

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 364**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/07** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2010 PCT/US2010/032993**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10127132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010 E 10717388 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2424550**

54 Título: **Formulación de membrana celular bacteriana**

30 Prioridad:

**29.04.2009 US 214876 P**  
**10.12.2009 US 285255 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.10.2017**

73 Titular/es:

**GANEDEN BIOTECH, INC. (100.0%)**  
**5915 Landerbrook Drive, Suite 304**  
**Mayfield Heights, OH 44124, US**

72 Inventor/es:

**FARMER, SEAN;**  
**BUSH, MIKE y**  
**KELLER, DAVID**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 639 364 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 de membrana celular bacteriana

**Campo de la invención**

La invención se refiere al uso de bacterias viables y no viables para reforzar el sistema inmunitario.

5 **Antecedentes de la invención**

La microflora gastrointestinal juega una serie de papeles vitales en el mantenimiento de la función del tracto gastrointestinal y la salud fisiológica general. El crecimiento y el metabolismo de muchas especies bacterianas individuales que habitan el tracto gastrointestinal dependen principalmente de los sustratos disponibles para ellas, la mayoría de los cuales provienen de la dieta. Véanse, por ejemplo, Gibson G.R. y col., 1995 Gastroenterology 106: 975-982; Christl, S.U. y col., 1992 Gut 33: 1234-1238. Estos hallazgos han llevado a intentos por modificar la composición y las actividades metabólicas de la comunidad bacteriana mediante la dieta, principalmente con probióticos, que son suplementos alimenticios microbianos.

Los organismos probióticos no son patógenos, no son toxigénicos, conservan la viabilidad durante el almacenamiento, y típicamente sobreviven al paso a través del estómago y del intestino delgado. Dado que los probióticos generalmente no colonizan al hospedador de forma permanente, se necesita que se ingieran de manera regular para que permanezca cualquiera de las propiedades que promueven la salud.

**Sumario de la invención**

La invención describe el uso de bacterias productoras de ácido láctico o fragmentos no viables o productos de las mismas para reforzar el sistema inmunitario. Específicamente, la administración de *Bacillus coagulans*, componentes purificados de la pared celular de *Bacillus coagulans*, o sobrenadantes de cultivo de *Bacillus coagulans* aumentan la capacidad del sistema inmunitario para combatir patógenos. Los componentes de la pared celular y/o los sobrenadantes del cultivo son útiles en productos donde las condiciones no son óptimas para la viabilidad a largo plazo de células vegetativas, por ejemplo, composiciones de bebidas o alimentos que son estables en el almacenamiento.

En particular, la presente invención se refiere a una composición para su uso en la mejora de una respuesta inmunitaria para un patógeno microbiano en un sujeto, en el que la composición comprende: una fracción de pared celular purificada de una bacteria *Bacillus coagulans*, en la que dicha fracción de pared celular comprende un compuesto bioactivo entre 3 y 30 kDa, y en la que la composición es para la administración en una cantidad que potencia dicha respuesta inmunitaria.

La presente invención se refiere adicionalmente a una composición para su uso en la mejora de una respuesta inmunitaria para un patógeno microbiano en un sujeto en el tratamiento de una infección, en la que la composición comprende una fracción de pared celular purificada de una bacteria *Bacillus coagulans*, en la que dicha fracción de pared celular comprende un compuesto bioactivo entre 3 y 30 kDa, y en la que la composición es para la administración en una cantidad que potencia dicha respuesta inmunitaria.

Las bacterias, los fragmentos o los productos se administran en una cantidad que mejora la respuesta inmunitaria del sujeto para el patógeno con el que se ha infectado el sujeto.

La *Bacillus coagulans* purificada y/o aislada es particularmente útil como un probiótico en los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento. Con "purificado" o "sustancialmente purificado" se refiere a una bacteria *Bacillus coagulans*, un fragmento no viable de la bacteria, o un producto extracelular no viable de la bacteria que es sustancialmente libre de microorganismos contaminantes u otras macromoléculas, por ejemplo, polisacáridos, ácidos nucleicos, o proteínas. Una preparación purificada contiene al menos el 75 %, el 85 %, el 95 % o el 100 % de la composición deseada y es sustancialmente libre de otros componentes subcelulares tales como orgánulos citoplasmáticos. Por ejemplo, una fracción de pared celular bacteriana es al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 %, el 99 %, o el 100 % de fragmentos de pared celular. Tal preparación es sustancialmente libre de orgánulos intracelulares del citoplasma y productos bacterianos secretados.

En un aspecto, el patógeno microbiano es una bacteria o virus tal como un patógeno que provoca una infección respiratoria. Por ejemplo, el patógeno comprende un virus de la gripe tal como un virus de la gripe humana, aviar o porcina o una combinación de los mismos. Otros patógenos víricos incluyen adenovirus.

La mejora de la respuesta inmunitaria comprende un aumento en la producción de citocina (por ejemplo, interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o un aumento en la migración de células inmunitarias al lugar de la infección. La mejora del sistema inmunitario también incluye el refuerzo del sistema inmunitario mediante el aumento de la producción de citocina, la activación del aspecto de la vigilancia inmunitaria de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), el aumento de la quimiotaxis de células inmunitarias, la activación de células NK y/o el aumento de la fagocitosis de los monocitos. Específicamente, las

composiciones de la invención aumentan las capacidades quimiotácticas y las capacidades de fagocitosis de los PMN. Las composiciones de la invención también aumentan la expresión de CD69 en células NK.

En un aspecto, la cantidad de componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* que mejoran el sistema inmunitario es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 gramos, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 gramos, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 5 gramos; de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1 gramo; o de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 1 gramo.

También en la invención hay composiciones adecuadas para la ingesta humana, tales como una composición tal como se describe anteriormente. Las formulaciones ejemplares incluyen una píldora, capsula, o suspensión.

Las especies bacterianas ejemplares para las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento incluyen cepas derivadas de *Bacillus coagulans* de la cepa Hammer de N.º de referencia ATCC 31284, en concreto, los números de ATCC: GBI-20 (GB- 20), Número de designación de ATCC PTA-6085; GBI-30 (GB- 30/Ganeden BC<sup>30</sup>™/BC<sup>30</sup>), Número de designación de ATCC PTA-6086; y GBI-40 (GB-40), Número de designación de ATCC PTA-6087; véase, la Patente de Estados Unidos N° 6.849.256 para Farmer). Preferentemente, la *Bacillus coagulans* comprende GBI-30 (BC<sup>30</sup>), o cualquier cepa del organismo descrito en el documento U.S.S.N. 11/706.642.

Las cepas Hammer de *Bacillus coagulans* de la invención no son patogénicas y generalmente se consideran seguros para su uso en nutrición humana (es decir, clasificación GRAS) por la Administración Federal de Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por el inglés, *Federal Drug Administration*) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), y por los expertos en la materia. Además, las cepas Hammer de *Bacillus coagulans* de la invención germinan a o por debajo de la temperatura corporal humana, haciéndoles útiles como probióticos. Muchas cepas de *Bacillus coagulans* fuera del grupo Hammer tienen en su mayoría aplicaciones industriales, poco o no beneficio nutricional, y contaminantes ambientales cuya seguridad no se ha evaluado. Además, otras muchas cepas no Hammer de *Bacillus coagulans* crecen de manera óptima a temperaturas que superan la temperatura corporal humana y, por tanto, no germinan de manera eficaz en el cuerpo humano. Tales cepas son menos o no adecuadas como probióticos para el consumo humano.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la misma, y a partir de las reivindicaciones. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece la presente invención. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un gráfico lineal que demuestra el porcentaje de inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras la exposición de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) bien a sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o a componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2), comparado con los resultados del valor inicial.

La Figura 2 es un gráfico lineal que ilustra el porcentaje de inhibición de la formación de ROS inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparada con los resultados del valor inicial.

La Figura 3 es una representación esquemática de cómo comienza la migración de PMN en el torrente sanguíneo y se mueven al tejido mediante placas de migración transpocillo.

La Figura 4 es un gráfico lineal que demuestra la migración aleatoria presentando los patrones de migración de los PMN tratados bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2).

La Figura 5 es un gráfico lineal que ilustra la migración dirigida al péptido bacteriano formil-Met-Leu-Phe (f-MLP), presentando los patrones de migración de los PMS tratados bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2).

La Figura 6A es un gráfico lineal que demuestra la migración dirigida a interleucina-8 (IL-8) presentando los patrones de migración de los PMN tratados bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2). La Figura 6B es un gráfico lineal que representa la migración dirigida a IL-8 de células PMN tratadas con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) y componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2).

La Figura 7A es un gráfico lineal que ilustra la migración dirigida a leucotrieno B4 (LTB4) mostrando los patrones de migración de los PMN tratados bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2). Las Figuras 7B-7C son una serie de gráficos de barras que ilustran la migración dirigida a LTB4.

La Figura 8 es un gráfico de barras que demuestra la migración aleatoria sinérgica mostrando los patrones de migración de las PMN expuestas bien a sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o a componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) que actúan como un quimioatrayente en la cámara inferior de la placa de migración transpocillo.

La Figura 9 es un gráfico de barras que ilustra la migración sinérgica dirigida a f-MLP mostrando los patrones de

migración de las PMN expuestas bien a sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o a componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) que actúan como un quimioatrayente en la cámara inferior de la placa de migración transpocillo.

5 La Figura 10 es un gráfico de barras que demuestra la migración sinérgica dirigida a IL-8 mostrando los patrones de migración de las PMN expuestas bien a sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o a componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) que actúan como un quimioatrayente en la cámara inferior de la placa de migración transpocillo.

10 La Figura 11 es un gráfico de barras que demuestra la migración sinérgica dirigida a LTB4 mostrando los patrones de migración de las PMN expuestas bien a sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o a componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) que actúan como un quimioatrayente en la cámara inferior de la placa de migración transpocillo.

La Figura 12 es un gráfico de barras que ilustra la fagocitosis de monocitos medida por el grado en que los monocitos pueden ingerir fluoroesferas verdes carboxiladas.

15 La Figura 13 es un gráfico de barras que demuestra la fagocitosis de PMN medida por el grado en que los monocitos pueden ingerir fluoroesferas verdes carboxiladas.

La Figura 14 es un gráfico lineal que muestra la expresión del grupo de diferenciación 69 (CD69, del inglés *cluster of differentiation 69*) de los linfocitos citolíticos naturales (NK) (análisis generado midiendo la intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD69).

20 La Figura 15 es un gráfico lineal que muestra la expresión de CD25 de células NKT (análisis generado midiendo la IFM de CD25).

La Figura 16 es un gráfico lineal que demuestra la expresión de CD107a de células NK (análisis generado midiendo la IFM de CD107a).

25 La Figura 17 es un gráfico lineal que ilustra los resultados de los linfocitos que se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) y después se expusieron al mitógeno fitohemaglutinina (PHA).

La Figura 18 es un gráfico lineal que demuestra los resultados de los linfocitos que se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) y después se expusieron al mitógeno de hierba carmín (PWM).

30 Las Figuras 19A y B son gráficos lineales que muestran la producción de citocinas de linfocitos pretratados con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1).

Las Figuras 20A y B son gráficos lineales que ilustran la producción de linfocitos pretratados con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2).

35 La Figura 21 es un gráfico de barras que linfocitos que se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2), y después no se expusieron a mitógeno PHA o PWM. Este gráfico representa los niveles relativos de la citocina IL-2 presente en el sobrenadante de cultivos de linfocitos de 5 días. Sin tratar (ST).

40 La Figura 22 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de los linfocitos que se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) y después no se expusieron al mitógeno, PHA o PWM. Este gráfico representa los niveles relativos de la citocina IL-4 presente en el sobrenadante de cultivos de linfocitos de 5 días.

45 La Figura 23 es un gráfico de barras que demuestra los resultados de linfocitos pretratados bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2), y después no se expusieron a mitógeno, PHA o PWM. Este gráfico representa los niveles relativos de la citocina IL-6 presente en el sobrenadante de cultivos de linfocitos de 5 días.

La Figura 24 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de linfocitos que se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2), y después no se expusieron a mitógeno, PHA o PWM. Este gráfico representa los niveles relativos de la citocina IL-10 presente en el sobrenadante de cultivos de linfocitos de 5 días.

50 La Figura 25A y B muestra una serie de gráficos de barras que muestra los resultados de linfocitos que se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2), y después no se expusieron a mitógeno, PHA o PWM. Este gráfico representa los niveles relativos de la citocina TNF- $\alpha$  presente en el sobrenadante de cultivos de linfocitos de 5 días.

55 Las Figuras 26A y B muestran una serie de gráficos de barras que muestra los resultados de linfocitos que se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2), y después no se expusieron a mitógeno, PHA o PWM. Este gráfico representa los niveles relativos de la citocina IFN- $\gamma$  presente en el sobrenadante de cultivos de linfocitos de 5 días.

La Figura 27 es una representación esquemática de una protección antioxidante en eritrocitos basada en células (CAP-e) de cómo se toma un producto natural en la célula. Se usa un colorante para expresar la fluorescencia que representa el estrés oxidativo.

60 La Figura 28 es un gráfico lineal que muestra los resultados de CAPe para el sobrenadante de *Bacillus coagulans*, que se ensaya en paralelo en células recientes y maduras.

La Figura 29 es un gráfico lineal que muestra los resultados de CAPe para la pared celular de *Bacillus coagulans*, que se ensaya en paralelo en células recientes y maduras.

65 La Figura 30A es una fotomicrografía que ilustra una célula PMN sin tratar que se ha entrado en fagocitosis. Las perlas verdes son fluoroesferas carboxiladas que simulan partículas bacterianas.

La Figura 30B es una fotomicrografía que ilustra una célula PMN tratada con componentes de pared celular de

*Bacillus coagulans* (BC2).

La Figura 31 es una ilustración de un procedimiento típico de electroforesis de proteína en gel.

La Figura 32 es una fotografía que ilustra los resultados de un experimento de electroforesis en gel con fracciones de sobrenadante y de pared celular de *Bacillus coagulans*.

5 La Figura 33 es una representación esquemática de cómo comienza la migración de PMN en el torrente sanguíneo y se mueven al tejido mediante placas de migración transpocillo.

### Descripción detallada

10 La presente invención se dirige al descubrimiento de que las bacterias no patogénicas que producen ácido láctico (es decir, "bacterias del ácido láctico"), tales como *Bacillus coagulans*, son útiles para reforzar el sistema inmunitario, es decir, aumentar el nivel de activación de células inmunitarias. Se usan las células vegetativas de *Bacillus coagulans* y/o las esporas o se usan las células inactivadas/muertas de *Bacillus coagulans*, por ejemplo, *Bacillus coagulans* matadas por calor. Por ejemplo, la administración de componentes de la pared celular o de sobrenadante del cultivo de *Bacillus coagulans* refuerza el sistema inmunitario mediante el aumento de la producción de citocinas, la activación del aspecto de la vigilancia inmunitaria de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), el aumento de la quimiotaxis de células inmunitarias, la activación de linfocitos citolíticos naturales (NK), y el aumento de la fagocitosis de los monocitos.

