32. C. F. Inman et al., *J Immunol Methods* 302, 156 (Julio, 2005).
33. A. Sturm, K. A. Krivacic, C. Focchi, A. D. Levine, *J Immunol* 173, 3889 (Septiembre 15, 2004).
34. A. Stallmach et al., *Eur J Immunol* 31, 1228 (Abril, 2001).
- 15 35. S. Subramanian et al., *Inflamm Bowel Dis* 14, 162 (Febrero, 2008).
36. S. G. Botina, O. V. Piksasova, Yu. D. Tsygankov, y V. V. Sukhodolets, *Russian Journal of Genetics* 43, 485 (2007).
37. E. Simova et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 (2008) páginas 1109-1115.
38. S. Sieuwerts et al., *Appl. Env. Microbiol.* 76 (2010) 7775-7784.
39. L. Herve-Jimenez et al., *Appl. Env. Microbiol.* 75 (2009) 2062-2073.

20

Listado de secuencias

<110> The University of Bristol

25

<120 Composición Probiótica

<130> JMH/5330PCT00

<140> GB 1112487.2

30

<141> 2011-07-21

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

35

<210> 1

<211> 570

<212> ADN

<213> *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856

40

<220>

<221> sodA

<222> (1)..(570)

<223> gen sodA de *S. thermophilus* NCIMB 41856

45

<400> 1

```

atggttaagat ggaaaaaaat gaaaagagga cctttactat ggctattatt cttccagatc      60
ttccttacgc ttacgatgct ttggaaccat acattgatgc tgaaacaatg actcttcac      120
atgacaaaaca ccatgcaact tacgtggcga atgctaatagc tgcgcttgaa aaacaccctg      180
aaattggtga ggaccttgaa gcgcttttgg ctgatgtaga aaaaattcca gcagacatcc      240
gtcaagcact tattaacaat ggtggtggac atcttaacca cgcacttttc tgggaacttt      300
tgtcaccaga aaaacaagaa ccaactgcag aagtagcagc tgctattaac gaagcattcg      360
gttcatttga agctttccaa gaagttttca ctacggcagc gacaactcgt tttggttcag      420
ggtgggcatg gcttgtggtt aacgcagaag gtaaacttga agttgtttca actcccaacc      480
aagatacacc tatctcagac ggtaaaaaac caatcttggc acttgatggt tgggaacatg      540
cttactacct aaaataccgt aacgtacgtc      570

```

5 <210> 2
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856

10 <220>
 <221> dpr
 <222> (1)..(426)
 <223> gen dpr de *S. thermophilus* NCIMB 41856

15 <400> 2

```

gacaccaaca aacacaaaaa ccaaagcagt attaaatcaa gcggttgccg atttgtctgt      60
agcagcttct attgtgcac aagttcattg gtatatgogt ggtcctgggt tcctttatct      120
tcacccaaaa atggatgaat taatggatag tttgaattcc tatcttgata agattagtga      180
gcgtttgatt accattggtg gtgaacccta ctcaactttg gtagagtttt catctaattc      240
aggtttgact gaaactactg gtacatttga tcaaccaatg tctgatcgaa ttcagctatt      300
ggttgatata tacaataact tgtctgtctt gttccaagtt ggcttggata ttacagatga      360
agaaggagat gttccttcaa atgatatctt tacggatgca aaatcagaaa ttgataagac      420
gatctg      426

```

20 <210> 3
 <211> 1536
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856

25 <220>
 <221> 16S
 <222> (1)..(1536)
 <223> gen 16S de *S. thermophilus* NCIMB 41856

30 <400> 3

ES 2 796 834 T3

```

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtagaac      60
gctgaagaga ggagcttgct cttcttggat gagttgcgaa cgggtgagta acgcgtaggt      120
aacctgcctt gtagcggggg ataactattg gaaacgatat ctaataccgc ataacaatgg      180
atgacacatg tcattttatt gaaaggggca attgctccac tacaagatgg acctgcgttg      240
tattagctag taggtgaggt aatggctcac ctaggcgacg atacatagcc gacctgagag      300
ggatgatcggc cacactggga ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg      360
gaatcttcgg caatgggggc aaccctgacc gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggtttt      420
cggatcgtaa agctctgttg taagtcaaga acgggtgtga gagtggaaag ttcacactgt      480
gacggtagct taccagaaag ggacggctaa ctacgtgcc a gcagccgagg taatacgtag      540
gtcccgagcg ttgtccggat ttattgggag taaagcgagc gcaggcgggt tgataagtct      600
gaagttaaag gctgtggctc aaccatagtt cgctttggaa actgtcaaac ttgagtgcag      660
aaggggagag tggaattcca tgtgtagcgg tgaaatgcgt agatatatgg aggaacaccg      720
gtggcgaaag cggctctctg gtctgtaact gacgctgagg ctcgaaagcg tggggagcga      780
acaggattag ataccctggt agtccacgcc gtaaacgatg agtgctaggt gttggatcct      840
ttccgggatt cagtgccgca gtaacgcat taagcactcc gcctggggag tacgaccgca      900
aggttgaaac tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat      960
tcgaagcaac gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatccc gatgctatct ctagagatag     1020
aaagttactt cggtagatcg gtgacagggt gtgcatgggt gtcgtcagct cgtgtcgtga     1080
gatgttgggt taagtcccg cagcagcgca acccctattg ttagttgcca tcattcagtt     1140
gggcactcta gcgagactgc cggttaataaa ccggaggaag gtggggatga cgtcaaataca     1200
tcatgccctt tatgacctgg gctacacacg tgctacaatg gttggtacaa cgagttgcga     1260
gtcgggtgacg gcgagctaat ctcttaaagc caatctcagt tcggattgta ggctgcaact     1320
cgcctacatg aagtcggaat cgctagtaat cgcggatcag cagccgagg tgaatacgtt     1380
cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cagcagaggt tgtaacaccc gaagtcgggtg     1440
aggtaacctt ttggagccag ccgcctaagg tgggacagat gattgggggt aagtcgtaac     1500
aaggtagccg tatcggaagg tgcggctgga tcacct                                     1536

```

5

<210> 4
 <211> 868
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856

10

<220>
 <221> rpo
 <222> (1)..(868)
 <223> gen rpo de *S. thermophilus* NCIMB 41856

15

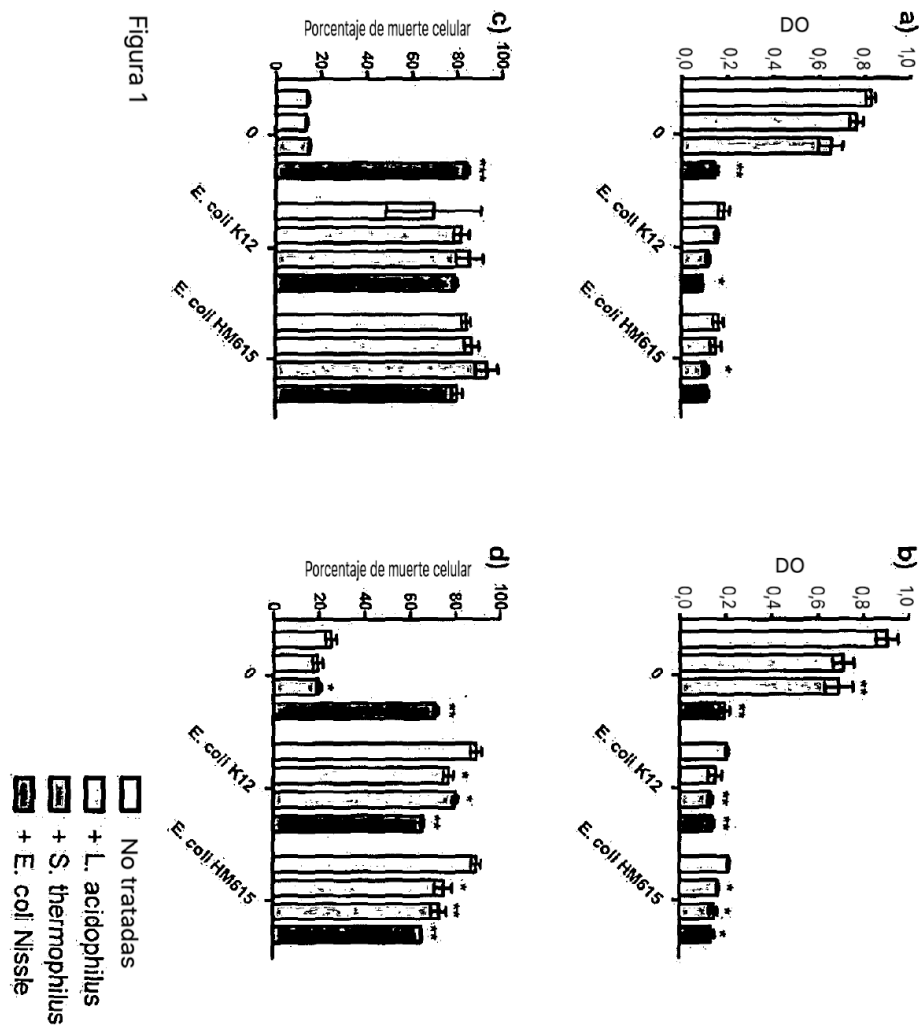
<400> 4

ES 2 796 834 T3

cctaaggggtg aaaaagacct ttctgctgaa gaacgtcttc tccatgctat ctttggtgat	60
aaatctcgtg aagtacgtga tacatcactc cgtgtacctc atgggtggtga tgggtgctggt	120
cgtgatgtta aaatctttac acgtgcaaac ggtgatgaat tgcaatcagg tgttaacatg	180
cttgttcgtg ttacatcgc tcaaaaacgt aaaatcaagg tcggagataa gatggctggt	240
cgtcacggta acaaaggggt tgtttctcgt attgttcctg ttgaagacat gccttacctt	300
ccagacggta caccagttga catcatgttg aaccctcttg gggtgccatc acgtatgaac	360
attggtcagg ttatggaact tcaccttgggt atggctgctc gtaacttggg tatctacatc	420
gcaacaccag tcttcctaag ggtgaaaaag acctttctgc tgaagaacgt cttctccatg	480
ctatctttgg tgataaatct cgtgaagtac gtgatacatc actccgtgta cctcatggtg	540
gtgatgggtg cgttcgtgat gttaaaatct ttacacgtgc aaacgggtgat gaattgcaat	600
cagggtgtta catgcttggt cgtgtttaca tcgctcaaaa acgtaaaatc aaggctcgag	660
ataagatggc tggtcgtcac ggtaacaaag gggttgtttc tcgtattggt cctgttgaag	720
acatgcctta ccttcagac ggtacaccag ttgacatcat gttgaaccct cttgggggtgc	780
catcacgtat gaacattggt caggttatgg aacttcacct tggatatggct gctcgtaact	840
tgggtatcta catcgcaaca ccagtctt	868