### Bacterias probióticas productoras de ácido láctico

20 Una bacteria probiótica productora de ácido láctico adecuada para su uso en los procedimientos y composiciones descritas produce ácido y no es patogénica. Las especies bacterianas incluyen cepas derivadas de la cepa Hammer de *Bacillus coagulans* de N.º de referencia ATCC 31284, en concreto, los números de ATCC: GBI-20, Número de designación de ATCC PTA-6085; GBI-30 o BC<sup>30</sup>, Número de designación de ATCC PTA-6086; y GBI-40, Número de designación de ATCC PTA-6087; véase la Patente de Estados Unidos N.º 6.849.256 para Farmer).

25 Los componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* son útiles en la presente invención. Los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* son particularmente útiles como un probiótico en las composiciones descritas en el presente documento. Con "purificado" o "sustancialmente purificado" se refiere a células vegetativas o esporas de *Bacillus coagulans*, sobrenadante de *Bacillus coagulans*, o componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* que son sustancialmente libres de microorganismos contaminantes u otras macromoléculas, por ejemplo, polisacáridos, ácidos nucleicos, o proteínas. Una preparación purificada contiene al menos el 75 %, el 85 %, el 95 % o aproximadamente el 100 % de la composición deseada y es sustancialmente libre de otros componentes subcelulares tales como orgánulos citoplasmáticos. Por ejemplo, una fracción de pared celular bacteriana es al menos el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 98 %, el 99 %, o aproximadamente el 100 % de componentes de pared celular. Tal preparación es sustancialmente libre de orgánulos intracelulares del citoplasma y productos bacterianos secretados.

35 Una especie de *Bacillus* es bien adecuada para la presente invención, particularmente, una especie que tiene la capacidad de formar esporas que son relativamente resistentes al calor y otras condiciones, haciéndolas ideales para el almacenamiento (vida útil) en formulaciones del producto.

40 La invención también proporciona una fracción de pared celular purificada de una bacteria de *Bacillus coagulans*, en la que dicha fracción de pared celular comprende un compuesto bioactivo de entre 3 y 30 kD para su uso en los procedimientos descritos en el presente documento para reforzar el sistema inmunitario. En un aspecto, los componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* en la forma de un polvo secado por pulverización se incluyen en o sobre la superficie de la composición descrita en el presente documento.

45 La pared celular de *Bacillus coagulans* se aplica usando cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos que incluyen, por ejemplo, la aplicación de un polvo, el secado por pulverización del probiótico sobre la composición, o empapar la composición en una solución que contiene el probiótico. Opcionalmente, la pared celular de *Bacillus coagulans* se seca y reconstituye en agua antes de su uso. Se puede usar cualquiera de una variedad de procedimientos para colorar la composición bacteriana en una composición. Sin embargo, los procedimientos preferidos incluyen un procedimiento de "secado por pulverización" en el que las composiciones se exponen en una cámara de baja humedad a una mezcla atomizada que contiene una composición líquida, en la que la cámara se expone posteriormente a aproximadamente 27-43 °C para secar el líquido, impregnando de este modo el material de composición con los componentes.

50 Una composición típica es de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^{12}$  UFC;  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{11}$  UFC; o  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  UFC de bacteria viable o esporas/g de la composición. Tras el secado, la composición está lista para su uso inmediato o para el almacenamiento en un envase estéril.

55 Los principios activos (es decir, componentes de la pared celular), comprenden entre aproximadamente el 0,01 % hasta aproximadamente el 10 %; del 0,01% a aproximadamente el 1 %; o desde el 0,05 % a aproximadamente el 0,1 % en peso de la composición.

En un aspecto, la invención se proporciona el almacenamiento de la composición en un envase estéril a temperatura

ambiente antes del consumo. Como alternativa, la composición se usa de manera inmediata.

#### Agentes antimicrobianos

Opcionalmente, las composiciones de la invención también incluyen agentes antimicrobianos conocidos, agentes antivíricos conocidos, agentes antifúngicos conocidos. Los otros agentes en las composiciones pueden ser bien sinérgicos o agentes activos. Preferentemente, los agentes antimicrobianos, antivíricos y/o antifúngicos conocidos son agentes probióticos compatibles con *Bacillus coagulans*. Las composiciones también pueden incluir agentes antioxidantes, agentes tamponadores, y otros agentes tales como agentes colorantes, aromatizantes, vitaminas o minerales. Se pueden añadir a las composiciones agentes espesantes tales como polivinilpirrolidona, polietilenglicol o carboximetilcelulosa.

En un aspecto, los principios activos se combinan con un vehículo que es fisiológicamente compatible con el tejido dérmico o epidérmico de un ser humano o animal al que se administra. Es decir, el vehículo es preferentemente inactivo de manera sustancial excepto por las propiedades tensioactivas usadas en la creación de una suspensión de los principios activos. Las composiciones pueden incluir otros constituyentes activos de manera fisiológica que no interfieren con la eficacia de los agentes activos en la composición.

Una composición formulada de la presente invención se puede completar en peso usando cualquiera de una variedad de vehículos y/o aglutinantes. En un aspecto, los vehículos son materiales secos a base de sólidos para formulaciones en comprimidos, gránulos o en forma de polvos, y pueden ser materiales a base de líquido o gel para formulaciones en formas líquidas o de gel. Los vehículos típicos para las formulaciones secas incluyen trehalosa, maltodextrina, harina de arroz, celulosa microcristalina (CMC), estearato de magnesio, inositol, FOS, gluco-oligosacáridos (GOS), dextrosa, sacarosa, y vehículos similares. Otras formulaciones de composición ejemplares incluyen una píldora, una cápsula, o una suspensión.

Los compuestos químicos usados en la presente composición se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen Spectrum Quality Products, Inc (Gardena, CA), Seltzer Chemicals, Inc., (Carlsbad, CA) y Jarchem Industries, Inc., (Newark, NJ).

Tal como se describe en detalle a continuación, las células vegetativas o esporas de *Bacillus coagulans*, el sobrenadante de *Bacillus coagulans*, y los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* de la invención son útiles en la mejora de la respuesta inmunitaria. La mejora de la respuesta inmunitaria comprende un aumento en la producción de citocina (por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  o IFN- $\gamma$ ) o un aumento en la migración de células inmunitarias al lugar de la infección. La mejora del sistema inmunitario también incluye el refuerzo del sistema inmunitario mediante el aumento de la producción de citocina, la activación del aspecto de la vigilancia inmunitaria de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), el aumento de la quimiotaxis de células inmunitarias, la activación de células NK y/o el aumento de la fagocitosis de los monocitos.

#### **Ejemplo 1. Preparación de cultivos de *Bacillus coagulans***

La bacteria Hammer de *Bacillus coagulans* (N.º de referencia ATCC 31284) se inoculó y creció hasta una densidad celular de aproximadamente  $10^8$  a  $10^9$  células/ml en caldo nutritivo que contiene 5 g de peptona, 3 g de extracto de carne, 10-30 mg de  $MnSO_4$ , y 1.000 ml de agua destilada, ajustada a pH 7.0, usando un recipiente de fermentación con puente aéreo convencional a 30 °C. El intervalo de  $MnSO_4$  aceptable para la esporulación es de 1 mg/l a 1 g/l. Las células vegetativas pueden reproducirse de manera activa hasta los 45 °C, y las esporas son estables hasta los 90 °C. Tras la fermentación, las células bacterianas o las esporas de *B. coagulans* se recogen usando procedimientos convencionales (por ejemplo, filtración, centrifugación) y las células y esporas recogidas se pueden liofilizar, secar mediante pulverización, secar al aire o congelar. Tal como se describe en el presente documento, el sobrenadante del cultivo celular se recoge y se usa como fuente de agentes extracelulares secretados por *B. coagulans*.

Un rendimiento típico del cultivo anterior está en el intervalo de aproximadamente  $10^9$  a  $10^{10}$  esporas viables y más típicamente de aproximadamente 100 a 150 mil millones de células/esporas por gramo antes del secado. Las esporas mantienen al menos el 90 % de viabilidad tras el secado cuando se almacenan a temperatura ambiente durante hasta diez años, y por tanto, la vida útil de una composición que contiene esporas Hammer de *B. coagulans* a temperatura ambiente es de aproximadamente 10 años.

#### **Ejemplo 2. Preparación de esporas de *Bacillus coagulans***

Se preparó un cultivo de esporas secas de *B. coagulans* tal como sigue. Se inocularon diez millones de esporas en un cultivo de un litro que contiene 24 g de caldo de dextrosa de patata, 10 g de tejido de aves y peces digerido con enzimas, 5 g de FOS y 10 g de  $MnSO_4$ . El cultivo se mantuvo durante 72 horas en un ambiente alto en oxígeno a 37 °C para producir que el cultivo tenga aproximadamente 150 mil millones de células por gramo de cultivo. A continuación, se filtró el cultivo para retirar el líquido del medio de cultivo, y el sedimento bacteriano se resuspendió en agua y se liofilizó. El polvo liofilizado se muele después hasta un polvo fino usando las buenas prácticas de fabricación (GMP, del inglés *good manufacturing practice*) convencionales.

**Ejemplo 3. Efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios de BC<sup>30</sup> in vitro**

*Bacillus coagulans* (BC) es un bacilo gram positivo que forma esporas resistentes al calor y al ácido. El consumo oral de esporas o de esporas encapsuladas permite la colonización transitoria del intestino con cultivos de BC. Las esporas germinan y los cultivos bacterianos crecen y fermentan el alimento en el lumen del intestino.

5 La activación del sistema inmunitario se indujo en cultivos de células inmunitarias humanas cuando se exponen a a) sobrenadante de cultivo purificado de *Bacillus coagulans* (BC1), o b) componentes de pared celular purificados de *Bacillus coagulans* (BC2). Estas dos fracciones se utilizaron para caracterizar las interacciones *in vivo* las interacciones entre *Bacillus coagulans* y las células inmunitarias, por ejemplo, la Lámina Propia o las Placas de Peyer localizadas en el lumen del intestino. El sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) y los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) se ensayaron en paralelo usando un panel de ensayos *in vitro* basados en células.

15 Se descubrió que *Bacillus coagulans* afecta de manera positiva a las células inmunitarias en el intestino: 1) se descubrió que los factores bacterianos secretados afectan/modulan la función del tejido inmunológico; y 2) la interacción de componentes de pared celular bacteriana con receptores de superficie de células inmunitarias de tipo Toll y otros llevaron a la modulación de la función de células inmunitarias. Las paredes celulares de BC contienen componentes únicos que interactúan con células inmunitarias de tal manera que activan o refuerzan el sistema inmunitario. BC también secreta metabolitos y/u otros factores que se producen cuando BC crece en el ambiente del intestino delgado. Tales metabolitos/factores incluyen, pero no se limitan a compuestos antioxidantes y antiinflamatorios.

**20 División de pared bacteriana**

Se activó por calor una muestra de esporas de *Bacillus coagulans* a 50 °C y se inoculó en medio líquido. La muestra se incubó a 37 °C durante 24 horas. Este período de tiempo permite la formación de un cultivo bacteriano de fase logarítmica cuando la muerte y la ruptura bacteriana no es prominente. Después de la incubación, se prepararon las dos fracciones (sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) y componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2). La separación inicial tuvo lugar mediante decantación del cultivo completo en un frasco de 50 ml seguido de centrifugación a 2400 rpm. Esto dio como resultado la formación de un sedimento bacteriano. El sobrenadante se decantó de manera suave en un nuevo frasco. Desde este frasco, se metieron alícuotas más pequeñas de 1 ml en tubos Eppendorf y se sometieron a centrifugación de alta velocidad, seguido de dos filtraciones seriadas con un filtro de 0,2 µm, para eliminar cualquier bacteria intacta y fracciones de la misma. Se tomaron alícuotas del sobrenadante estéril filtrado y se congelaron varias alícuotas y se almacenaron a -20 °C. Para ensayos biológicos posteriores, se descongeló una alícuota por cada día de ensayo.

35 El sedimento original de la centrifugación inicial se usó para preparar la fracción de pared celular. El sedimento húmedo se congeló y descongeló varias veces para abrir por rotura las paredes bacterianas, de manera que los componentes intracelulares se pudiesen retirar mediante lavado. El fango descongelado se transfirió a tubos Eppendorf y se lavó dos veces en solución salina usando centrifugación de alta velocidad. Después se transfirió el sedimento a un frasco de cristal y se sometió a molienda con perlas usando perlas de circonio unidas a bajas proteínas con un diámetro de 200 micrómetros. La molienda se realizó mediante pulsaciones repetidas usando un mezclador Vortex. Este procedimiento es eficaz para romper las paredes celulares. Las perlas se retiraron y el fango que contiene los fragmentos de pared celular rota se filtraron de manera estéril en múltiples alícuotas que se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -20 °C. Para ensayos posteriores, se descongeló una alícuota por cada día de ensayo.

**Purificación de células mononucleares y polimorfonucleares de sangre periférica**

45 Los voluntarios humanos sanos entre las edades de 20 y 50 años sirvieron como donantes de sangre tras el consentimiento informado, según lo aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Centro Médico de Sky Lakes (FWA 2603). Las muestras de sangre venosa periférica se extrajeron recientemente en heparina sódica sobre un doble gradiente de Histopaque 1119 y 1077, y se centrifugaron durante 25 minutos a 2400 revoluciones por minuto (rpm). La interfase superior, rica en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) e inferior, de polimorfonucleares (PMN), se recogieron usando pipetas estériles de transferencia a nuevos frascos, y se lavaron dos veces con 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio o magnesio mediante centrifugación a 2400 rpm durante 10 minutos.

**Ensayo de fagocitosis**

55 La evaluación de la actividad fagocítica se realizó usando células PMN. La elección de partículas para fagocitosis fue de fluoroesferas carboxiladas (Molecular Probes, Eugene OR). Se retiró una alícuota de 0,05 ml de Fluorobeads de la botella del reservorio y se metieron en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml y se lavaron dos veces en PBS. Las Fluorobeads se resuspendieron después en 7,5 ml de RPMI 1640. Las células PMN se colocaron en placas de 96 pocillos en RPMI-1640 a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/ml. Se añadieron diez microlitros de diluciones seriadas 10 veces de BC1 o BC2 a los pocillos de ensayo por cuadruplicado, y se añadió PBS a los pocillos de control por cuadruplicado. La placa se centrifugó de manera inmediata, y se retiró el sobrenadante. Las células se

resuspendieron en RPMI-1640 que contiene Fluorobeads, y después se incubaron durante 2 minutos con fluoroesferas con pipeteo continuo. La actividad fagocítica se detuvo añadiendo PBS con azida sódica al 0,02 %. Las células se lavaron dos veces en PBS con azida sódica para retirar las perlas no ingeridas por las células. Las muestras se transfirieron en frascos para citometría de flujo, asegurando la presencia continua de azida sódica. Las muestras se adquirieron de manera inmediata por citometría de flujo (FacsCalibur, Becton-Dickinson San Jose, CA). El análisis se realizó usando el software FlowJo (TreeStar Inc., Ashland OR). Durante el análisis, se realizó la sincronización electrónica para la población de PMN usando las propiedades de dispersión hacia delante y lateral. La cantidad relativa de fagocitosis en la población de PMN en cada muestra se evaluó por la intensidad de fluorescencia media (IFM) para la fluorescencia verde. La IFM (verde) para las muestras sin tratar mostró la cantidad relativa de fagocitosis en ausencia de BC1 y BC2. La IFM (verde) para las muestras tratadas con BC1 y BC2 se compararon con muestras sin tratar.

#### Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante células PMN

Las muestras en paralelo de células PMN se incubaron a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 20 minutos, tanto sin tratar como con productos de ensayo durante un intervalo de diluciones seriadas 10 veces (1:10, 1:100, 1:1000). El colorante precursor diacetato de fluoresceína (DCF-DA), que se vuelve verde intenso fluorescente tras la exposición con radicales libres, se preparó mediante la adición de 0,18 ml de DMSO a una alícuota de 0,05 mg de DCF-DA. Se preparó después una solución de trabajo de DCF-DA mediante la adición de 0,01 ml del reservorio a 10 ml de PBS. Las células PMN se lavaron tres veces con PBS y después se resuspendieron en solución de trabajo DCF-DA y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Todas las muestras, excepto las muestras de control sin tratar, se expusieron después a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 167 mM durante un período de 45 minutos para inducir la producción de ROS. Las muestras se lavaron dos veces con PBS para retirar el peróxido, y se transfirieron a frascos para citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia de DCF-DA en células sin tratar frente a las células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se analizó mediante citometría de flujo. Los datos se recogieron por cuadruplicado para los controles, y por duplicado para cada dosis de Bc1 y BC2. La cantidad relativa de formación de ROS en células PMN se evaluó mediante intensidad de fluorescencia verde.

#### Migración aleatoria de célula PMN y migración quimiotáctica hacia tres quimioatrayentes: f-MLP, IL-8 y Leucotrieno B

La célula PMN es un tipo celular altamente activo y migratorio (Figura 3). Se ensayó el efecto diferencial en la migración de la célula PMN hacia el péptido bacteriano formil-Met-Leu-Phe (f-MLP) y dos quimioatrayentes inflamatorios diferentes, IL-8 y Leucotrieno B4 (LTB4). El siguiente modelo experimental se realizó por cuadruplicado con el fin de obtener significación de datos. Las células se incubaron con diluciones seriadas 10 veces de sobrenadante GBI-30 (GanedenBC<sup>30™</sup>) o fracciones de pared celular durante 10 minutos en un tubo de poliestireno de fondo redondeado antes de que comenzase la colocación en placa. Durante este período, la placa de migración transpocillo Millipore (tamaño de poro de 3,0 µm) se recubrió con 50 µg/ml de fibronectina durante un período de 30 minutos. Los quimioatrayentes y RPMI 1640 se añadieron después a los pocillos apropiados de la cámara inferior de la placa de migración transpocillo en un volumen de 150 µl: f-MLP (10 nM), interleucina-8 (10 µg/ml), y leucotrieno B4 (10 nM). La fibronectina se retiró de los pocillos superiores mediante aspiración antes de poner las células en la placa. Se colocaron cincuenta microlitros de células (1x10<sup>6</sup>/ml) en las cámaras superiores, y la placa de la cámara superior se bajó después a la placa inferior y se dejó incubar toda la noche a 37 °C. La cuantificación de la cantidad relativa de células migradas se realizó mediante tinción fluorescente con CyQuant® de las células que se habían acumulado en las cámaras inferiores. La intensidad de fluorescencia se cuantificó en un lector de placa de fluorescencia Tecan Spectrafluor.

#### Externalización de Cd107 en células NK en respuesta a células tumorales K562

Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) recién purificadas y resuspendidas en RPMI 1640 se usaron para el presente ensayo. Las células se colocaron a razón de 2 x 10<sup>5</sup>/pocillo en placas de microensayo de 96 pocillos con fondo redondo, y se trataron con soluciones seriadas de los productos de ensayo por triplicado. Los pocillos de control negativo por triplicado se dejaron sin tratar. Además, 3 pocillos que contienen solo PBMC y solo células K562 sirvieron como controles negativos para el valor inicial de la expresión de CD107a. 1 x 10<sup>6</sup> células K562, una línea de células tumorales sensible a células NK y ampliamente usada en estudios de citotoxicidad de células NK, se añadieron a pocillos que contienen PBMC con producto y PBMC sin tratar. Los dos tipos celulares sedimentaron poco mediante una breve centrifugación de 30 segundos a 2400 rpm tras la incubación a 37 °C durante 45 minutos. Las células se transfirieron a placas de microtitulación de fondo en V para el procesamiento y la tinción. Las células se tiñeron con CD3-PerCP, CD56-PE y CD107a-FITC. La expresión de CD107a en las células NK se determinó mediante citometría de flujo. Las células NK negativas en CD3, positivas en CD56 se diferenciaron de las células K562 basándose en las propiedades de dispersión hacia delante y lateral, y de otros linfocitos mediante sincronización electrónica en células CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>, seguido de evaluación de intensidad de fluorescencia de CD107a.

#### Inducción de marcadores de linfocitos citolíticos naturales e inmunotinción

Las PBMC recién aisladas se colocaron en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo en U (NUNC, Dinamarca) y se trataron con diluciones seriadas de productos de ensayo. Para la activación de linfocitos citolíticos naturales (NK, del

inglés, *natural killer*) y linfocitos T citolíticos naturales (NKT), el tiempo de incubación fue de 18 horas. Las células se transfirieron a placas de 96 pocillos con fondo en V (NUNC Dinamarca) y se lavaron con tampón IF (PBS que contiene albúmina de suero bovino al 1 % y azida sódica al 0,02 %). Las células se resuspendieron en 0,05 ml de tampón IF y se añadieron anticuerpos monoclonales en cantidades óptimas previamente establecidas (CD3-PerCP, CD56-PE, CD69-FITC, y CD25-FITC: 8 µl/muestra), y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células se lavaron dos veces con 0,15 ml adicionales de PBS con azida al 0,02 %. Tras la centrifugación y aspiración del sobrenadante, las células se resuspendieron en 0,05 ml de PBS con azida al 0,02 % y se transfirieron a tubos de poliestireno de 5 ml con fondo redondo que contienen cada uno 0,4 ml de formalina al 1 %. Las muestras se almacenaron en la oscuridad y se obtuvieron mediante citometría de flujo en 24 horas usando un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose CA). El análisis se realizó usando el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland OR).

#### Modulación de la proliferación y de la producción de citocina en respuesta a PHA y PWM

Las PBMC recién purificadas y resuspendidas en RPMI 1640 y suplementadas con suero fetal de ternera al 10 %, L-glutamina (5 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 mg/ml) se colocaron en una placa de cultivo celular con fondo en U en un volumen de 180 µl a una concentración de  $1 \times 10^6$ /ml. A continuación, se añadieron diez microlitros de diluciones seriadas 10 veces de BC1 o BC2 a los pocillos individuales por triplicado. En un conjunto paralelo de pocillos, se ensayó el efecto combinatorio de BC1 y BC2 con mitógenos conocidos. Los mitógenos se añadieron a una concentración de 5 µl de PWM (200 µg/ml) y 4 µl de PHA (2 µg/ml) para iniciar la proliferación. La placa se selló con parafilm y se incubó a 37 °C, con CO<sub>2</sub> al 5 % durante 5 días. Tras 5 días, las células se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano y negro y los números relativos de células en cada pocillo de cultivo se cuantificaron mediante tinción con CyQuant® y un lector de placa fluorescente Tecan Spectrafluor.

#### Matriz de perlas de citocina

Los sobrenadantes de los cultivos de proliferación de linfocitos de 5 días se recogieron y se midieron los niveles relativos de las 6 citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α y IFN-γ se midieron usando un kit de matriz de perlas basado en citometría de flujo (kit II CBA de citocina humana Th1/Th2, BD Biosciences, San Jose, CA). Las muestras se ensayaron por duplicado de acuerdo con las especificaciones del fabricante, y los datos se adquirieron de manera inmediata mediante citometría de flujo, usando un citómetro de flujo FacsCalibur (Becton-Dickinson San Jose, CA). El análisis se realizó usando el software FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, OR).

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico implicó comparaciones simples entre dos valores medios, y se realizó usando Microsoft Excel. La significación estadística se ensayó usando el test de la t de Student con un p-valor de menos de 0,05, indicando una diferencia estadísticamente significativa entre dos conjuntos de datos.

#### Mecanismos de defensa antibacteriana

Tal como se describe en detalle a continuación, el sobrenadante de *Bacillus coagulans* indujo fagocitosis en las dosis más altas ensayadas, en ambas células PMN (glóbulos blancos (WBC, del inglés *white blood cell*) polimorfonucleares) y monocitos (Figuras 34-35). Tanto el sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) como los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) indujeron una migración aleatoria de células PMN, es decir, su actividad de captación de bacterias invasoras (parte de la vigilancia inmunitaria normal). Ambas fracciones, pero especialmente el sobrenadante, indujeron la migración de células PMN hacia un péptido bacteriano f-MLP, indicando que el GanedenBC30™ de *Bacillus coagulans* mejoró el "ataque" de PMN cuando se simuló una invasión bacteriana. Ambas fracciones, pero especialmente el sobrenadante, también mejoraron la migración de las PMN cuando las fracciones de GanedenBC30™ de *Bacillus coagulans* se mezclaron junto con f-MLP, es decir, para simular una situación *in vivo* en la que el GanedenBC30™ de *Bacillus coagulans* coexiste con bacterias potencialmente patógenas en el lumen del intestino.

#### Mecanismos de defensa antivíricos y anticancerígenos

Las células NK son importantes en la defensa frente a células cancerosas y virus. Tanto el sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) como los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) activaron los linfocitos citolíticos naturales (NK, de *Natural Killer*). Ambas fracciones mejoraron la secreción agresiva de sustancias nocivas de las células NK cuando las células NK posteriormente se pusieron en contacto con células tumorales.

#### Efectos antiinflamatorios

El sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) y los componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) tienen efectos antiinflamatorios. Las fracciones GBI-30 de *Bacillus coagulans* (GanedenBC30™) se introdujeron en células PMN a dosis muy bajas. Las células PMN se prepararon después para que migrasen hacia el mediador inflamatorio, Leucotrieno B4. Este ensayo simula el papel de las células PMN en el mantenimiento de una cascada inflamatoria. Ganeden BC30™ mantiene o inhibe la migración de las células PMN inflamatorias, dependiendo de si la célula PMN entra en vigilancia inmunitaria normal o de si entra en una respuesta inflamatoria.

**Ejemplo 4. Efecto de *Bacillus coagulans* en la activación de fagocitos**

Para cada una de las figuras descritas en el Ejemplo 4, las diluciones en el eje X se refieren a la dilución ensayada de cada fracción de *Bacillus coagulans* (BC). Por ejemplo, una dilución 1:100 es una dilución de 100 veces la solución madre inicial congelada.

5 Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Muchos productos naturales reducen la formación de especies reactivas de oxígeno en células inflamatorias. Sin embargo, otros productos aumentan la formación de ROS, indicando una inducción de mecanismos de defensa antimicrobianos. Las células polimorfonucleares humanas (PMN) se usaron para ensayar la producción de ROS. Este tipo celular constituye aproximadamente el 70 % de los glóbulos blancos en seres humanos. PMN produce altas cantidades de ROS tras determinados estímulos inflamatorios.

Las PMN recién purificadas se expusieron a diluciones seriadas de los dos productos de ensayo, sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) y componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) en paralelo. Durante la incubación con productos de ensayo, cualquier compuesto antioxidante capaz de atravesar la membrana celular puede entrar al interior de las células PMN. Las células se lavaron y se cargaron con el colorante DCF-DA, que fluoresce tras la exposición con especies reactivas de oxígeno. La oxidación se activó mediante la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La intensidad de fluorescencia de las células PMN se evaluó mediante citometría de flujo. La baja intensidad de fluorescencia de células control sin tratar sirvió como un valor inicial, mientras que las células PMN tratadas solo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sirvió como un control positivo.

Si la intensidad de fluorescencia de las células PMN expuestas a *Bacillus coagulans*, y posteriormente expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es reducida en comparación con la exposición solo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el producto de ensayo tiene efectos antiinflamatorios. Por el contrario, si la intensidad de fluorescencia de células PMN expuestas a un producto de ensayo es elevada en comparación con la exposición solo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un producto de ensayo tiene efectos proinflamatorios.

Tal como se muestra en la Figura 1, la célula PMN es capaz de señalar por mecanismos anti y proinflamatorios, que pueden llevar bien a la mejora o a la reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Tanto BC1 como BC2 mostraron una clara inhibición de la formación espontánea de especies reactivas de oxígeno en células PMN. El efecto de BC2 mostró una inhibición de la formación de ROS dependiente de la dosis, mientras que el efecto de BC1 mostró un efecto antiinflamatorio más fuerte en las dosis más bajas ensayadas. BC1 y BC2 presentaron prácticamente un 25 % de inhibición del valor inicial de formación de ROS con la dilución más alta de 1:1000. La presencia de BC1 (1:1000) redujo la formación espontánea de ROS al 22 % (P<0,003). BC2 (1:1000) presentó un efecto similar en la disminución de la formación de ROS (P<0,004). Sin embargo, con la dilución 1:10 de BC2, este efecto fue incluso más fuerte, dando como resultado una reducción del 38 % en la formación espontánea de ROS (P<0,0002). La inhibición fue altamente significativa (P<0,01) para todas las diluciones de BC2, y para la dilución 1:1000 de BC1. La dilución 1:100 de BC1 estuvo cerca de ser altamente significativa (P=0,0137).

Tal como se muestra en la Figura 2, cuando las células se trataron con BC1 y BC2 y después se expusieron a estrés oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), las células mostraron una producción reducida de ROS comparada con el control negativo. La inhibición permaneció a una tasa constante del 16-23 %. Estas inhibiciones fueron estadísticamente significativas (P<0,05) para ambas fracciones en todas las diluciones excepto BC2 a 1:1000 (P=0,0539). Ambas fracciones mostraron una inhibición altamente significativa de la producción de ROS en la dilución de 1:1000. BC1 (1:100) redujo la formación de ROS al 23 % (P<0,02) mientras que BC2 (1:100) redujo la formación de ROS al 21 % (P<0,008).

Efecto diferencial en la migración aleatoria de célula PMN y migración quimiotáctica hacia tres quimioatrayentes: f-MLP, IL-8, y leucotrieno B4 (LTB-4)

La célula PMN es un tipo celular altamente activo y migratorio que juega un papel principal en la vigilancia inmunitaria. El comportamiento migratorio de las PMN se divide en al menos dos tipos: a) migración aleatoria y b) migración dirigida. La migración aleatoria es parte de la vigilancia inmunitaria normal, mientras que la migración dirigida es una migración hacia quimioatrayentes específicos.

Tanto la migración aleatoria como la migración dirigida se ensayaron en paralelo. Se examinó la migración dirigida hacia los siguientes compuestos quimiotácticos diferentes de manera distinta: i) péptido bacteriano f-Met-Leu-Phe (fM-LP); ii) la citocina inflamatoria interleucina-8 (IL-8); y iii) leucotrieno B4 (LTB4).

Algunos productos de ensayo pueden reducir de manera específica la migración dirigida de las PMN hacia los mediadores inflamatorios IL-8 y/o LTB4, mientras permiten la migración de las PMN hacia los péptidos bacterianos como parte de la defensa inmunitaria antibacteriana normal. El ensayo de la migración hacia varios quimioatrayentes inflamatorios ayuda a identificar las respuestas selectivas en este sistema *in vitro*, que simula muy de cerca el modelo de inflamación *in vivo* de edema de pata de rata. El ensayo permite la diferenciación entre mecanismos de defensa inmunitaria antibacterianos y mecanismos de respuesta de inflamación.

Las células PMN recién purificadas se cultivaron en placas de migración de doble cámara, la cámara inferior simulando un tejido, y la cámara superior simulando el torrente sanguíneo (Figura 3). Las células se colocaron en las cámaras superiores con o son productos de ensayo, mientras que se colocaron diferentes quimioatrayentes en las cámaras inferiores. Para los pocillos de control, las células se colocaron en la cámara superior sin un producto de ensayo y el quimioatrayente no se colocó en los pocillos inferiores. De este modo, se determinó la evaluación del valor inicial de la migración aleatoria. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y se repitieron al menos 3 veces con resultados consistentes usando células recién aisladas de tres donantes humanos sanos diferentes.

El sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) se ensayó con una dilución extra, en comparación con los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2). Ambas fracciones de GenedenBC<sup>30</sup>™ (*Bacillus coagulans*) indujeron la migración aleatoria de células PMN, indicando que tanto el sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) como los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) activaron el aspecto de la vigilancia inmunitaria de las células PMN (Figura 4). BC1 (1:10) aumentó la migración aleatoria al 300 % ( $p < 0,001$ ), y BC2 (1:10) aumentó la migración aleatoria al 200 % ( $p < 0,005$ ). Las dosis más altas de BC1 y BC2 aumentaron la migración hacia el péptido bacteriano f-MLP, indicando que el sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) y los componentes de la pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) indujeron mecanismos de defensa antibacteriana (Figura 5).

Sorprendentemente, a concentraciones más diluidas, BC1 y BC2 disminuyeron la cantidad de migración dirigida a f-MLP, indicando que diferentes niveles de *Bacillus coagulans* tienen diferentes efectos en las células inmunitarias en el intestino. BC1 (1:10.000) disminuyó la migración dirigida a f-MLP al 11 %; sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo, y BC (1:1000) disminuyó la migración dirigida a f-MLP al 46 % ( $P < 0,005$ ).

El tratamiento de células PMN con altas dosis de BC1 y BC2 mejoró la migración dirigida a IL-8 (Figura 6A). Esta migración aumentada fue altamente significativa en la dilución 1:10 tanto para BC1 ( $P < 0,002$ ) como para BC2 ( $P < 0,002$ ). Por el contrario, las dosis menores de BC1 y BC2 redujeron la migración dirigida a IL-8. En la dilución 1:1000 de BC2, se vio un descenso del 65 % en la migración que estadísticamente fue altamente significativo ( $P < 0,00001$ ).

Se realizó un estudio de dosis sobre migración de PMN dirigidas a IL-8 con muchas menos dosis de BC1 y BC2. Tal como se muestra en la Figura 6B, se demostró una reducción de la migración de PMN dirigida a IL-8 en todas las diluciones de BC2. Este efecto de BC2 fue más fuerte en la dilución  $10^{10}$ , en la que la migración se inhibió al 63 % ( $p < 0,02$ ). El tratamiento con BC1 de células PMN a bajas dosis también redujo la migración dirigida a IL-8. Se ha visto un patrón interesante de inhibición de la migración de las PMN dirigida a IL-8 tanto en BC1 como en BC2. Ningún producto demostró una curva de dosis lineal, sino que las dosis intermedias ( $10^4$  a  $10^8$ ) de BC1 y BC2 mostraron menos inhibición de migración dirigida a IL-8 en comparación con dosis más altas o más bajas. Estos resultados indican que los compuestos pro y antiinflamatorios probablemente coexisten tanto en el sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) como en los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2).

Tanto las fracciones de BC1 como de BC2 también tuvieron un efecto dual en la migración de las PMN dirigida a LTB4. A dosis más bajas, tanto BC1 como BC2 demostraron una reducción dependiente de la dosis en la migración de las PMN hacia LTB4 (Figura 7). La dilución 1:1000 de BC2 inhibió la migración al 52 % ( $p < 0,002$ ). Las células tratadas con diluciones 1:1000 ( $p < 0,008$ ) y 1:10000 ( $p < 0,002$ ) de BC1 también mostraron un efecto antiinflamatorio que estadísticamente fue altamente significativo. Por el contrario, la dilución 1:10 de BC1 dio como resultado un aumento significativo en la migración de las PMN hacia LRB4 ( $p < 0,003$ ).

#### Efecto quimioatrayente en la migración de células PMN

Se examinó el efecto sinérgico de los siguientes tres quimioatrayentes: f-MLP bacteriana, IL-8, y leucotrieno B4 (Figura 8). Este ensayo prueba las propiedades migratorias de las células PMN, usando los mismos parámetros que se describen anteriormente; sin embargo, las fracciones de BC no se aplicaron a la cámara superior con las células, sino que se colocaron en la cámara inferior, proporcionado de este modo un gradiente quimiotáctico. Si los productos de ensayo contenían compuestos quimioatrayentes, entonces la migración de las células PMN desde la cámara superior hasta la inferior aumento en comparación con los pocillos sin tratar.

En un grupo, las fracciones de BC se añadieron a las cámaras inferiores y se midieron las propiedades directas de los quimioatrayentes de las fracciones de BC. En otro grupo, las fracciones de BC se colocaron en las cámaras inferiores en combinación con cada uno de los siguientes quimioatrayentes: f-MLP bacteriano, IL-8 y leucotrieno B4 con el fin de examinar los efectos sinérgicos sobre la migración de las PMN en presencia de fracciones de BC y un quimioatrayente conocido.

Las dos fracciones de *Bacillus coagulans* tienen efectos variables a pesar de que vienen de los mismos cultivos bacterianos (Figura 8). Las dosis mayores de sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) tuvieron un efecto quimiotáctico fuerte, mientras que los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) no mostraron ningún efecto quimiotáctico, incluso en las dosis más altas. Por el contrario, BC1 disminuyó la cantidad de migración, indicando que BC1 tiene un efecto antiinflamatorio.

Tal como se muestra en la Figura 9, las dos fracciones de *Bacillus coagulans* tuvieron efectos muy diferentes en la

migración dirigida a f-MLP. Las dosis mayores de BC1 mejoraron la actividad dirigida a f-MLP. El efecto quimioatrayente de BC1 (1:10) aumentó la migración al 55 % ( $P < 0,01$ ). A excepción de la dosis más alta de BC2, esta fracción redujo la migración hacia f-MLP. La interacción de células PMN con BC2 hizo a las células mucho menos sensibles a f-MLP. Las células tratadas con BC2 (1:1000) inhibieron la migración al 52 % ( $P < 0,001$ ).

5 Tal como se muestra en la Figura 10, las dos fracciones de *Bacillus coagulans* tuvieron efectos muy diferentes en la migración dirigida a IL-8. Todas las dosis de BC1 mejoraron la actividad migratoria dirigida a IL-8. El efecto quimioatrayente de BC1 (1:10) fue estadísticamente significativo ( $P < 0,00001$ ). BC2 tuvo un efecto dual. A mayores dosis, BC2 mejoró la migración inducida por IL-8. Sin embargo, a la dosis más baja ensayada, esta fracción redujo la migración hacia IL-8. La interacción de células PMN con BC2 hizo a las células mucho menos sensibles a IL-8. Las células tratadas con BC2 (1:1000) inhibieron la migración al 49 % ( $P < 0,004$ ).

Tal como se muestra en la Figura 11, las dos fracciones de *Bacillus coagulans* también tuvieron efectos muy diferentes en la migración dirigida a LTB4. Todas las dosis de BC1 mejoraron la actividad migratoria dirigida a LTB4. El efecto quimioatrayente de BC1 (1:10) fue estadísticamente significativo ( $P < 0,002$ ).

15 BC2 tuvo un efecto dual. Con dosis mayor, mejoró la migración inducida por LTB4. Sin embargo, a la dosis 1:100, esta fracción redujo la migración hacia LTB4. La interacción de células PMN con BC2 hizo a las células menos sensibles a LTB4. Las células tratadas con BC2 (1:100) inhibieron la migración al 11% ( $P < 0,01$ ).

#### Efecto en la actividad fagocítica de macrófagos

20 La fagocitosis de partículas microbianas es una parte importante de la respuesta inmunitaria innata. Es un proceso rápido, y el efecto de un producto de ensayo en la mejora de esta función celular puede ser casi inmediato. La fagocitosis se midió por el grado de penetración de las células PMN en las fluoroesferas carboxiladas fluorescentes verdes. La intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células fagocíticas se evaluó después mediante citometría de flujo. Las células mononucleares de sangre periférica recién purificadas se pretrataron bien con sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o bien con componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2) durante 3 minutos, y después se introducen en micropartículas fluorescentes que imitan las bacterias. Se dejó que las células ingiriesen partículas durante 2 minutos, tras los cuales se retiraron micropartículas libres mediante centrifugación. La intensidad de fluorescencia de los fagocitos se evaluó después mediante citometría de flujo. La sincronización electrónica se realizó en la población de monocitos, y el análisis se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia media (IFM FL3). Una tasa de fagocitosis más rápida o más fuerte da como resultado un número mayor de micropartículas fluorescentes por célula.

30 Tal como se muestra en la Figura 12, BC1 en la dilución de 1:10 aumentó la fagocitosis de monocitos. Este aumento del 28 % fue altamente significativo ( $P < 0,01$ ). Tal como se muestra en la Figura 13, BC1 y BC2 aumentaron la fagocitosis en células PMN en comparación con los controles negativos. La exposición de células PMN a BC1 en la dilución 1:10 aumentó la fagocitosis al 40 % ( $p < 0,02$ ). La exposición de células PMN a BC2 en la dilución 1:10 aumentó la fagocitosis al 25 % ( $p < 0,008$ ). las diluciones adicionales de ambos productos dieron como resultado una fagocitosis de PMN reducida ( $p < 0,05$ ).

40 Las imágenes en las Figuras 30A y 30B representan fotografías tomadas desde un microscopio de fluorescencia. El control muestra una célula PMN sin tratar que ha participado en la fagocitosis (Figura 30A). Las perlas verdes son fluoroesferas carboxiladas que simulan partículas bacterianas. La Figura 30B muestra una célula PMN que se ha tratado con BC2. Esta célula ha ingerido muchas más fluoroesferas que la célula sin tratar en la Figura 30A. Esta figura, en combinación con los datos anteriores, indica que *Bacillus coagulans* aumenta la capacidad de los fagocitos para engullir material extraño.

#### **Ejemplo 5. Activación de células NK**

45 Los linfocitos citolíticos naturales (NK) están implicados en los mecanismos de defensa primaria frente a células y virus transformados. Estas células viajan en el torrente sanguíneo en un estado residual, pero se pueden activar inmediatamente para a) matar células cancerosas mediante contacto o secreción de compuestos citotóxicos tales como perforina y granzima, b) proliferar, y c) secretar sustancias que atraen a otras células al lugar. Con el fin de investigar un posible efecto de BC1 y BC2 en la activación de células NK, se examinaron los cambios en la expresión del marcador CD69 de superficie celular de activación de NK. La expresión aumentada de este marcador se ha asociado con una actividad citotóxica aumentada de células NK (Clausen y col., 2003 Immunobiol, 207(2):85-50 93).

55 Las células mononucleares de sangre periférica recién purificadas se usaron para estos ensayos. Las células se colocaron en placas de microensayo de 96 pocillos por triplicado. Los pocillos de control negativo por triplicado se dejaron sin tratar. Los controles positivos se trataron con IL-2 a una dosis de 100 unidades internacionales por ml (UI/ml). Tras 18 horas de cultivo, las células se tiñeron para la molécula de activación CD69 y el receptor de factor de crecimiento CD25 en la superficie de células NK negativas en CD3, positivas en CD56, y en linfocitos NKT positivos en CD3, positivos en CD56 para evaluar la activación de células NK y/o NKT *in vitro*.

La Figura 14 representa el cambio en la intensidad de fluorescencia media del marcador de activación de NK CD69,

tras la exposición de células NK bien a sobrenadante de *Bacillus coagulans* (BC1) o a componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* (BC2). Tanto BC1 como BC2 mostraron una clara inducción dependiente de la dosis de la expresión de CD69 en células NK. El efecto alcanzó alta significación estadística tanto para BC1 como BC2 a una dilución de 1:400, en la que la expresión de CD69 aumentó al 32 % ( $p < 0,01$ ) para BC1, y al 36 % para BC2 ( $p < 0,003$ ).

La Figura 15 muestra la expresión de CD25 en células NKT. Tanto para BC1 como BC2, no hubo una gran diferencia en la expresión de CD25 en comparación con los niveles del valor inicial. Mientras que la dilución 1:100 de BC1 dio como resultado un aumento en la expresión, este cambio no alcanzó significación estadística. No se observaron cambios en la expresión de CD25 en linfocitos T cuando se compararon células sin tratar con las tratadas con BC1 o con BC2.

#### Externalización de CD107a en células NK en respuesta a células tumorales

Una de las funciones de las células NK es eliminar células tumorales y células infectadas por virus mediante contacto entre células y por secreción de sustancias tales como perforina. Durante este procedimiento, el receptor CD107a expresado en el interior de gránulos en el citoplasma de las células NK se lleva de manera transitoria a la superficie celular. De este modo, la expresión de CD107a en células NK es una medida de su actividad citotóxica mediante secreción de sustancias citotóxicas.

Las células mononucleares de sangre periférica recién purificadas se usaron para este ensayo. Las células se colocaron en placas de microensayo de 96 pocillos con fondo redondo, y se trataron con soluciones seriadas de los productos de ensayo por triplicado. Los pocillos de control negativo por triplicado se dejaron sin tratar. Todos los otros pocillos se usaron para la adición de una línea de células de tumor K562 sensibles a células NK, ampliamente usada en ensayos de citotoxicidad de células NK. Los pocillos de control positivo se dejaron sin añadir productos de ensayo. Todos los pocillos restantes se trataron con diluciones seriadas de productos de ensayo. Los dos tipos celulares se llevaron físicamente juntos mediante una breve centrifugación de 15 segundos, y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C. Las células se transfirieron a placas de microtitulación de fondo en V para el procesamiento y la tinción. La expresión de CD107a en las células NK se analizó mediante citometría de flujo, en la que las células NK se diferenciaron de los otros linfocitos basándose en la tinción positiva para CD3 y CD56, y de las células K562 basándose en el tamaño. Se midió la actividad citotóxica de las células NK *in vitro*. La respuesta en este ensayo predice una respuesta similar a la de células no malignas infectadas por virus.