REIVINDICACIONES

1. El *Streptococcus thermophilus* NCIMB 41856.
- 5 2. Un *Streptococcus thermophilus* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el *Streptococcus thermophilus* se proporciona en forma de polvo, cápsula o comprimido.
3. Una composición que comprende un *Streptococcus thermophilus* de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición es adecuada para usar como alimento, suplemento alimenticio, producto lácteo, producto lácteo fermentado, yogur, un producto alimenticio de formulación no láctea, y puede además comprender saborizantes u
10 otros ingredientes alimentarios convencionales para mejorar el sabor, la palatabilidad u otras propiedades organolépticas de la composición.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el *Streptococcus thermophilus* es el único ingrediente
15 probiótico.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el *Streptococcus thermophilus* es el principal probiótico.
- 20 6. El *Streptococcus thermophilus* de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como un medicamento para la reducción de la inflamación crónica en el intestino.
7. Una composición que comprende un *Streptococcus thermophilus* de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de una enfermedad intestinal.
25
8. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la enfermedad intestinal está asociada con inflamación y el *Streptococcus thermophilus* puede actuar localmente para reducir el nivel de inflamación.
9. Composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 en la que la inflamación es crónica.
30
10. El *Streptococcus thermophilus* de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de enfermedades intestinales, enfermedades intestinales asociadas con un aumento en la disponibilidad de hierro en el intestino, o enfermedades intestinales en las que el aumento en la biodisponibilidad del hierro se debe al sangrado intestinal, a estrés, a la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, enfermedad celíaca, gastroenteritis, pancreatitis u otra enfermedad intestinal crónica o enfermedades intestinales tales como úlcera, infección, infestación de parásitos, infestación de protozoos, infección por *Helicobacter*, lesiones, traumatismos, estrés o cirugía.
35