La Figura 16 muestra el cambio en la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la expresión de CD107a en linfocitos citolíticos naturales que se han expuesto a células tumorales, con o sin la adición de BC1 o BC2. Tanto BC1 como BC2 muestran un aumento intermedio en la expresión de CD107 en superficie celular, con BC2 teniendo el efecto más fuerte en la dilución 1:200; el efecto no alcanzó la significación estadística ( $p < 0,07$ ).

#### **Ejemplo 6. Mantenimiento de la función inmunitaria adaptativa: Modulación de la proliferación de linfocitos y producción de citocina en respuesta a dos mitógenos conocidos.**

Se realizaron una serie de ensayos para determinar si los productos de ensayo activarían reacciones inmunitarias exageradas. Como parte de un ensayo de seguridad convencional de productos naturales, se examinaron los productos de ensayo para potencial mitogénico, es decir, si inducen división celular en linfocitos humanos sanos. Simultáneo al ensayo de potencial mitogénico, los productos de ensayo se examinaron para determinar su efecto sobre las células responsables de la defensa inmunitaria adaptativa, es decir, linfocitos T y B. El ensayo de proliferación de linfocitos ofrece un procedimiento simple para evaluar si las composiciones alteran la sensibilidad de los linfocitos a señales conocidas. Un cambio en la respuesta proliferativa para mitógenos conocidos en presencia de una composición indica un efecto inmunomodulador, tal como señalización y activación de linfocitos T y B.

Las composiciones se ensayaron en diluciones seriadas en presencia y ausencia de mitógenos. Se ensayaron dos mitógenos en paralelo: fitohemaglutinina (PHA), que es un mitógeno de linfocitos T que inducirá la proliferación de linfocitos T, y mitógeno de hierba carmín (PWM), que es un mitógeno que requiere la colaboración de linfocitos T, linfocitos B y monocitos en el cultivo. La PHA es una señal más limpia, pero el PWM es una señal más fisiológica.

Las células mononucleares de sangre periférica humana recién purificada (PBMC) se cultivaron en ausencia frente a presencia de diluciones seriadas de las composiciones. Se establecieron tres conjuntos en paralelo, en los que uno ensayó el efecto directo del producto de ensayo en la proliferación de linfocitos, y los otros dos examinaron la interferencia de la composición en respuesta a los mitógenos conocidos. Los controles positivos incluyeron células tratadas solo con un mitógeno en ausencia de producto de ensayo. Un cambio (aumento, descenso) de la proliferación inducida por mitógenos es un gran indicativo de la presencia de compuestos inmunomoduladores.

Ni BC1 ni BC2 tuvieron un efecto mitogénico en la proliferación de linfocitos tras cinco días de incubación a 37 °C con producto y medio de cultivo.

Tanto BC1 como BC2 presentaron una reducción en la proliferación de linfocitos en presencia de PHA y PWM (Figuras 17 y 18). Esta reducción fue significativa en todas las dosis de BC1 en presencia tanto de PHA como de PWM ( $p < 0,02$ ) y fue significativa para las dos concentraciones más altas de BC2 ( $p < 0,02$ ). Asimismo, se alcanzó

una significación estadística alta para BC1 en las dosis de 1:10 ( $p<0,003$ ) y 1:100 ( $p<0,002$ ) y para BC2 en la dosis de 1:10 ( $p<0,004$ ) en presencia de PHA y BC1 en la dosis 1:100 ( $p<0,005$ ) y BC2 en las dosis de 1:10 ( $p<0,002$ ) y 1:100 ( $p<0,006$ ) en presencia de PWM.

#### Matriz citométrica de perlas

5 Se usó una matriz de perlas de citocina (CBA) Th1/Th2 basada en la citometría de flujo para las 6 citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  y INF- $\gamma$  se usó para evaluar los niveles de citocinas presentes en los sobrenadantes de cultivos de linfocitos de 5 días. En las Figuras 19-20, los cambios relativos en concentraciones de citocinas se presentan en primer lugar en gráficos globales que muestran cambios en las 6 citocinas a lo largo de las 3 diluciones del producto. Hay gráficos separados para BC1 y BC2 y los cambios se representan como factor de cambio desde el valor inicial (linfocitos cultivados sin producto).

10 Los linfocitos también se cultivaron (con o sin producto) en presencia de 2 mitógenos diferentes. La fitohemaglutinina (PHA) se usó para inducir la proliferación de linfocitos T, y el mitógeno de hierba carmín (PWM), se usó para inducir la proliferación de linfocitos T y B en un procedimiento que requiere la colaboración de linfocitos T, linfocitos B, y monocitos en el cultivo. Se hicieron comparaciones entre linfocitos cultivados sin presencia de producto y linfocitos cultivados en presencia de diluciones 1:100 bien de BC1 o de BC2. Estos datos se presentan en gráficos separados para cada citocina individual y también compara los cambios en los niveles de citocina en los linfocitos que se cultivaron sin mitógenos bien sin producto o con las diluciones 1:100 de BC1 y BC2.

15 En ausencia de mitógenos, tanto el tratamiento con BC1 como con BC2 de las PBMC llevaron a niveles disminuidos de IL-2 en comparación con las PBMC sin tratar (Figura 21). Esta reducción fue estadísticamente significativa para BC1 y BC2 ( $p<0,002$ ). No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de IL-2 con tratamiento con BC1 o BC2 en presencia de cualquier mitógeno, en comparación con el tratamiento solo de BC1 frente a BC2.

20 En ausencia de mitógenos, tanto el tratamiento con BC1 como con BC2 de las PBMC llevaron a niveles aumentados de IL-4 en comparación con las PBMC sin tratar (Figura 22). Este aumento fue estadísticamente significativo para BC1 ( $p<0,002$ ) y BC2 ( $p<0,01$ ). No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de IL-4 con tratamiento con BC1 o BC2 en presencia de cualquier mitógeno, en comparación con el tratamiento solo de BC1 frente a BC2.

25 Tal como se muestra en la Figura 23, tanto el tratamiento de las PBMC con BC1 como con BC2, en ausencia de mitógenos, llevaron a una inducción masiva de producción de IL-6. El aumento estadísticamente fue altamente significativo ( $P<0,00002$ ). No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de IL-6 con tratamiento con BC1 o BC2 en presencia de mitógeno de hierba carmín, en comparación con el tratamiento solo de BC1 frente a BC2. Se descubrió que la inducción de IL-6 tanto para BC1 ( $P<0,001$ ) como para BC2 ( $P<0,0009$ ) estadísticamente fue altamente significativo.

30 Tal como se muestra en la Figura 24, tanto el tratamiento de las PBMC con BC1 como con BC2, en ausencia de mitógenos, llevaron a una inducción de producción de IL-10. El aumento fue altamente significativo ( $P<0,008$ ). Las PBMC tratadas con BC1 y PHA llevaron a una mayor producción de IL-10 ( $P<0,0009$ ) que si las células se tratasen con cualquier producto solo. El tratamiento de PBMC con BC1 y PWM también llevó a un aumento en la producción de IL-10; sin embargo, no se descubrió que los datos fuesen estadísticamente significativos. No se observaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de IL-6 con tratamiento con BC2 en presencia de cualquier mitógeno cuando se compararon con el tratamiento solo con BC2.

35 En ausencia de mitógenos, la producción de TNF- $\alpha$  fue ligeramente menor que las PBMC sin tratar en presencia de BC1 y BC2 (Figura 25A y 25B). La reducción media no fue estadísticamente significativa para cualquiera de BC1 o BC2. El tratamiento de las PBMC con cualquiera de BC1 o BC2 en presencia de PHA dio como resultado en descensos de 2 veces en la expresión de TNF- $\alpha$  que fueron estadísticamente significativos tanto para BC1 ( $P<0,002$ ) como para BC2 ( $P<0,006$ ). Por el contrario, el tratamiento de PBMC con BC1 y BC2 en presencia de PWM dio como resultado importantes aumentos en los niveles de TNF- $\alpha$ . En presencia de PWM, el tratamiento con BC1 produjo un aumento de 11 veces ( $P<0,003$ ) y el tratamiento con BC2, un aumento de 22 veces ( $P<0,001$ ).

40 En ausencia de mitógenos, los niveles de INF- $\gamma$  aumentaron en respuesta al tratamiento con BC1 y BC2 (Figura 26A y 26B). Estos cambios estadísticamente fueron altamente significativos tanto para BC1 ( $P<0,001$ ) como para BC2 ( $P<0,0004$ ). El tratamiento de PBMC con cualquiera de Bc1 o BC2 en presencia de PHA no produjo cambios estadísticamente significativos en la expresión de INF- $\gamma$ . Por el contrario, el tratamiento de PBMC con BC1 y BC2 en presencia de PWM dio como resultado aumentos de 3 (BC1) y 4 (BC2) veces en niveles de INF- $\gamma$ , ambos fueron estadísticamente significativos ( $P<0,0004$ ).

#### **Ejemplo 7. Efectos antioxidantes: ensayo de protección antioxidante basado en células**

45 Las fracciones de sobrenadante de cultivo y de pared celular se ensayaron en el ensayo de protección antioxidante basado en células en eritrocitos (CAP-e), un bioensayo para ensayos antioxidantes (Figuras 27-29). Este ensayo permite la evaluación del potencial antioxidante en un procedimiento que es comparable con el ensayo de la

capacidad de absorción del radical de oxígeno (ORAC), pero solo permite la medición de antioxidantes que son capaces de atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular. Como tipo célula modelo, se usaron glóbulos rojos (RBC, del inglés *red blood cells*). Este es un tipo celular inerte, al contrario de otros tipos celulares tales como las células PMN, en las que los compuestos proinflamatorios pueden inducir el desencadenamiento oxidativo reactivo.

5 Este ensayo es particularmente útil para evaluar antioxidantes a partir de productos naturales complejos en un sistema basado en células.

Los RBC humanos recién purificados se lavaron repetidamente en solución salina fisiológica, y después se expusieron a las composiciones de ensayo. Durante la incubación con un producto de ensayo, cualquier compuesto antioxidante capaz de atravesar la membrana celular puede entrar al interior de los RBC. Los RBC se lavaron después para eliminar los compuestos que no se absorbieron por las células, y se cargaron con colorante DCF-DA, que se vuelve fluorescente tras la exposición con especies reactivas de oxígeno. La oxidación se desencadenó mediante la adición del generador de radicales libres de peróxido AAPH. Se evaluó la intensidad de fluorescencia. La baja intensidad de fluorescencia de células control sin tratar sirvió como un valor inicial, y los RBC tratado solo con AAPH sirven como un control positivo para el daño oxidativo máximo. Una observación de una intensidad de fluorescencia reducida de RBC expuestos a un producto de ensayo y posteriormente expuestos a AAPH, indica que el producto de ensayo contiene antioxidantes disponibles para penetrar en las células y protegerlos del daño oxidativo.

Para el ensayo de BC1 y BC2, se ensayó la capacidad de protección antioxidante tanto en los RBC recién aislados como en RBC que se habían almacenado durante 45 días. Los RBC recientes contienen antioxidantes derivados del alimento así como enzimas redox. Con el almacenamiento, los antioxidantes se agotan, y las funciones enzimáticas pueden disminuir con el tiempo. Tanto BC1 como BC2 contienen compuestos que pueden entrar en los RBC. Estos compuestos entran de manera más eficaz en los RBC recientes. Sin embargo, los compuestos de BC1 no poseen capacidad antioxidante. Por el contrario, ellos interfieren con los mecanismos antioxidantes protectores dentro de los RBC. Se ve una protección antioxidante intermedia en células maduras expuestas a BC2.

25 Modulación de respuestas inmunitarias mediante sobrenadantes de BC libres de células (BC-1) y fracciones de pared celular libres de células (BC-2)

En resumen, tanto BC1 como BC2 inhibieron la formación espontánea de ROS y redujeron la formación de ROS cuando se había aplicado estrés oxidativo a las PMN. A mayores concentraciones, tanto BC1 como BC2 aumentaron la migración de células PMN hacia el péptido bacteriano, indicando una mejora de la función de vigilancia inmunitaria de las PMN en la detección de bacterias. Por el contrario, a bajas concentraciones, tanto BC1 como BC2 disminuyeron la migración de células PMN hacia un péptido bacteriano, indicando que a bajas concentraciones, los compuestos presentes en las preparaciones de sobrenadante y pared celular de *Bacillus coagulans* tenían un efecto inmunomodulador en la capacidad de las PMN para responder al péptido señal bacteriano. Este efecto subyace procesos que dictan cómo responde el sistema inmunitario a una infección bacteriana frente a bacterias comensales (beneficiosas) residentes en el intestino. La dosis más alta de BC1 aumentó la fagocitosis de los monocitos. BC2 no aumentó la fagocitosis de los monocitos. BC1 y BC2 aumentaron la fagocitosis de las PMN en las dosis más fuertes. La expresión de NK (CD69) se aumentó en todas las diluciones de BC1 y BC2 ensayadas. Tanto BC1 como BC2 cesaron la proliferación de linfocitos en todas las dosis. Ambas fracciones de *Bacillus coagulans* redujeron IL-2 y TNF. Estas citocinas son citocinas TH1 que se dirigen a la activación de macrófagos. Sin embargo, se percibió un aumento intermedio de la producción de IFN- $\gamma$  para ambas fracciones de *Bacillus coagulans*. Ambas fracciones de *Bacillus coagulans* aumentaron la producción de IL-4, IL-6, y IL-10. Estas citocinas están más directamente ligadas a la producción de TH2 que se usa para ayudar en la señal y activar los linfocitos B, que son células presentadoras de antígeno para el sistema inmunitario adaptativo. BC1 y BC2 fueron capaces de obstaculizar la migración de células PMN cuando se dirigen hacia el quimioatrayente conocido IL-8. Este fuerte efecto antiinflamatorio fue significativo a lo largo de un amplio intervalo de diluciones. La pared celular de *Bacillus coagulans* inhibió la migración de células PMN cuando se dirigen hacia el quimioatrayente inflamatorio LTB4.

### **Ejemplo 9: División del sobrenadante y los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans***

Se dividieron/purificaron compuestos de diferente peso molecular en sobrenadante y componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* para evaluar sus efectos biológicos. Se examinaron tres fracciones de intervalo molecular para diversas actividades.