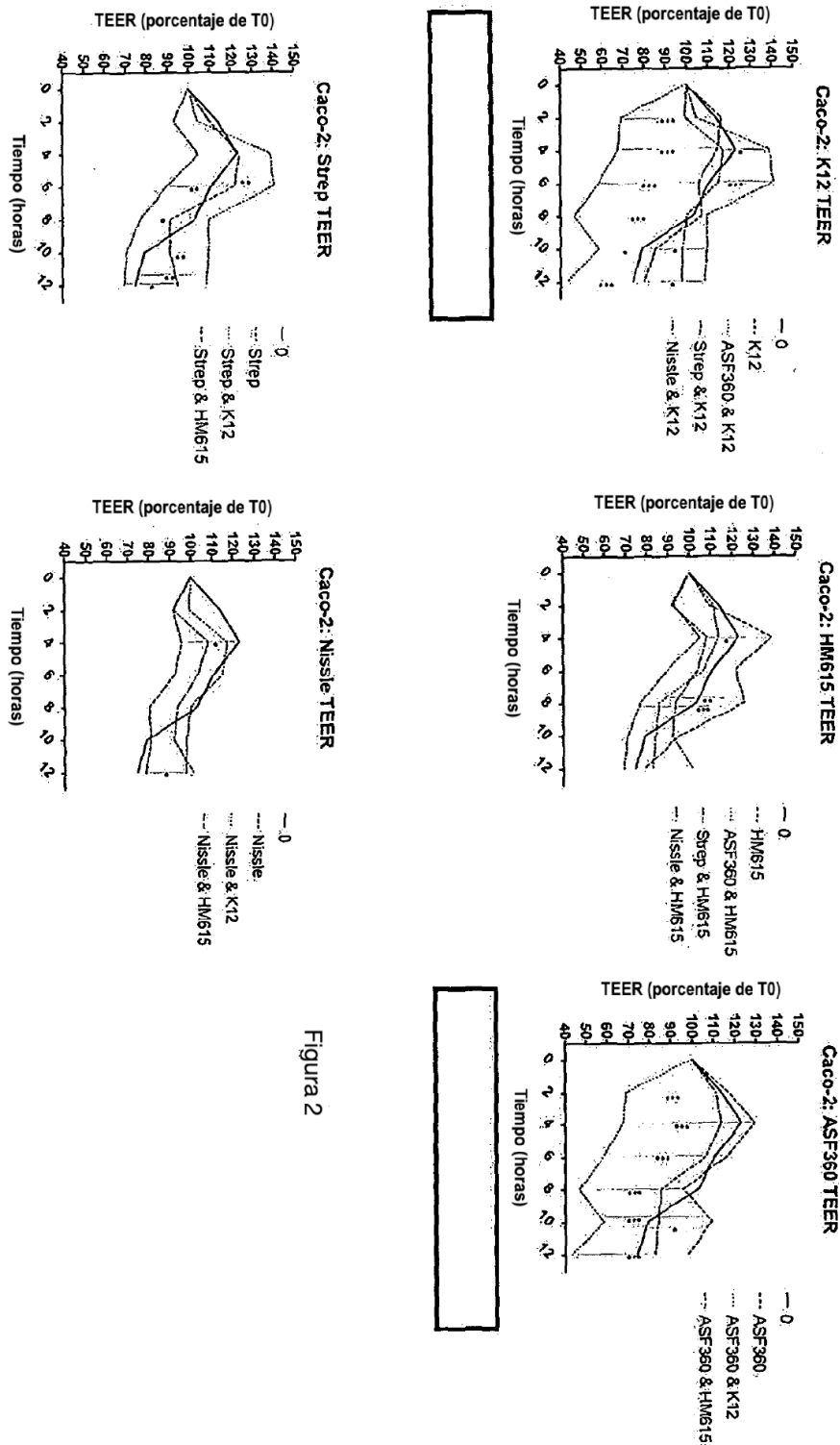


Figura 2

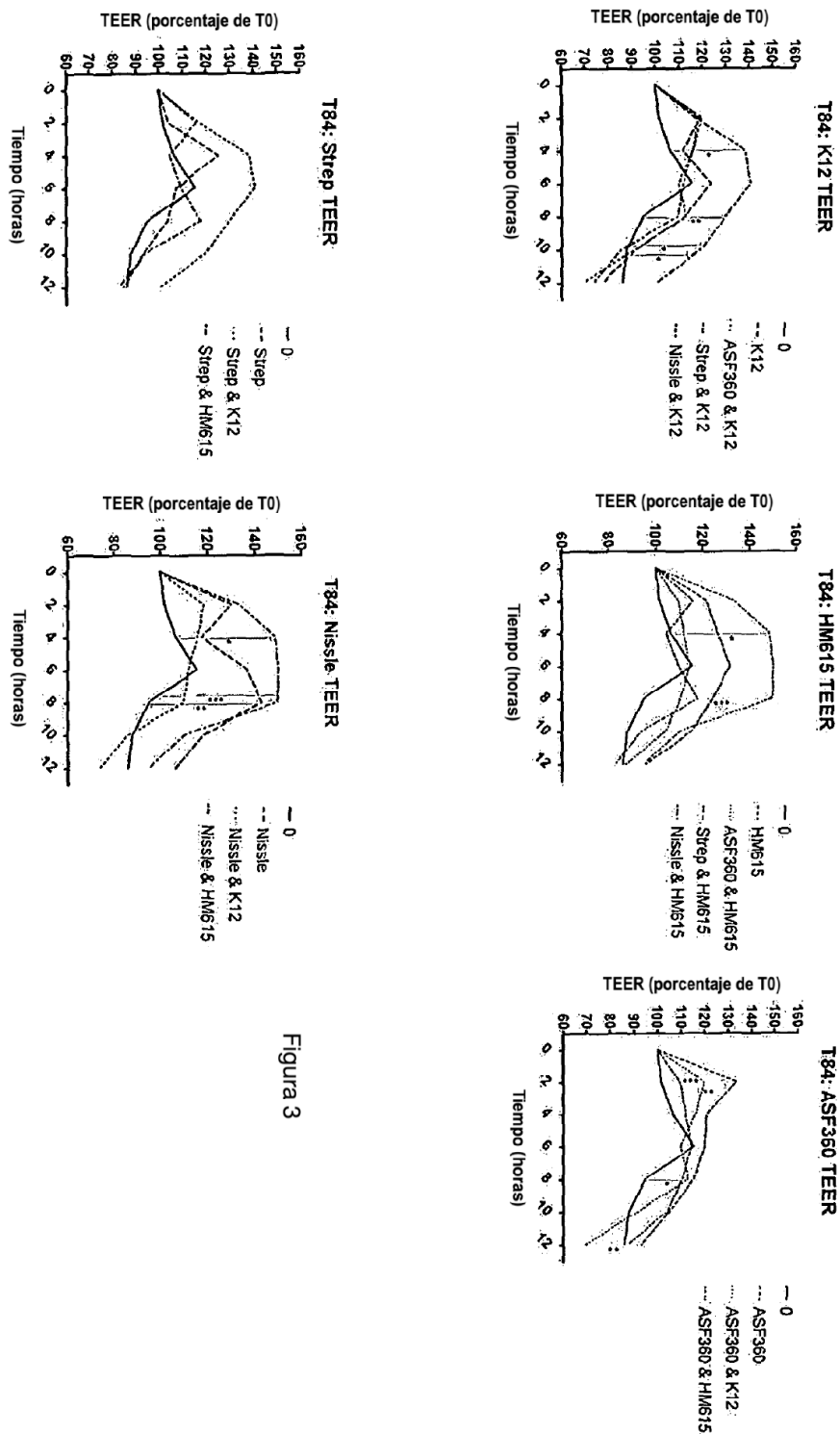


Figura 3

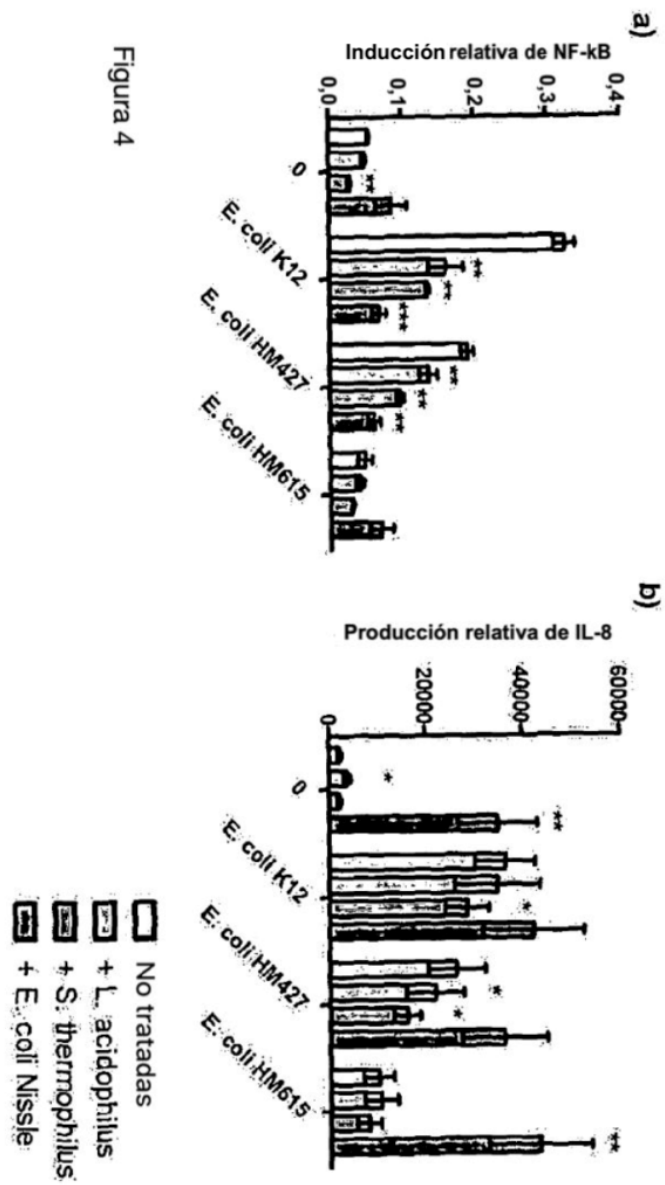
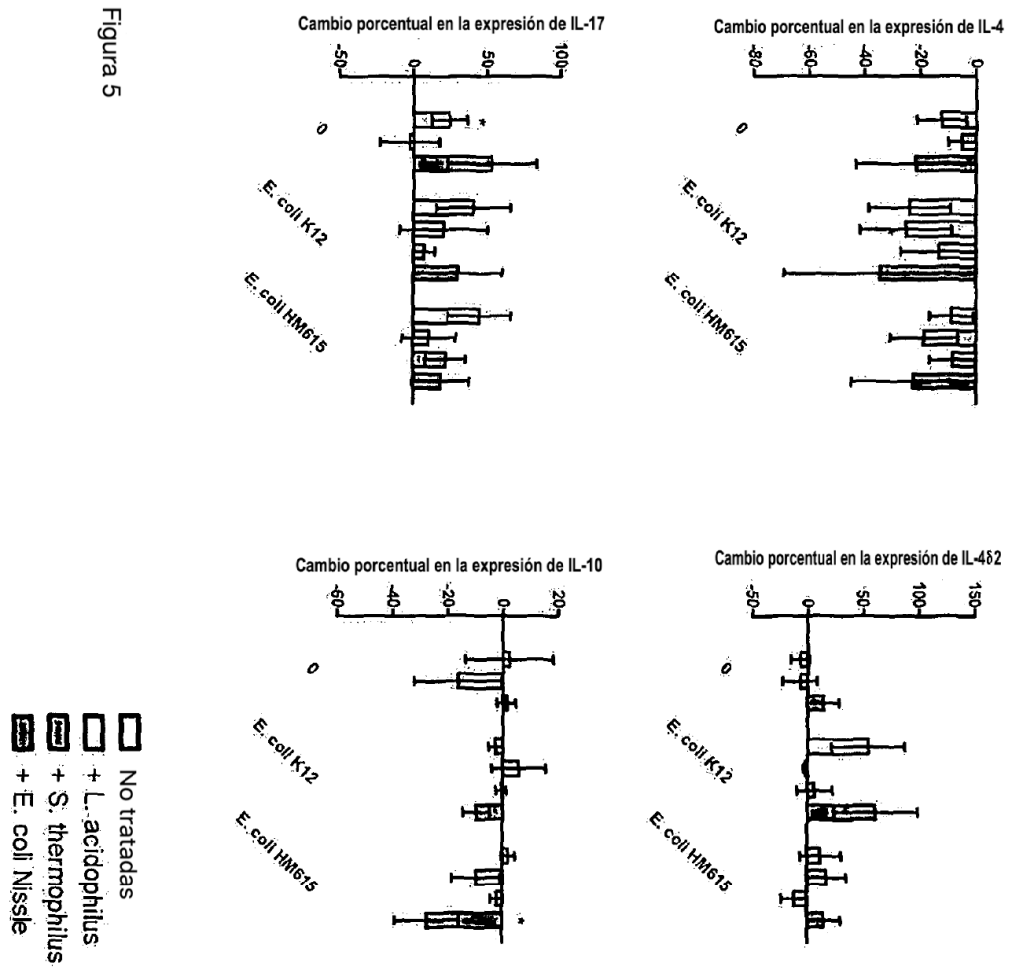


Figura 4



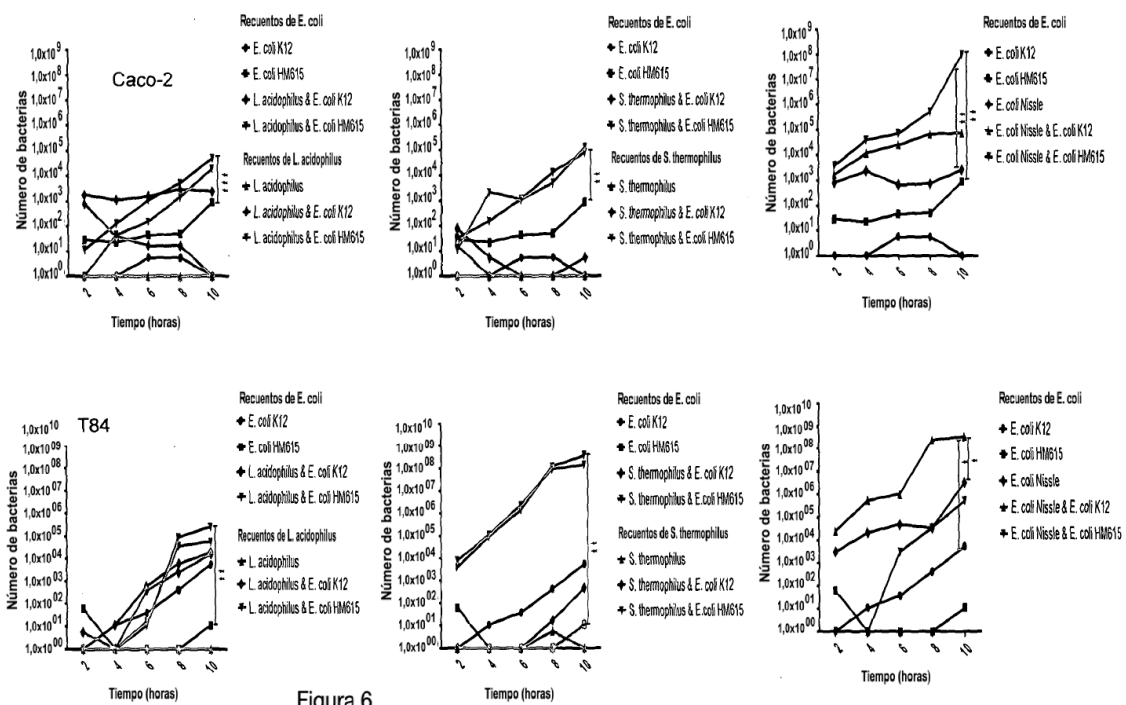


Figura 6

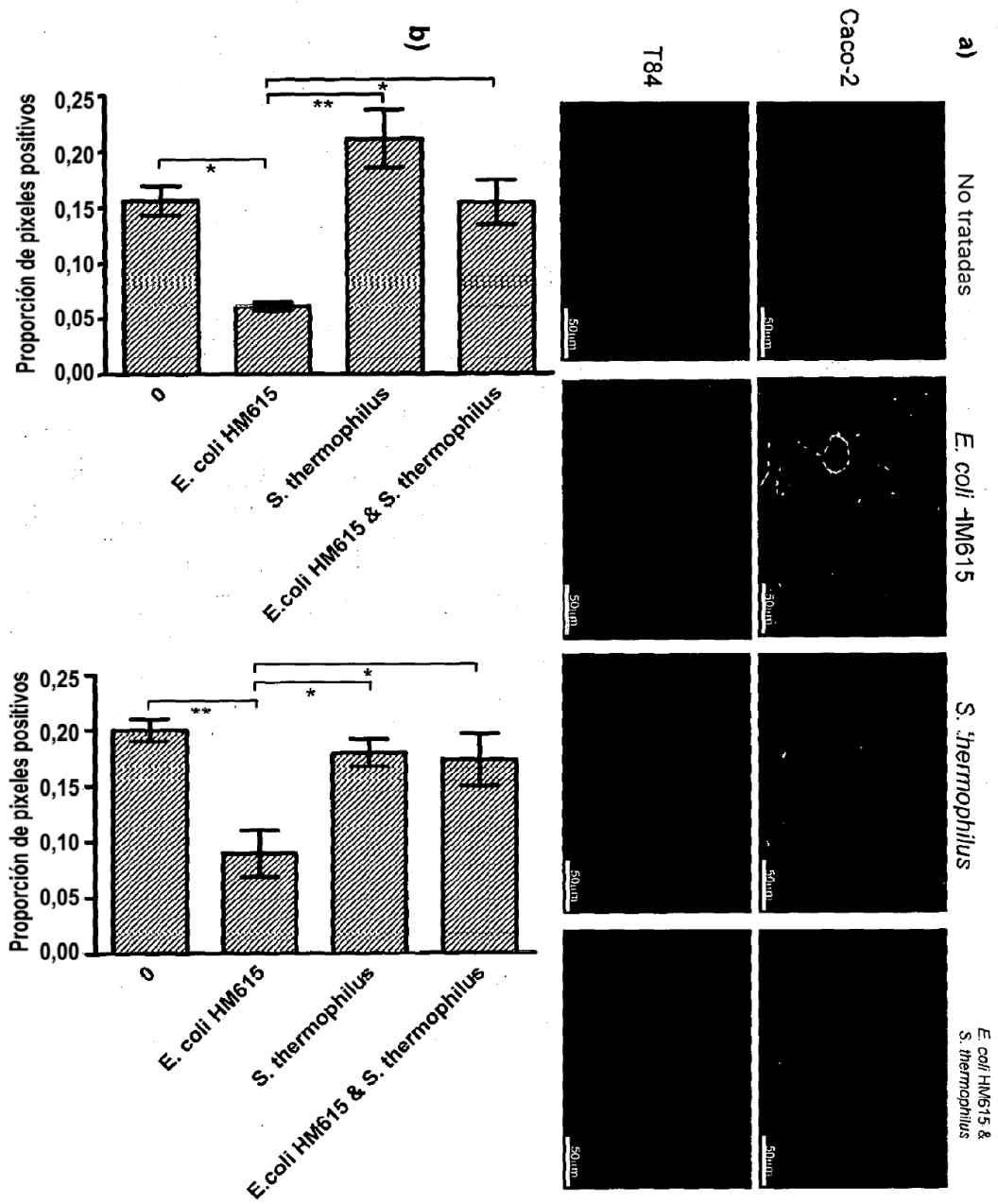
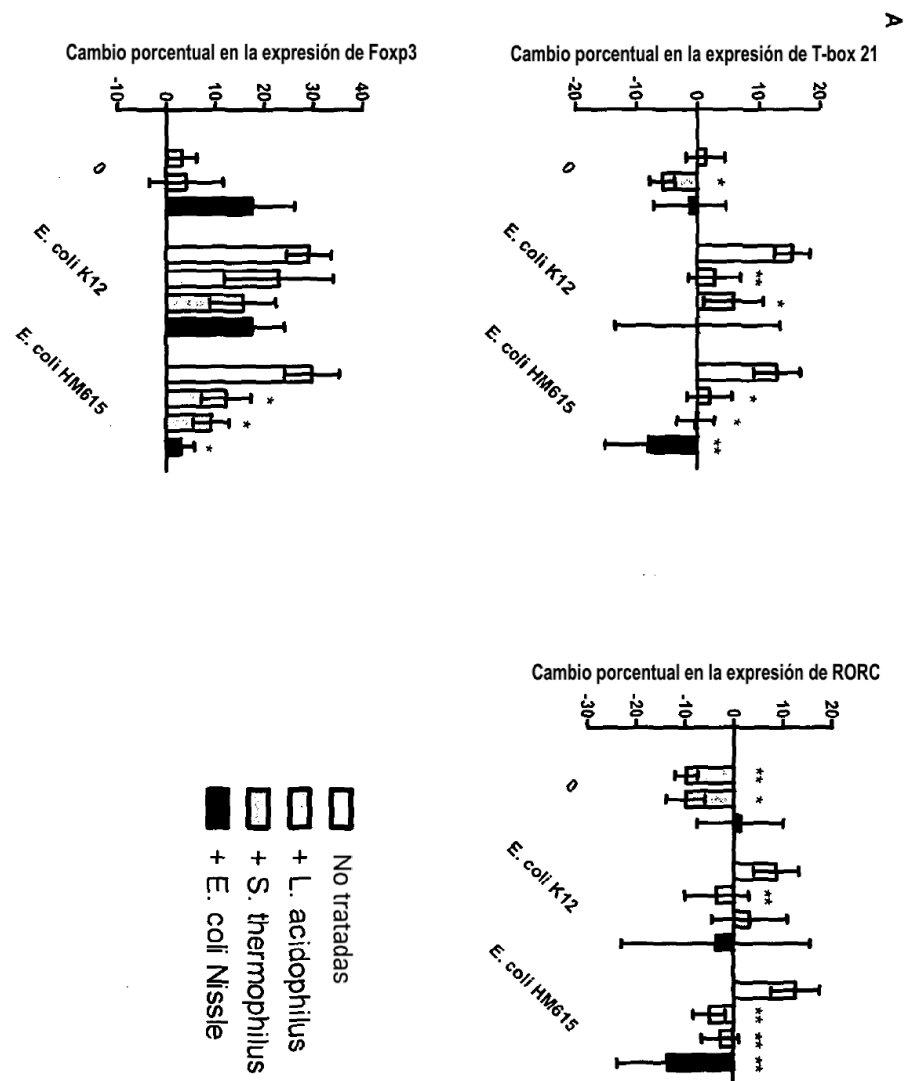