#### Preparación de las dos fracciones de ensayo (pared celular y sobrenadante) y esporas.

Se activó por calor una muestra de esporas y se inocularon en un medio de cultivo líquido. La muestra se incubó a 37 °C durante 24 horas. Este período de tiempo permite la formación de un cultivo bacteriano de fase logarítmica cuando la muerte y la ruptura bacteriana no es prominente. Después de la incubación, se preparan las dos fracciones (pared celular y sobrenadante). La separación inicial se logra mediante decantación del cultivo completo en un frasco de 50 ml y centrifugación a 2400 rpm. Los agregados bacterianos forman un sedimento. El sobrenadante se decanta de manera suave en un nuevo frasco. Desde este frasco, se meten alícuotas más pequeñas de 1 ml en tubos Eppendorf y se sometieron a centrifugación de alta velocidad, seguido de tres filtraciones seriadas, para eliminar cualquier bacteria intacta y fracciones de la misma. El sobrenadante estéril y filtrado se divide

en alícuotas y varias alícuotas se congelan de manera inmediata a -80 °C. El sedimento original de la centrifugación inicial se usa para preparar la fracción de pared celular. El sedimento húmedo se congela y se descongela. El fango descongelado se transfiere a un tubo Eppendorf y se lava dos veces en solución salina usando centrifugación de alta velocidad. Después se transfiere el sedimento a un frasco de cristal y se somete a molienda con perlas usando perlas de circonio unidas a bajas proteínas con un diámetro de 100 micrómetros. La molienda se realiza mediante pulsaciones repetidas usando un mezclador Vortex. Las perlas se retiran y el fango que contiene los fragmentos de pared celular rota se filtraron de manera estéril en múltiples alícuotas que se congelarán inmediatamente a -80°C.

#### Actividad biológica del sobrenadante y los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans*

Con el fin de identificar los pesos moleculares de los compuestos de proteína/carbohidrato en las fracciones de sobrenadante y pared celular de BC, se usó la electroforesis para comprender la composición de proteínas y polisacáridos de las fracciones y esporas de *Bacillus coagulans*. Un procedimiento típico de electroforesis de proteínas en gel se muestra en la Figura 31. Este procedimiento separa las proteínas y los polisacáridos mediante el peso molecular y da una valiosa huella digital para cada una de las fracciones de BC. La separación electroforética proporciona información sobre la cantidad relativa de proteínas y polisacáridos específicos en el producto.

La electroforesis en gel del lote previo de fracciones de sobrenadante y pared celular mostró varias regiones de interés. El sobrenadante contiene compuestos por debajo de 5-10 kDa, es decir, por debajo del intervalo que se puede separar claramente mediante electroforesis en gel SDS (véase, el frotis debajo de las palabras "Sobrenadante de BC" en la Figura 32). Ambas fracciones contienen bandas dobles en el intervalo de los 10 kDa. El sobrenadante contiene varias bandas prominentes adicionales entre 20-30 kDa y entre 50-150 kDa. La división de la fracción del sobrenadante y de la pared celular se lleva a cabo para obtener tres fracciones o preparaciones purificadas A) por debajo de 3 kDa, B) entre 3-30 kDa, y purificación C) entre 30-200 kDa. Los compuestos bioactivos principales de la pared celular están en la fracción B. La electroforesis se usa como una herramienta para asegurar la consistencia del producto durante las etapas del desarrollo del producto. También es útil como una herramienta de control de calidad regular durante la fabricación.

La división de tamaño mediante peso molecular (<3, 3-30, 30-200 kDa) tanto de las fracciones de sobrenadante como de pared celular se realizan para caracterizar las tres actividades biológicas principales identificadas: a) efecto antiinflamatorio, tal como se mide mediante la inhibición de la migración de células en respuesta a mediadores inflamatorios; b) efecto en la activación de células NK; y c) efecto en la producción de citocinas.

#### Efecto antiinflamatorio: Inhibición de la migración dirigida a Leucotrieno B4

La célula PMN es un tipo celular altamente activo y migratorio. Las fracciones de *Bacillus coagulans* tienen efectos antiinflamatorios importantes cuando se exponen a la citocina inflamatoria conocida LTB4. La pared celular de BC en bruto y el sobrenadante de BC se dividen en los siguientes intervalos de peso molecular: a) <3 kDa, B) 3-30 kDa, y c) 30-200 kDa. Se colocan volúmenes similares de pared celular y sobrenadante de *Bacillus coagulans* en columnas de centrifugación que filtran fracciones de peso molecular específico. Tras la centrifugación, los volúmenes restantes se diluyen de manera seriada y se colocan con las PMN antes de ponerlas en la cámara superior.

Los cultivos de células PMN recién purificadas se colocan en placas de migración de doble cámara, en las que la cámara inferior simula el tejido, y la cámara superior simula el torrente sanguíneo tal como se describe en la Figura 33. Las células se colocan en las cámaras superiores con o sin productos de ensayo, y el quimioatrayente diferente (LTB4) está presente en las cámaras inferiores. Todos los ensayos se realizan por triplicado, y se repiten al menos 3 veces con resultados consistentes. El ensayo de la migración hacia el quimioatrayente inflamatorio LTB4 identifica respuestas selectivas en este sistema *in vitro*, que simula de cerca algunos modelos de inflamación *in vivo*, tales como el edema de pata de rata. El ensayo permite una distinción entre los mecanismos de defensa normal de PMN frente a la respuesta a la inflamación. También se examina la actividad antiinflamatoria de las esporas de *Bacillus coagulans*. Estos ensayos identifican qué compuestos de peso molecular son responsables de los efectos antiinflamatorios de las fracciones de sobrenadante y pared celular de BC.

#### Activación de linfocitos citolíticos naturales (expresión de CD69)

La pared celular de BC en bruto y el sobrenadante de BC se dividen en los siguientes intervalos de peso molecular: a) <3 kDa, B) 3-30 kDa, y c) 30-200 kDa. Tal como se describe anteriormente, ambas fracciones de BC activaron células NK. Se determina la inducción del marcador de activación CD69 en las células NK. Las células mononucleares de sangre periférica humana recién purificadas se usan para estos ensayos. Las células se colocan en placas de microensayo de 96 pocillos por triplicado. Los pocillos de control negativo por triplicado se dejan sin tratar. Los controles positivos se tratan con IL-2 a una dosis de 100 unidades internacionales por ml (UI/ml). Tras 18 horas de cultivo, las células se tiñen para la molécula de activación CD69 en la superficie de células NK negativas en CD3, positivas en CD56.

La actividad biológica del sobrenadante y los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* también se evalúa tras el secado y la reconstitución para determinar si se preserva la bioactividad tras el secado.

Este ensayo identifica qué compuestos de peso molecular son responsables de los efectos que activan células NK

de las fracciones de sobrenadante y pared celular de BC. También se examinó la capacidad de las esporas de *Bacillus coagulans* para activar células NK.

#### Producción de citocinas

5 La pared celular de BC en bruto y el sobrenadante de BC se dividen en los siguientes intervalos de peso molecular:  
 a) <3 kDa, B) 3-30 kDa, y c) 30-200 kDa. Los experimentos anteriores mostraron que las fracciones de BC inducían  
 cambios de manera directa en la producción de citocinas. Las fracciones se examinarán para identificar qué  
 intervalos de peso molecular de los compuestos son responsables de este cambio en las fracciones de  
 sobrenadante y pared celular de BC. Las células mononucleares de sangre periférica humana recién purificada  
 10 (PBMC) se cultivarán en ausencia frente a presencia de diluciones seriadas de las fracciones de BC. La actividad  
 biológica del sobrenadante y los componentes de pared celular de *Bacillus coagulans* también se evalúa tras el  
 secado y la reconstitución para determinar si se preserva la bioactividad tras el secado.

También se examinó la capacidad de las esporas de *Bacillus coagulans* para inducir la producción de citocinas IL-2,  
 IL-4, IL-6, IL-10, TNF-alfa y IFN-gamma.

#### 15 **Ejemplo 10: Un ensayo controlado para evaluar los efectos de GBI-30 (GanedenBC<sup>30</sup>) (células y esporas viables) en el sistema inmunitario**

El efecto beneficioso de GanedenBC<sup>30</sup> (GBI-30 de *Bacillus coagulans*, Número de designación de ATCC PTA-6086)  
 en el sistema inmunitario en individuos sanos se evaluó cuando se expuso al adenovirus y a la gripe. También se  
 llevaron a cabo estudios para determinar el efecto beneficioso de GanedenBC<sup>30</sup> (GBI-30 de *Bacillus coagulans*,  
 20 Número de designación de ATCC PTA-6086) en individuos sanos en células %CD3CD69- un marcador para  
 actividad de linfocitos T.

Se reclutaron diez sujetos adultos sanos para este estudio. No se permitieron enfermedades concurrentes o  
 inmunización reciente. La sangre se extrajo como valor inicial en el día 0. A los sujetos se les indicó que  
 consumiesen 1 cápsula diariamente que contiene 500 millones de UFC de GanedenBC<sup>30</sup> diariamente durante 30  
 días. La sangre se extrajo de nuevo en el día 30. Debido a que un sujeto era estadísticamente diferente en los  
 25 valores iniciales, solo se usaron 9 sujetos en el análisis final.

Se tomaron muestras de sangre y se estimularon bien con el adenovirus o con la gripe A y se incubaron durante 24  
 horas y después se agitaron vorticialmente. Se extrajeron 100 microlitros de la muestra y de esos, se usaron 20  
 microlitros para el ensayo %CD3CD69. Se extrajeron 900 microlitros de las muestras restantes y se centrifugaron y  
 se eliminó el plasma. Se tomaron las muestras de plasma y se usaron en el ensayo de citocinas. Se ensayaron  
 30 diversas citocinas, y las que tuvieron cambios estadísticos se indican a continuación.

Cuando se consumieron 500 millones de UFC/día, el sistema inmunitario de los sujetos estaba reforzado cuando se  
 expusieron tanto con el adenovirus como con la gripe A. Las células %CD9CD69, aumentaron tras demostrar una  
 capacidad para aumentar la actividad de linfocitos T. Los cambios estadísticamente significativos se vieron en la  
 producción de IL-8 (P=0,039) cuando se expusieron a la gripe A, y en la producción de INF-γ (P=0,039) cuando se  
 35 expusieron al adenovirus. Los aumentos estadísticamente significativos en %CD3CD69 (P=0,023) se vieron tanto  
 para adenovirus como para gripe A.

Estos datos indican que una composición probiótica que contiene 2 mil millones de UFC de GanedenBC<sup>30</sup>, cuando  
 se consumen diariamente, refuerzan el sistema inmunitario. Cuando se consumió a solo 500 millones de UFC/día, la  
 composición fue capaz de demostrar refuerzos estadísticamente significativos para el sistema inmunitario así como  
 40 un aumento de la actividad de linfocitos T.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en la mejora de una respuesta inmunitaria frente a un patógeno microbiano en un sujeto, en la que la composición comprende:
- 5 una fracción de pared celular purificada de una bacteria de *Bacillus coagulans*, en la que dicha fracción de pared celular comprende un compuesto bioactivo de entre 3 y 30 kDa, y en la que la composición es para la administración en una cantidad que mejora dicha respuesta inmunitaria.
2. Una composición para su uso en la mejora de una respuesta inmunitaria frente a un patógeno microbiano en un sujeto en el tratamiento de una infección,
- 10 en la que la composición comprende una fracción de pared celular purificada de una bacteria de *Bacillus coagulans*, en la que dicha fracción de pared celular comprende un compuesto bioactivo de entre 3 y 30 kDa, y en la que la composición es para la administración en una cantidad que mejora dicha respuesta inmunitaria.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho patógeno microbiano es una bacteria o un virus.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho patógeno provoca una infección respiratoria vírica.
- 15 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho patógeno comprende un virus de la gripe.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho patógeno comprende un virus de la gripe humana, aviar o porcina o una combinación de los mismos.
- 20 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho patógeno comprende un adenovirus.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la mejora de dicha respuesta inmunitaria comprende un aumento en la producción de citocinas o un aumento en la migración de células inmunitarias al lugar de la infección.
- 25 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que dicha citocina comprende interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-10, factor  $\alpha$  de necrosis tumoral, (TNF- $\alpha$ ), o interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la mejora de dicha respuesta inmunitaria comprende el aumento en la producción de citocinas, la activación del aspecto de vigilancia inmunitaria de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), el aumento de la quimiotaxis de células inmunitarias, la
- 30 activación de linfocitos citolíticos naturales (NK), o el aumento de la fagocitosis de los monocitos.
11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la mejora de dicha respuesta inmunitaria comprende una fagocitosis o quimiotaxis aumentada por dichos PMN.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la mejora de dicha respuesta inmunitaria comprende una expresión aumentada de CD69 en dichas células NK.
- 35 13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho *Bacillus coagulans* es *Bacillus coagulans* de cepa hammer de N.º de acceso ATCC 31284.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho *Bacillus coagulans* se selecciona del grupo que consiste en la cepa GBI-30 de número de designación de ATCC PTA-6086, la cepa GBI-20 de número de designación de ATCC PTA-6085, y la cepa GBI-40 de número de designación de
- 40 ATCC PTA-6087.
15. Una composición que comprende una fracción de pared celular purificada de una bacteria de *Bacillus coagulans* en una forma adecuada para la ingesta humana, en la que dicha fracción de pared celular comprende un compuesto bioactivo de entre 3 y 30 kDa y está presente en una cantidad de mejora inmunitaria.
16. La composición de la reivindicación 15, en la que dicha forma es una píldora, cápsula, o suspensión.