Figura 8



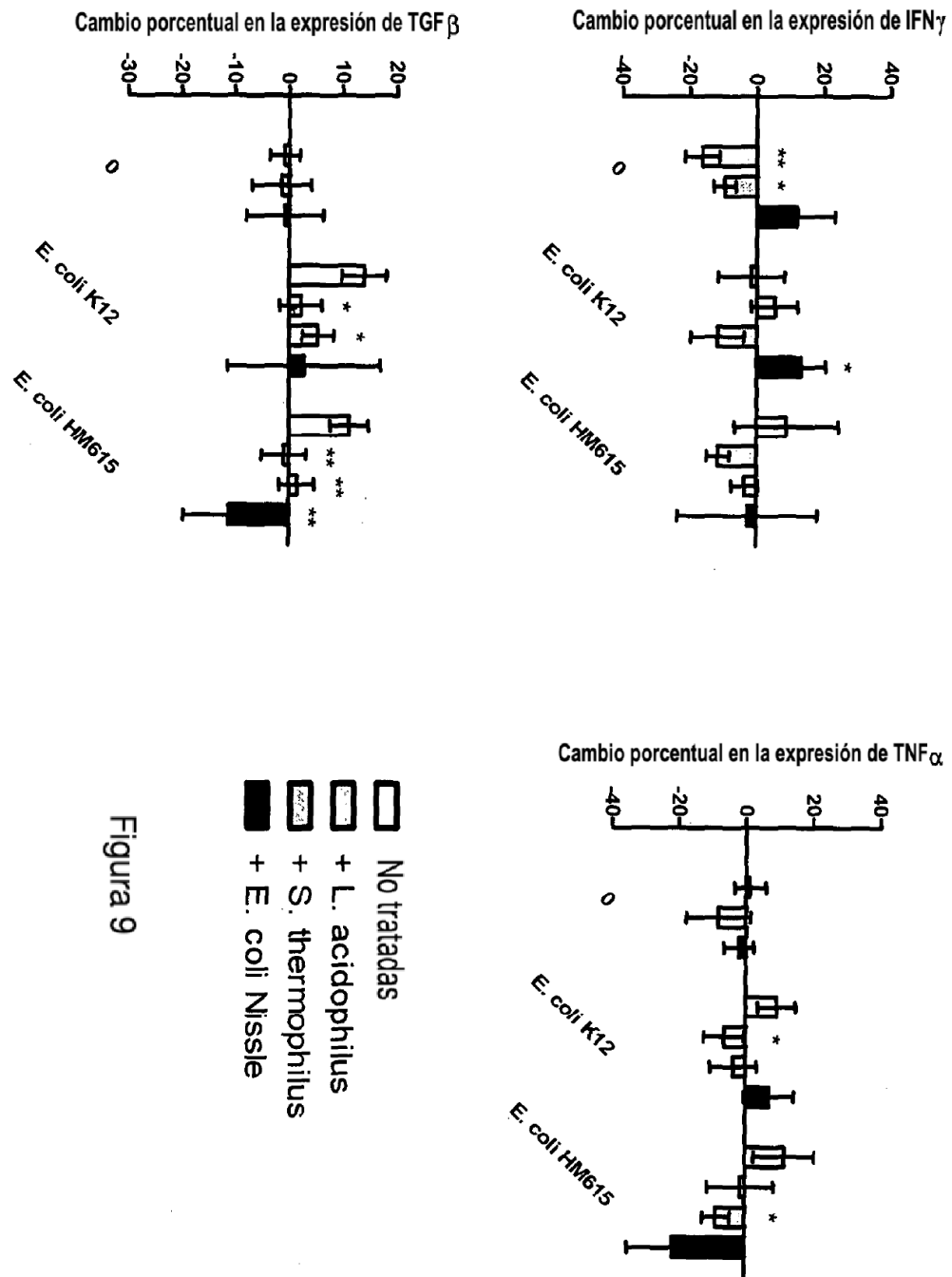


Figura 9

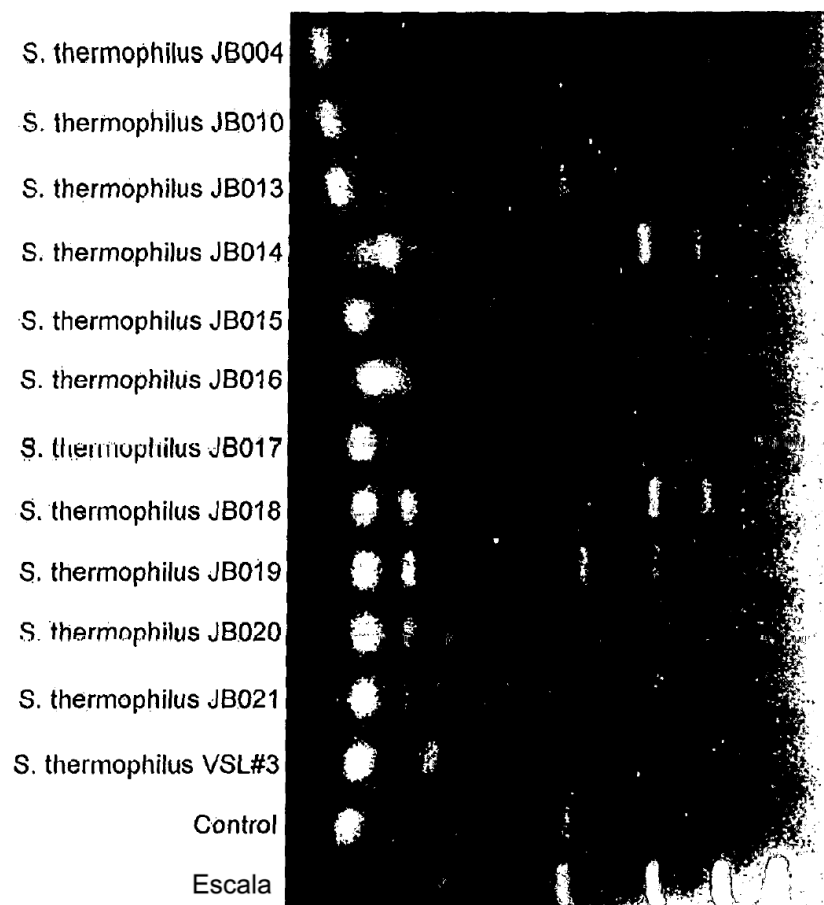


Figura 10 NB: S. thermophilus JB010 = NCIMB 41856

Figura 11

sodA

ATGGTAAGATGGAAAAAATGAAAAGAGGACCTTTACTATGGCTATTATTCTTCC
 AGATCTTCCCTACGCTTACGATGCTTTGGAACCATAACATTGATGCTGAAACAATG
 ACTCTTCATCATGACAAACACCATGCAACTTACGTGGCGAATGCTAATGCTGCGC
 TTGAAAAACACCTGAAATTGGTGAGGACCTTGAAGCGCTTTTGGCTGATGTAGA
 AAAAATTCCAGCAGACATCCGTCAAGCACTTATTAACAATGGTGGTGGACATCTT
 AACCACGCACCTTTCTGGGAACCTTTGTCACCAGAAAAACAAGAACCAACTGCA
 GAAGTAGCAGCTGCTATTAACGAAGCATTCGGTTCATTGGAAGCTTTCCAAGAAG
 TTTTCACTACGGCAGCGACAACCTCGTTTGGTTTCAAGGTGGGCAATGGCTTGTGGT
 TAACGAGAAAGGTAACTTGAAGTTGTTTCAACTCCCAACCAAGATACACCTATC
 TCAGACGGTAAAAAACCAATCTTGGCACTTGATGTTTGGGAACATGCTTACTACC
 TAAAATACCGTAACGTACGTC

dpr

GACACCAACAAACACAAAAACCAAAGCAGTATTAAATCAAGCGGTTGCCGATTT
 GTCTGTAGCAGCTTCTATTGTGCATCAAGTTCATTGGTATATGCCGTGGTCCTGGTT
 TCCTTTATCTTCACCCAAAAATGGATGAATTAATGGATAGTTTGAATTCCTATCTT
 GATAAGATTAGTGAGCGTTTGATTACCAATTGGTGGTGAACCTACTCAACITTTGG
 TAGAGTTTTCATCTAATTCAGGTTTGACTGAAACTACTGGTACATTTGATCAACC
 AATGTCTGATCGAATTCAGCTATTGGTTGATATATACAAATACTTGTCTGTCTTGT
 TCCAAGTTGGCTTGGATATTACAGATGAAGAAGGAGATGTTTCTTCAAATGATAT
 CTTTACGGATGCAAAATCAGAAATTGATAAGACGATCTG

rpoB

CCTAAGGGTGAAAAAGACCTTTCTGCTGAAGAACGTCTTCTCCATGCTATCTTTG
 GTGATAAATCTCGTGAAGTACGTGATACATCACTCCGTGTACCTCATGGTGGTGA
 TGGTGTCTGTTGCTGATGTTAAATCTTTACACGTGCAAAACGGTGATGAATTGCAA
 TCAGGTGTTAACATGCTTGTTCGTGTTTACATCGCTCAAAAACGTAAAATCAAGG
 TCGGAGATAAGATGGCTGGTTCGTACCGGTAACAAAGGGGTGTTTCTCGTATTGT
 TCCTGTTGAAGACATGCCTTACCTTCCAGACGGTACACCAGTTGACATCATGTTG
 AACCCTCTTGGGGTGCCATCACGTATGAACATTGGTTCAGGTTATGGAACCTTACC
 TTGGTATGGCTGCTCGTAACCTTGGGTATCTACATCGCAACACCAGTCTT

16s

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAG
 TAGAACGCTGAAGAGAGGAGCTTGCTCTTCTTGGATGAGTTGCCAACGGGTGAG
 TAACGCGTAGGTAACCTGCCTTGTAGCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCT
 AATACCGCATAACAATGGATGACACATGTCATTTATTTGAAAGGGGCAATTGCTC
 CACTACAAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTAGGTGAGGTAATGGCTCACCT
 AGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGA
 CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGC
 AACCCGTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCT

Figura 11 continuación

CTGTTGTAAGTCAAGAACGGGTGTGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGACGGTAG
 CTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 CCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTGATAA
 GTCTGAAGTTAAAGGCTGTGGCTCAACCATAGTTCGCTTTGGAAACTGTCAAAC
 TGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
 TATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAG
 GCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 AACGATGAGTGCTAGGTGTGGATCCTTTCCGGGATTCAGTGCCGCAGCTAACGC
 ATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTG
 ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTTCTAGAGATAGAAAGTTACTTC
 GGTACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAGTTG
 GGCACCTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
 AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAA
 CGAGTTGCGAGTCGGTGACGGCGAGCTAATCTCTTAAAGCCAACTCAGTTCCGA
 TTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG
 CACGCCGCGGTGAAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA
 GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAG
 GTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC
 GGCTGGATCACCT

Figura 12

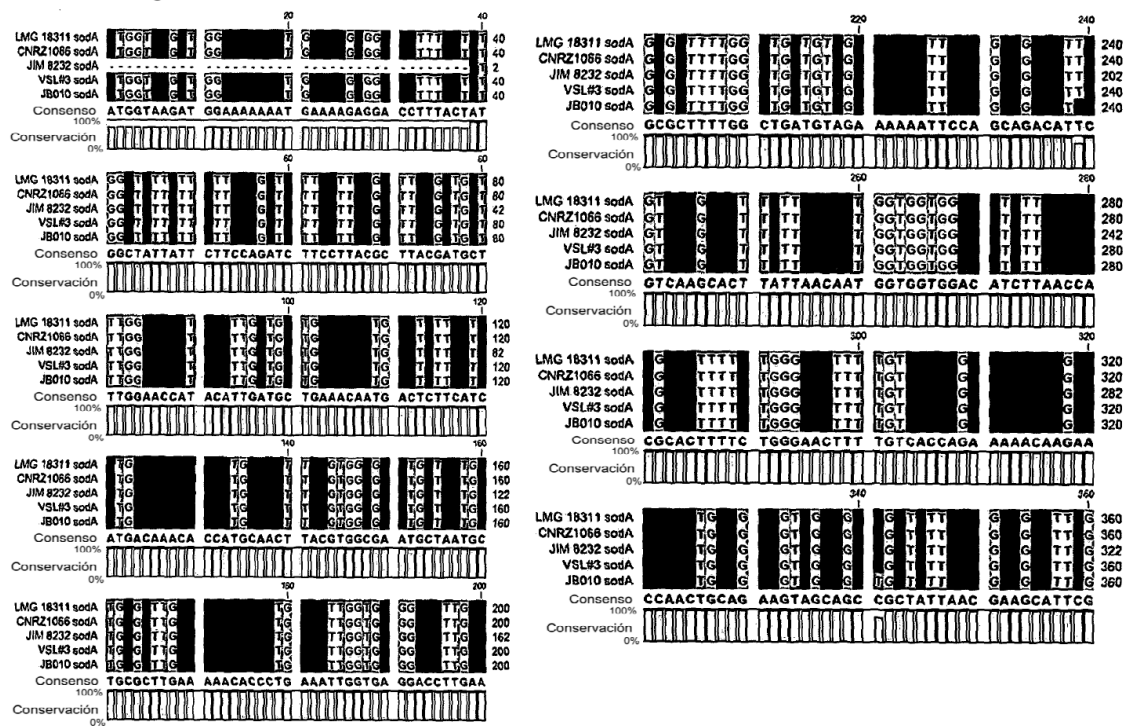


Figura 12 continuación

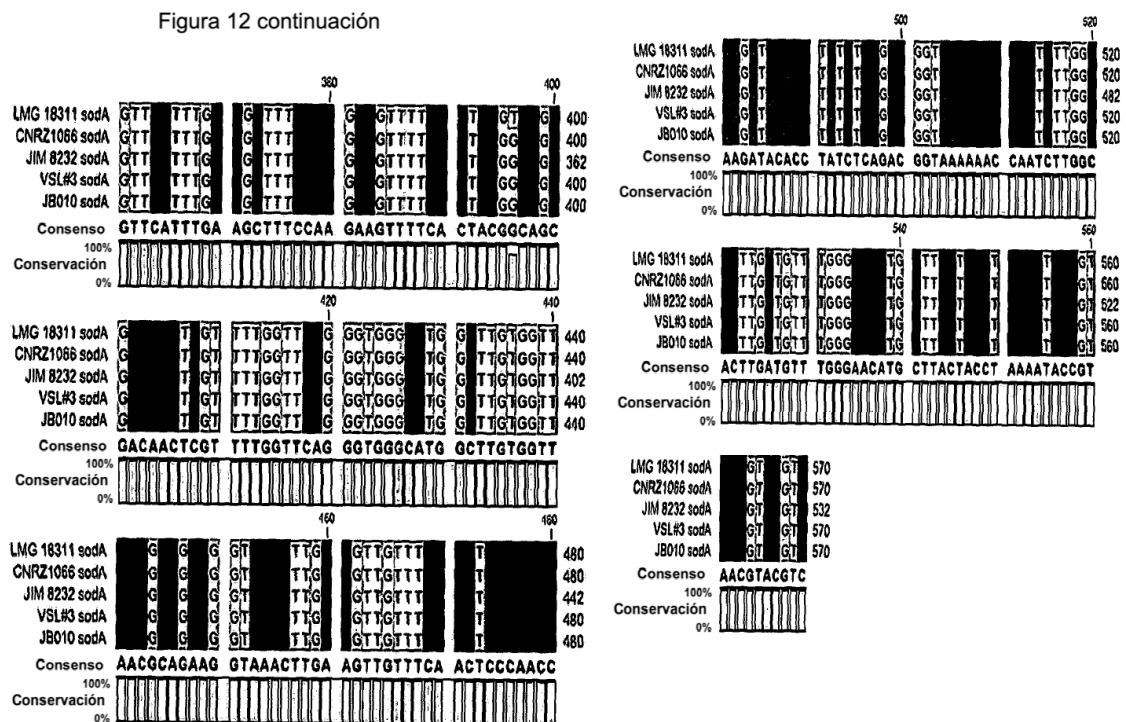


Figura 13

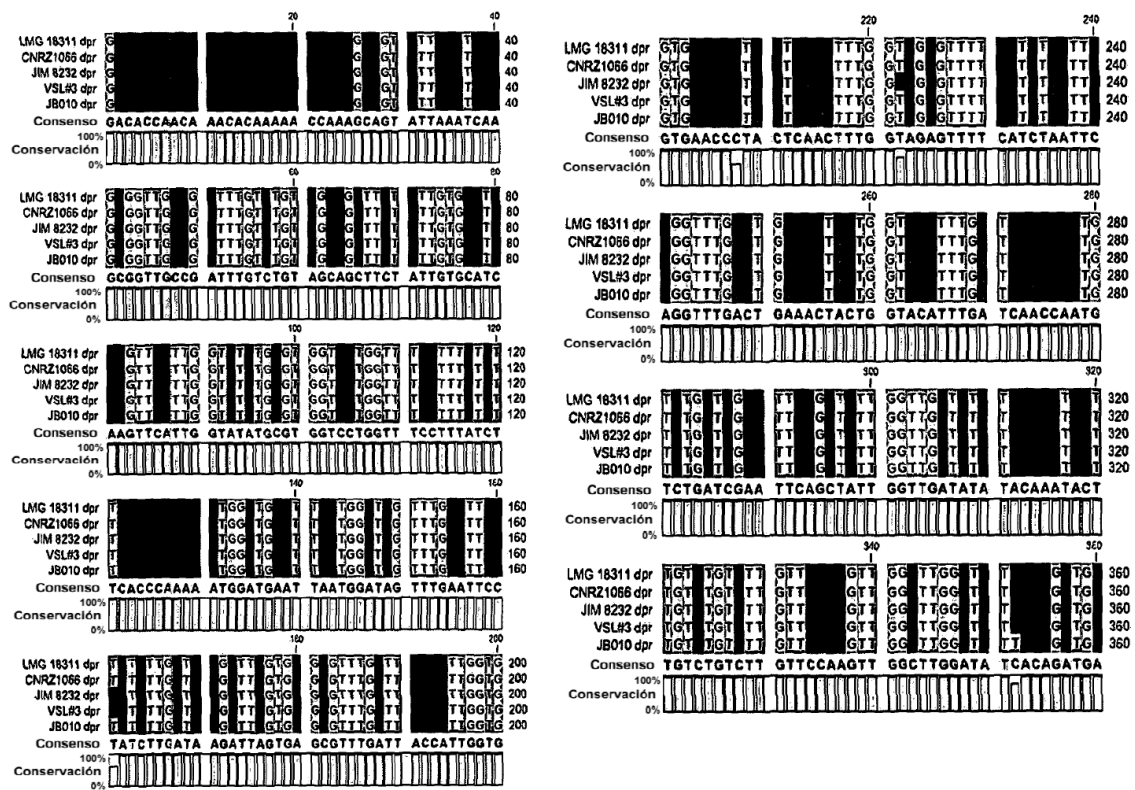


Figura 13 continuación

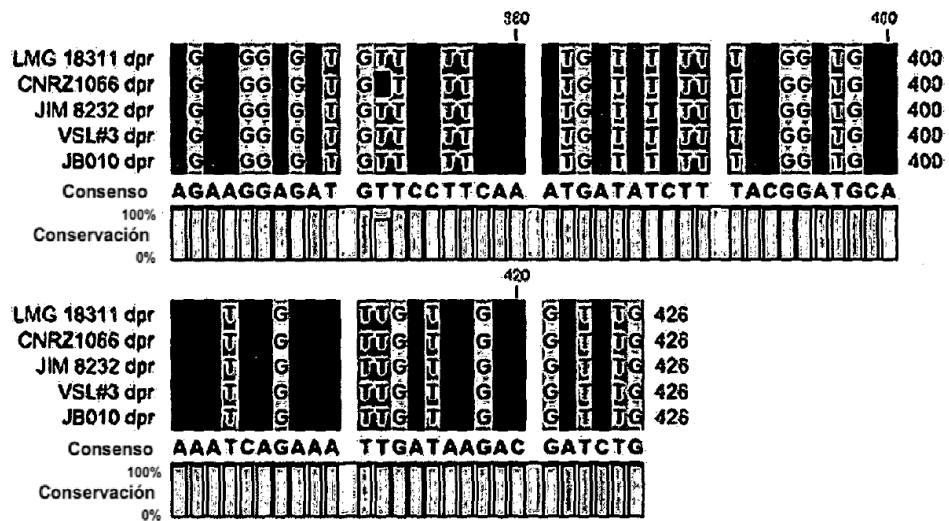