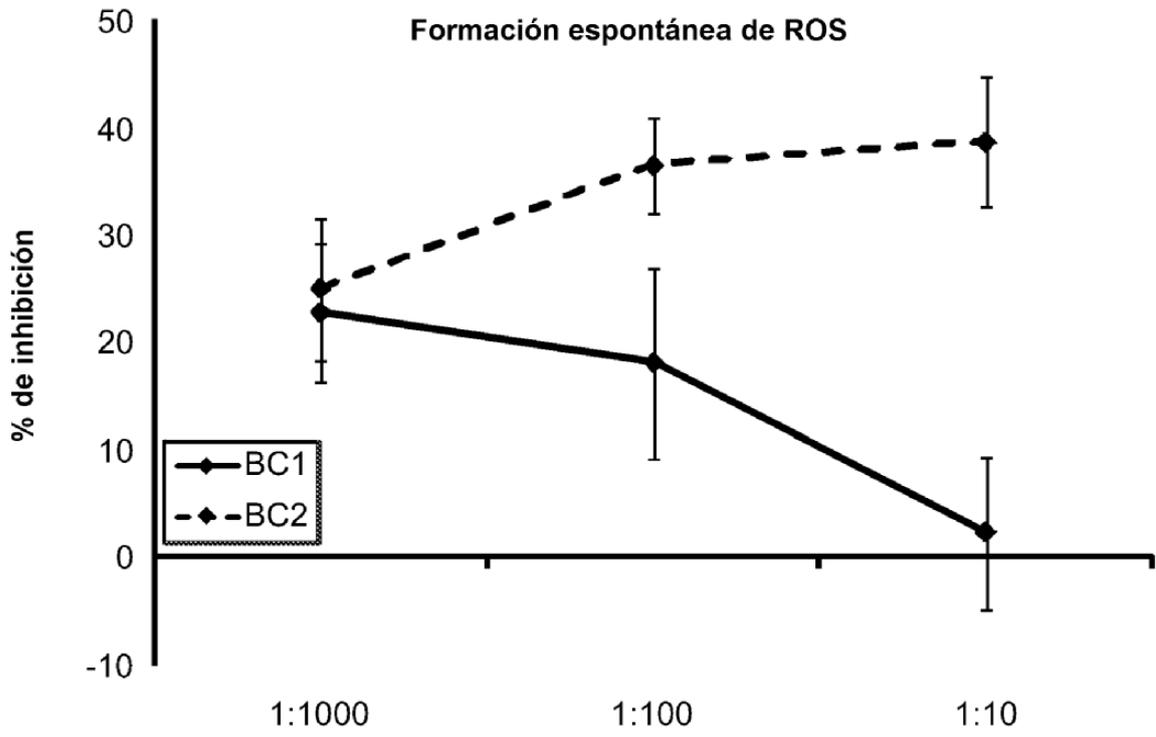


FIG. 1

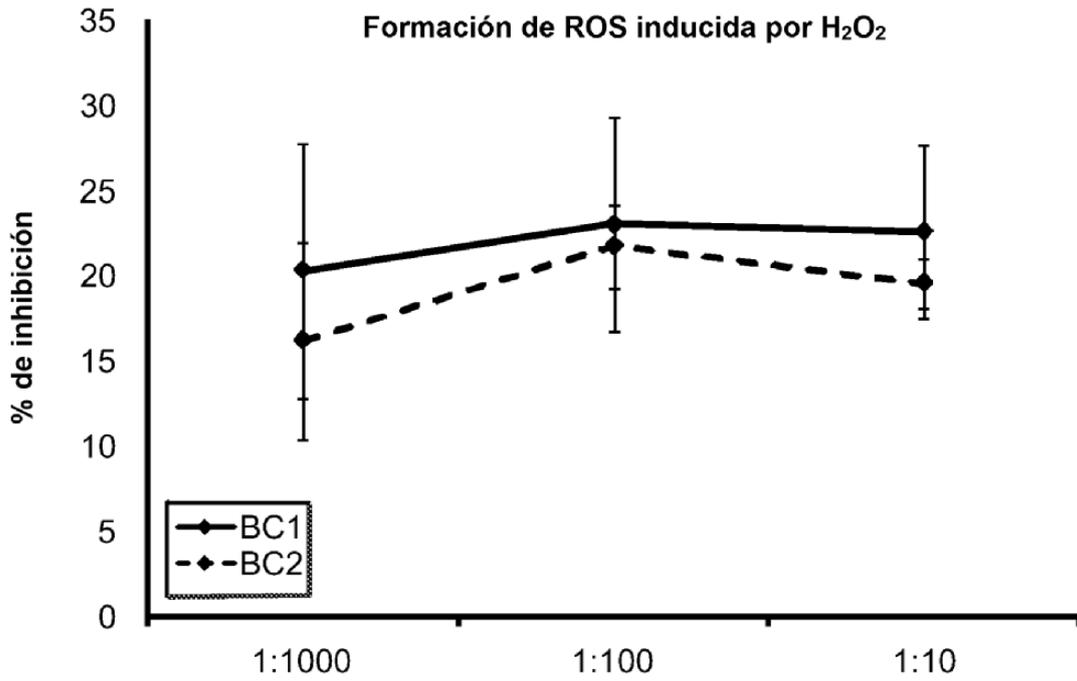


FIG. 2

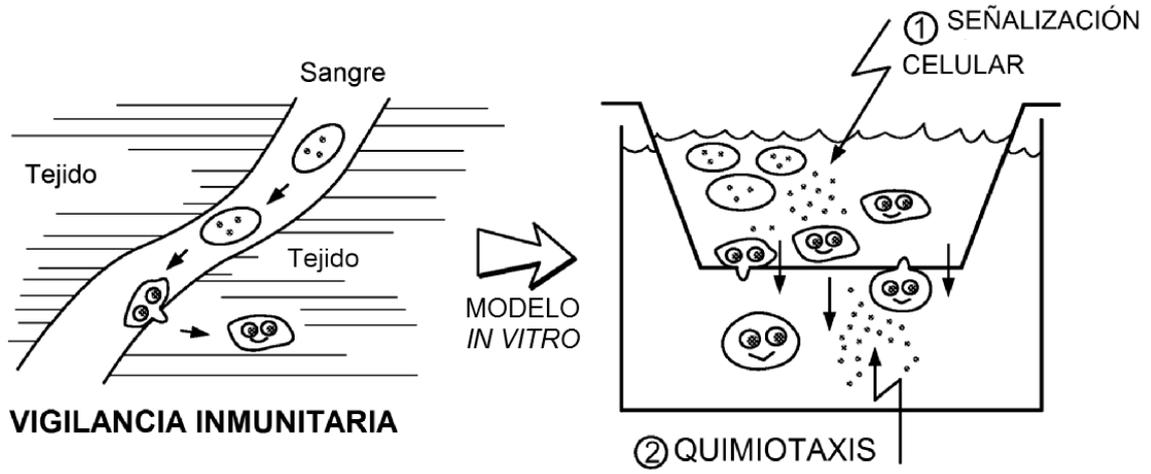


FIG. 3

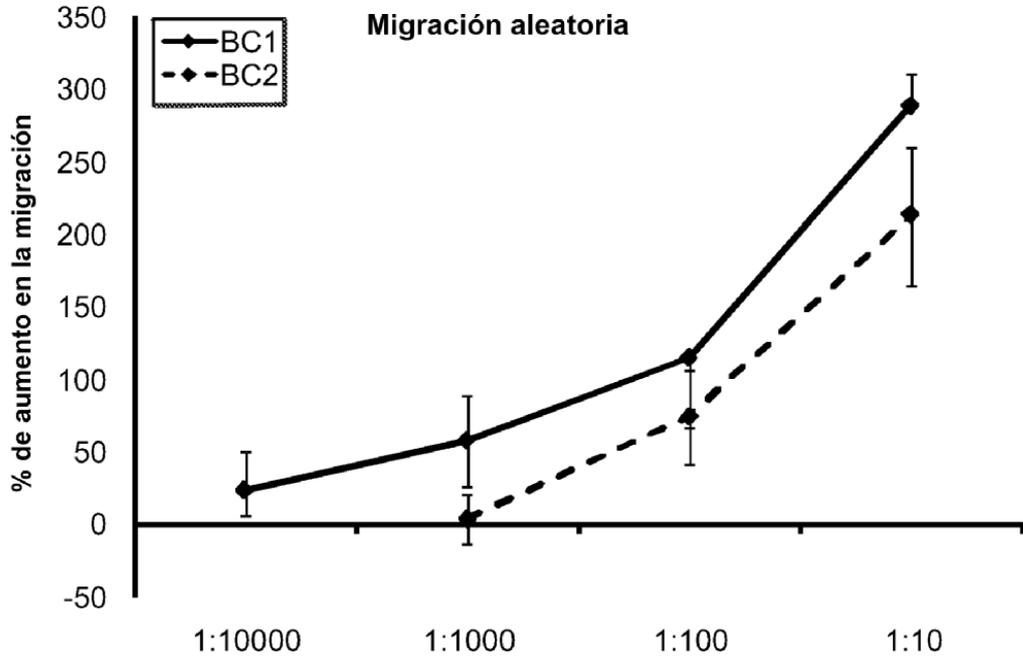


FIG. 4

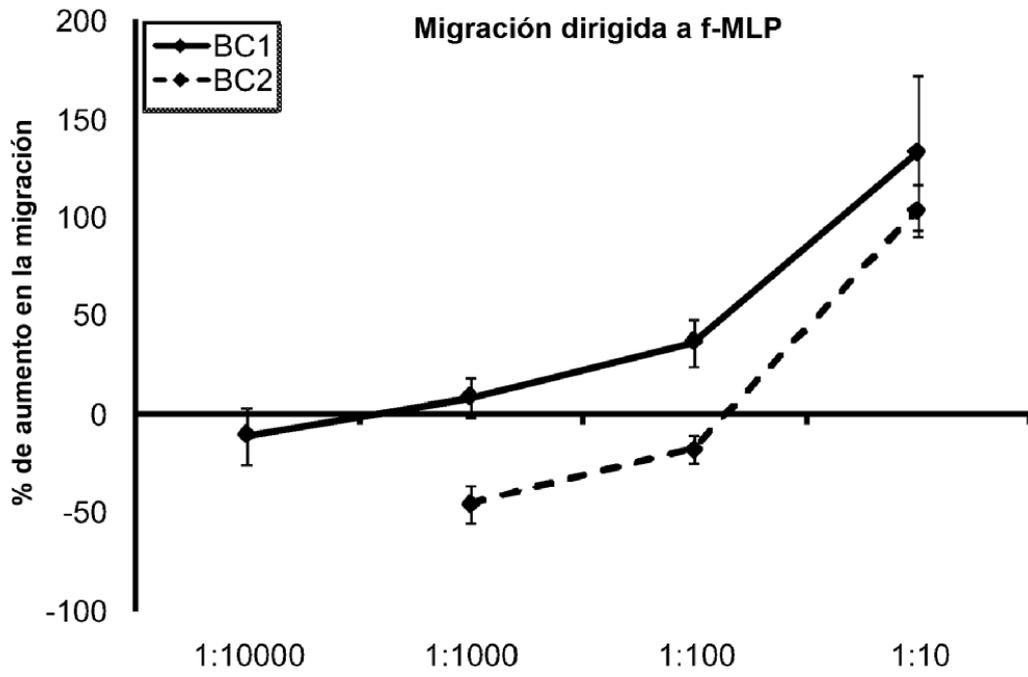


FIG. 5

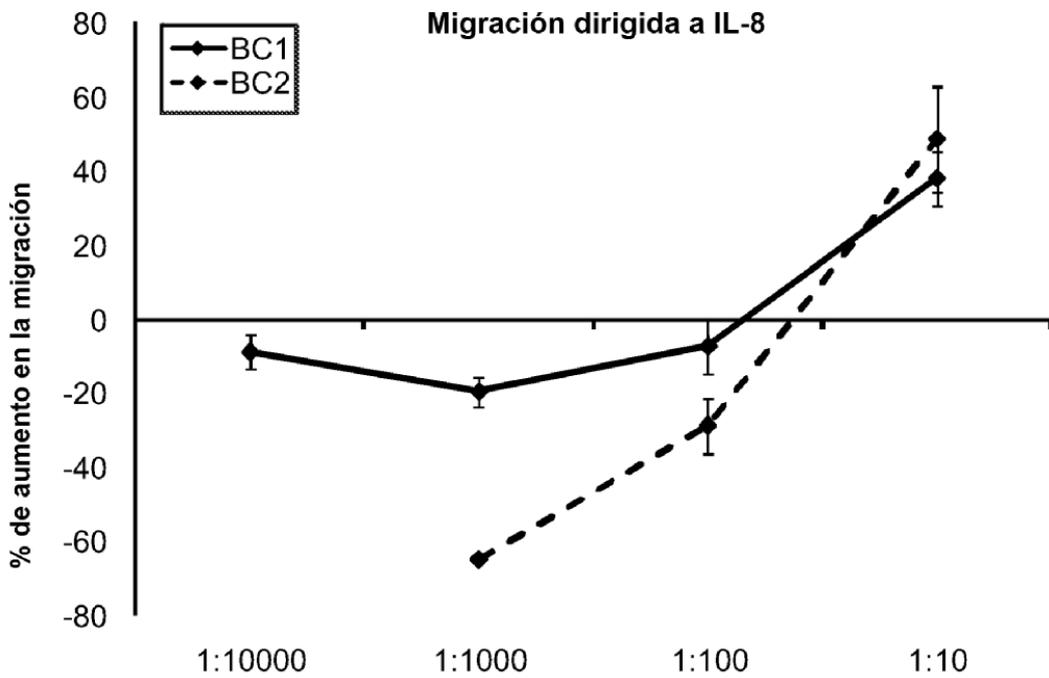


FIG. 6A

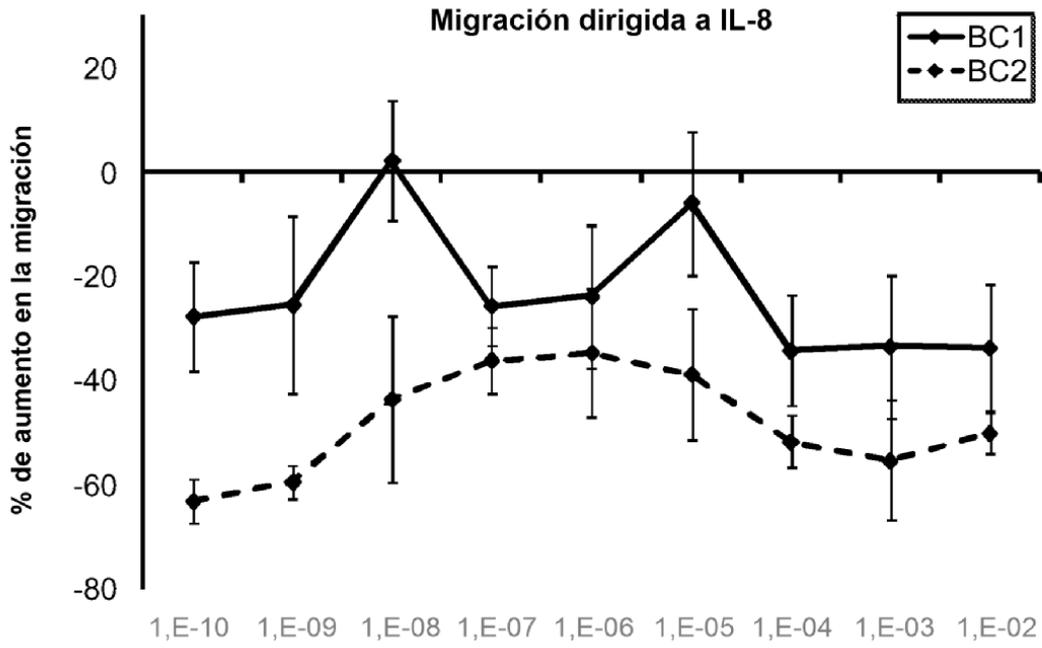


FIG. 6B

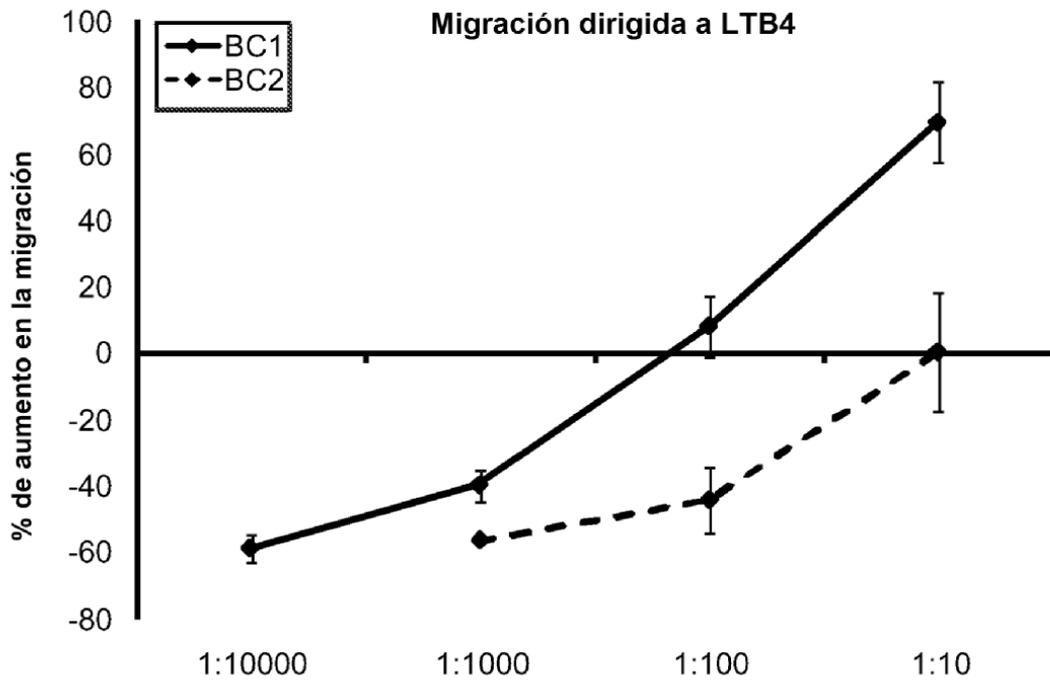
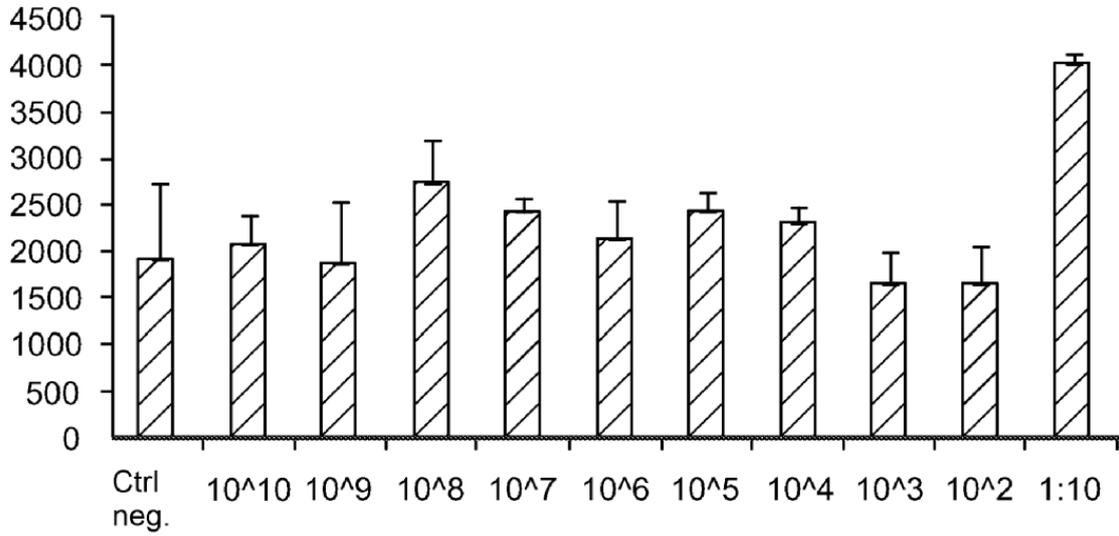