Figura 14

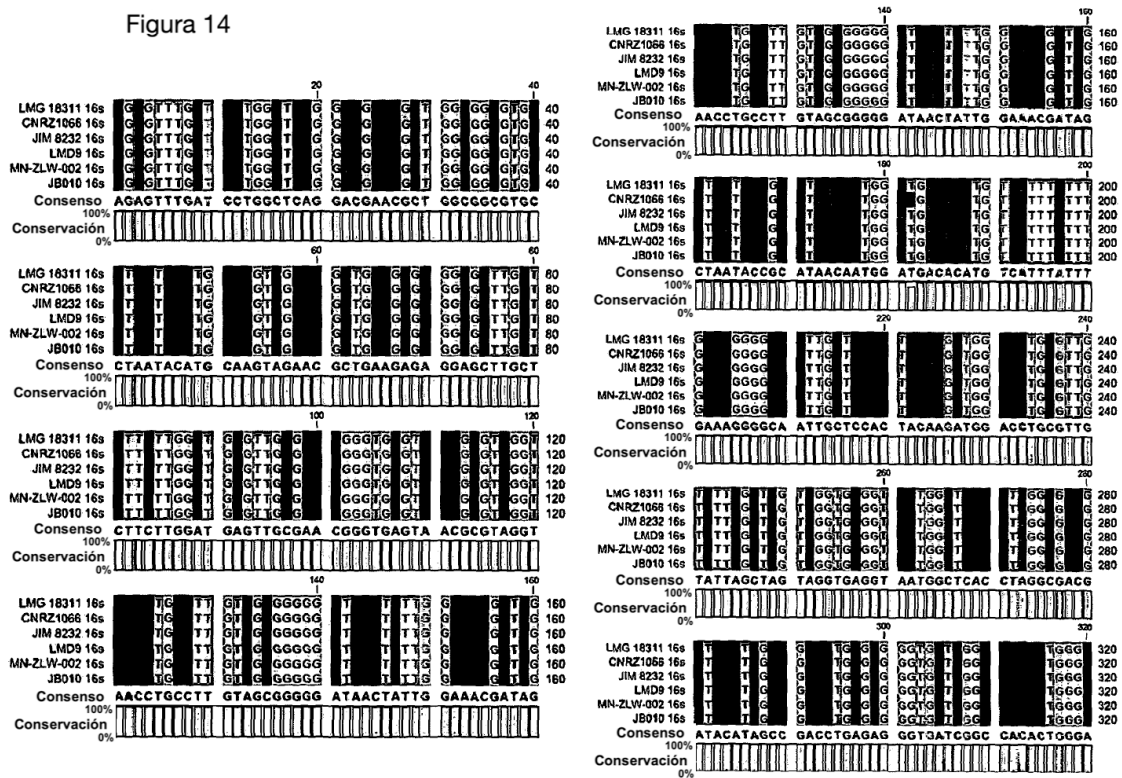


Figura 14 continuación

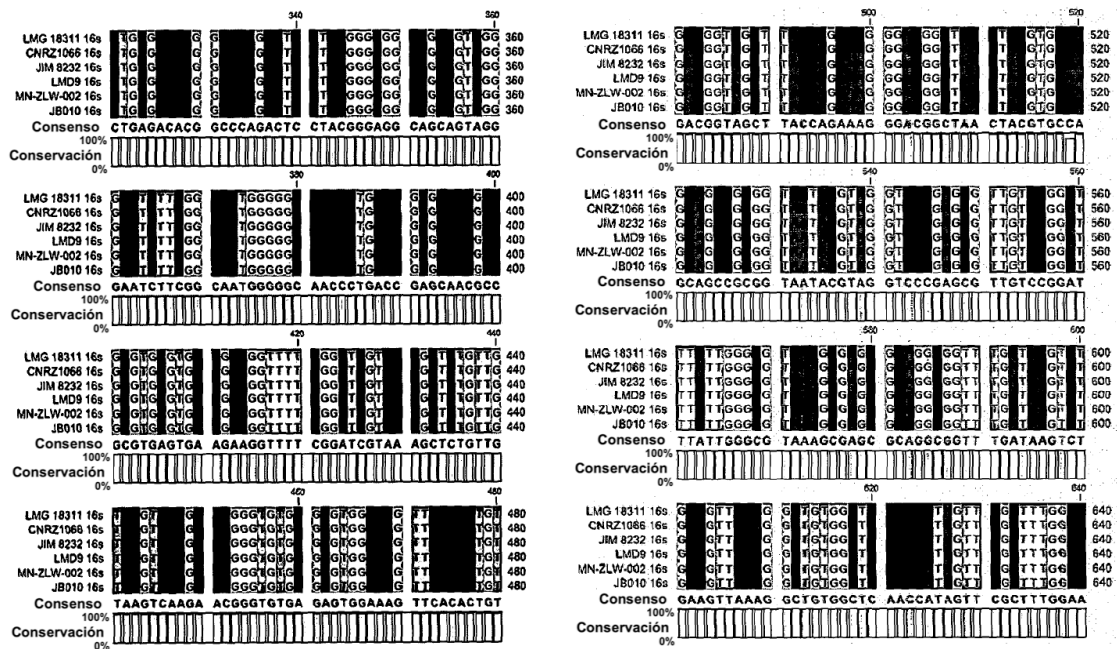


Figura 14 continuación

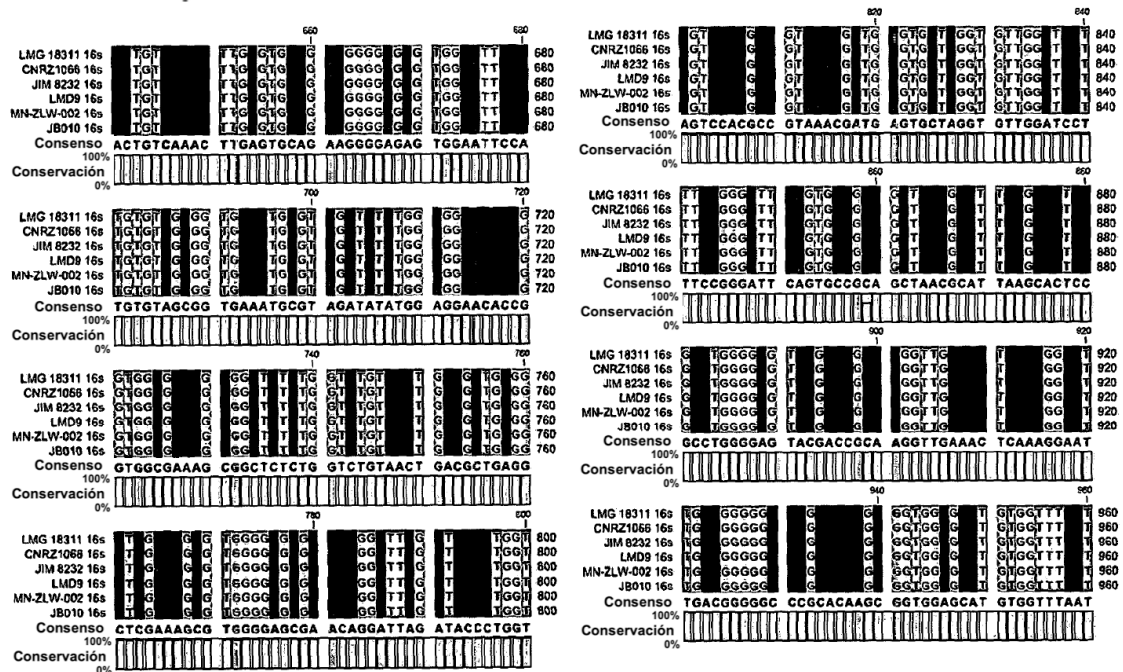
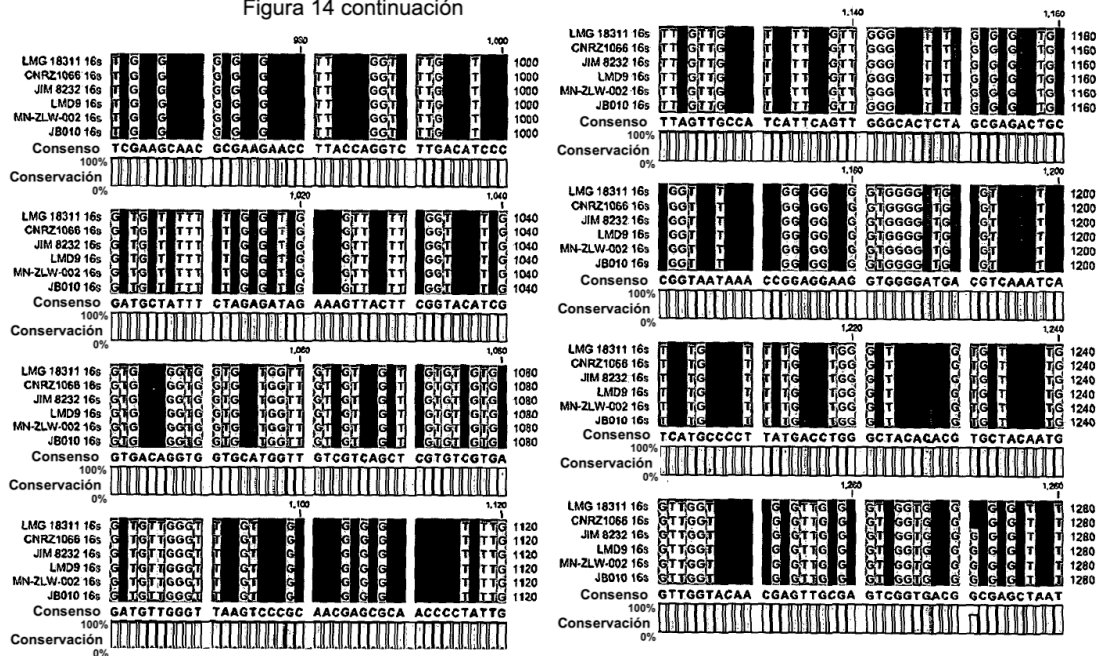


Figura 14 continuación



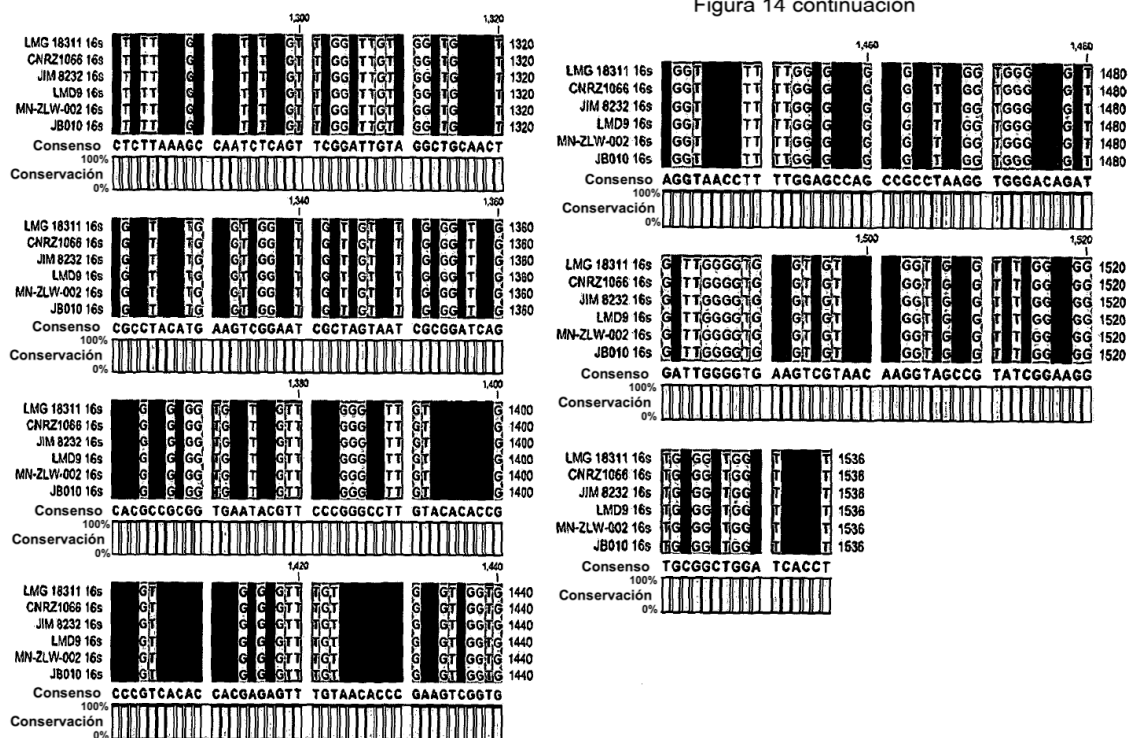


Figura 15

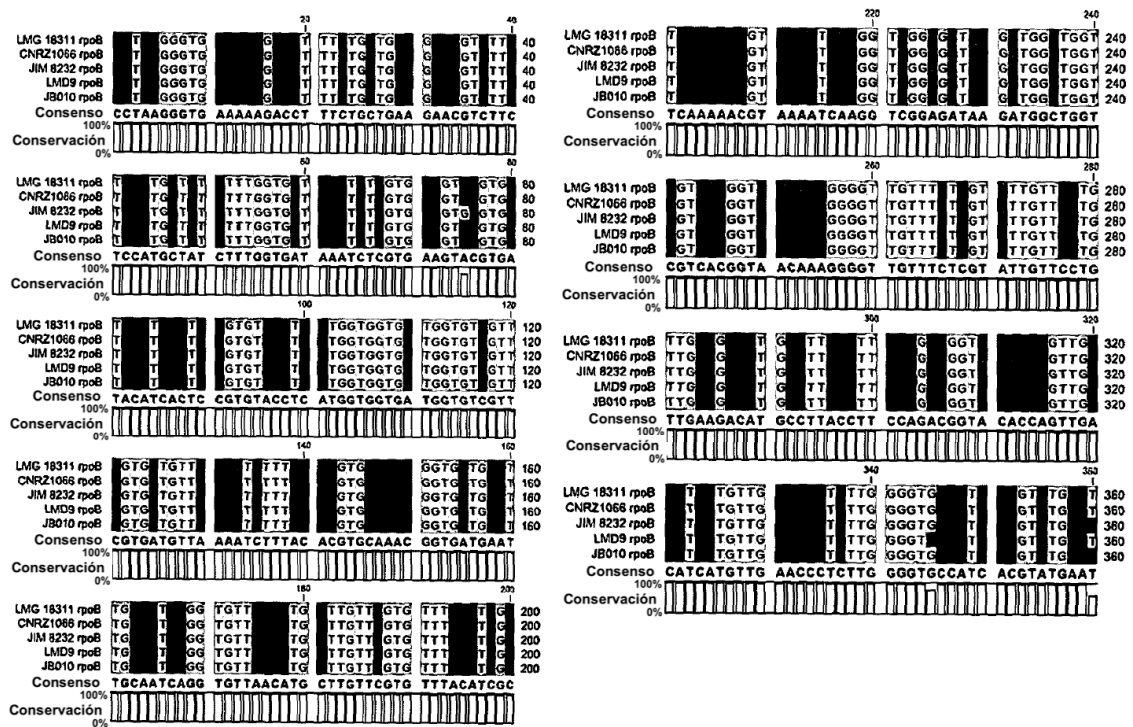


Figura 15 continuación

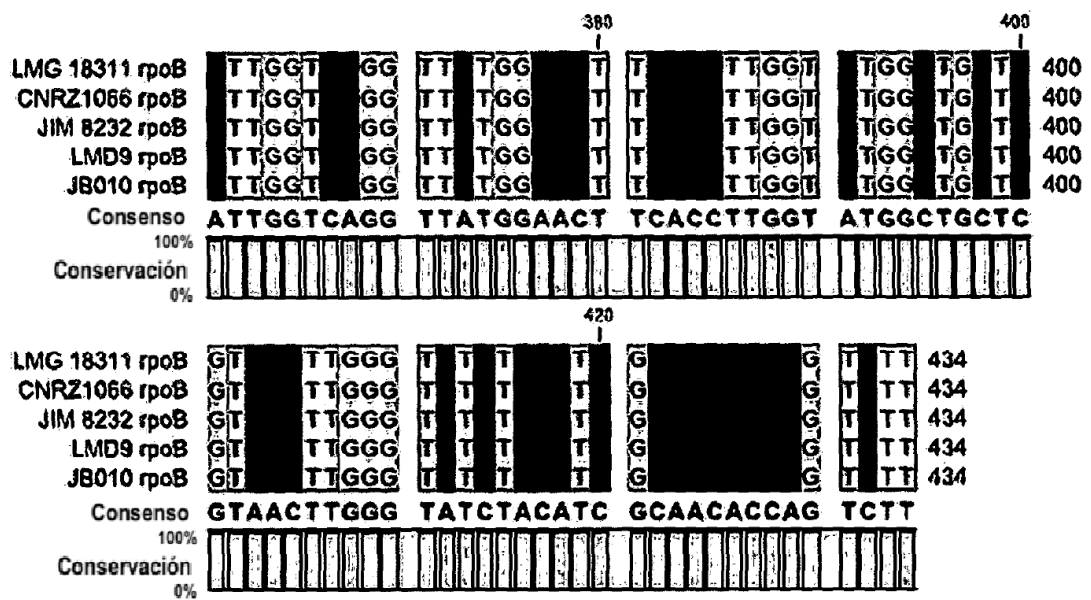


Figura 16

Cambios de base - las posiciones son relevantes para la secuencia cortada

sodA

239: JB010 T→C

341: JB010 C→T

396: LMG 18311 G→T

dpr

161: JIM 8232 & VSL#3 T→C

208: JIM 8232 & VSL#3 C→A

222: JIM8232 T→A

352: JB010 C→T

372: CNRZ1066 T→C

ipoB

75: JIM 8232 A→G

345: LMD9 G→A

360: JIM 8232 & JB010 T→C

16s

182: CNRZ1066 T→C

519: LMD9 C→A

859: JIM 8232 & MN-ZJW-002 C→A

1271: LMG 18311 & CNRZ1066 G→A

Figura 17

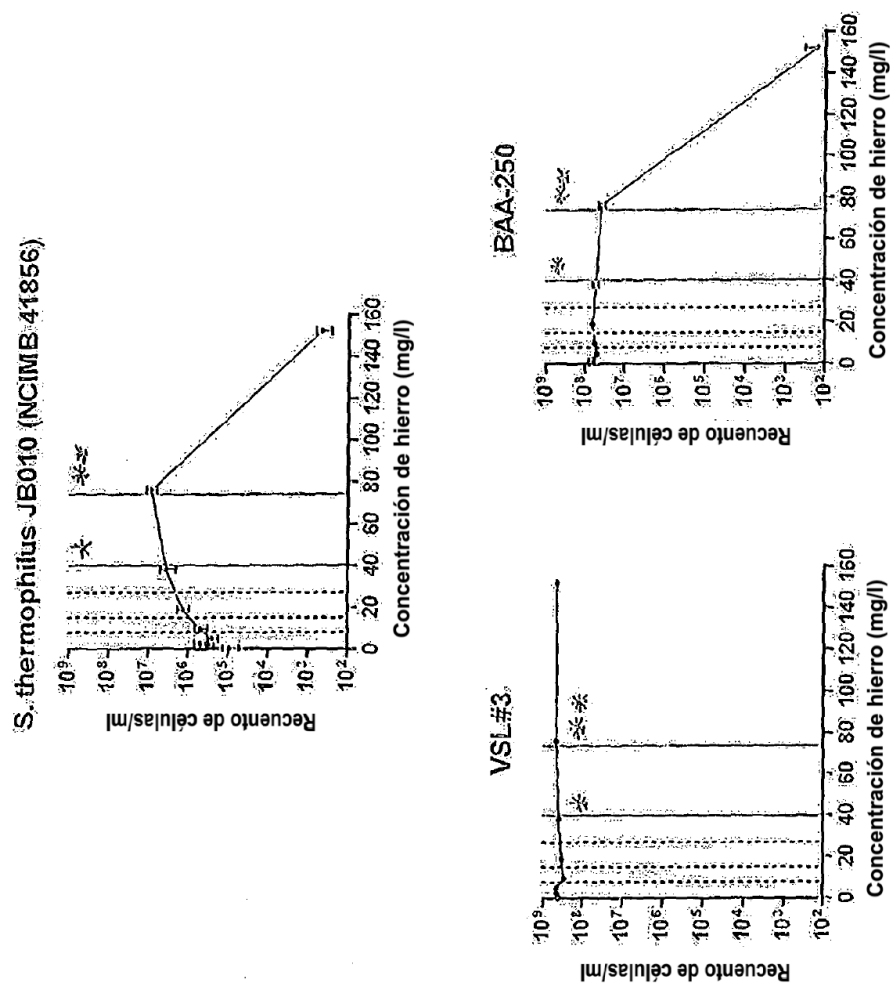


Figura 18