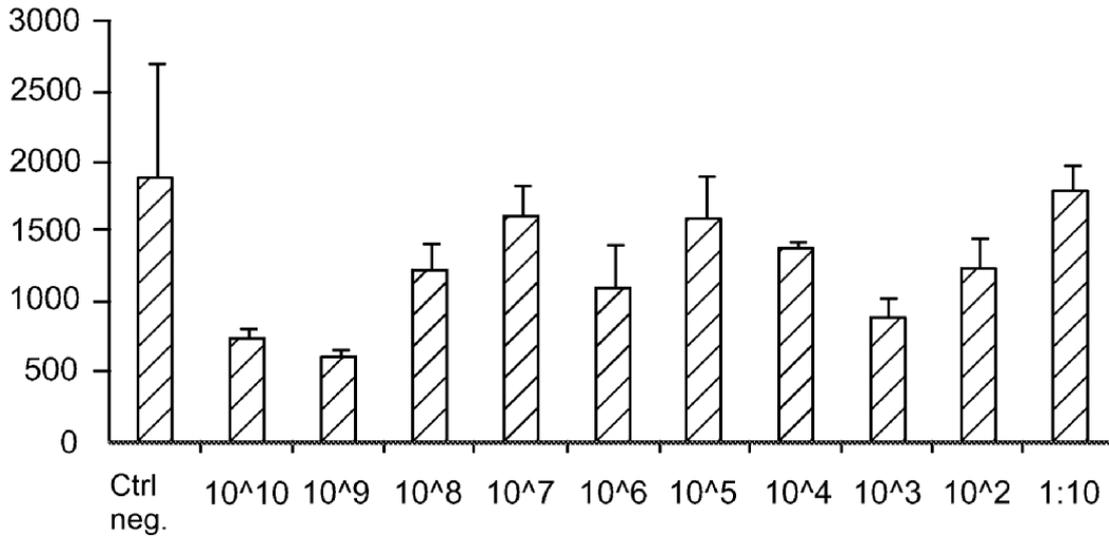
FIG. 7A

**MIGRACIÓN DE BC1 DIRIGIDA A LTB4**



**FIG. 7B**

**MIGRACIÓN DE BC2 DIRIGIDA A LTB4**



**FIG. 7C**

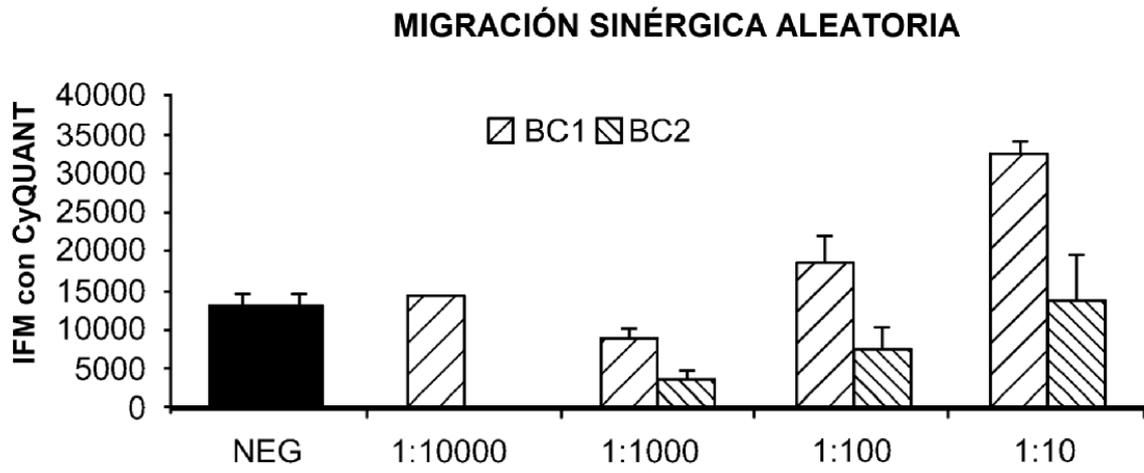


FIG. 8

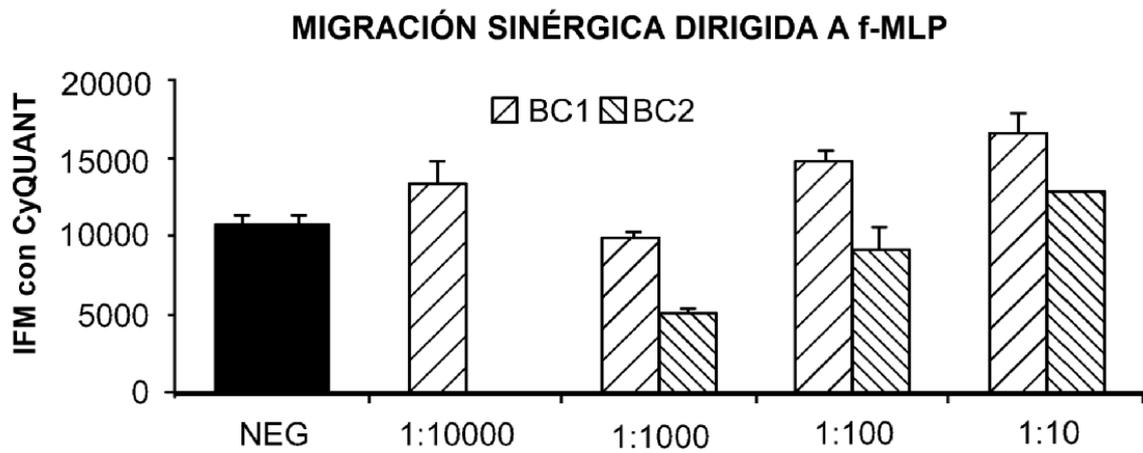


FIG. 9

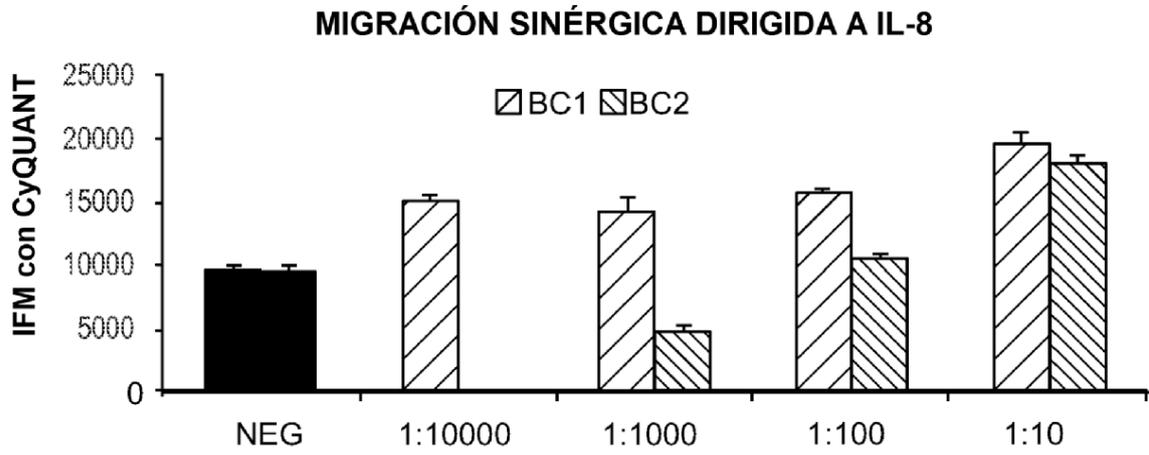


FIG. 10

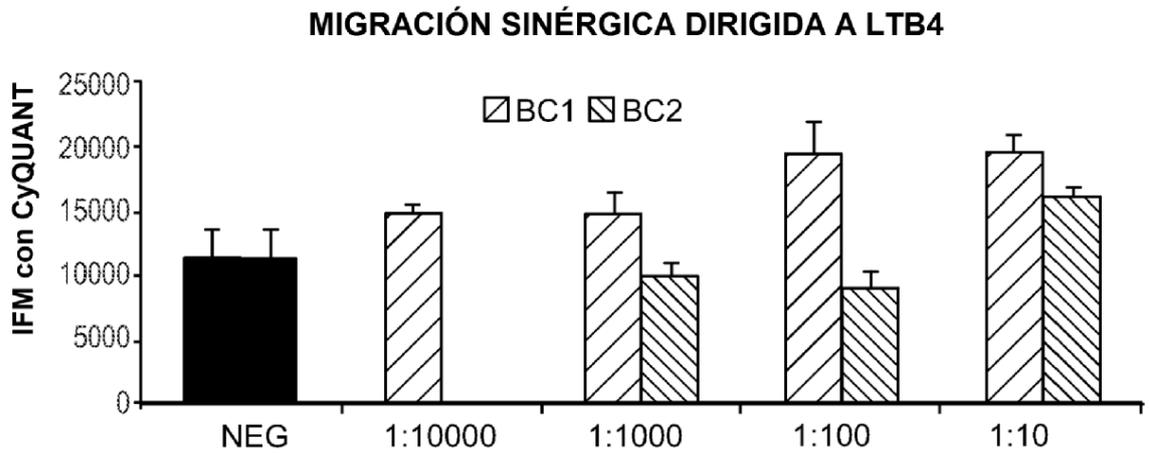


FIG. 11

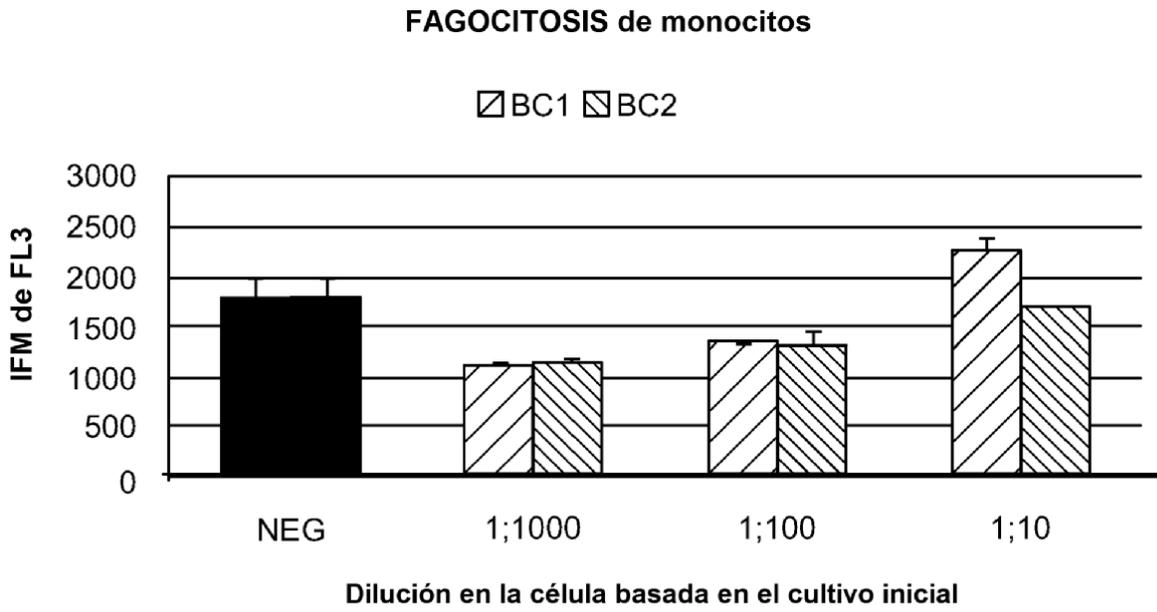


FIG. 12

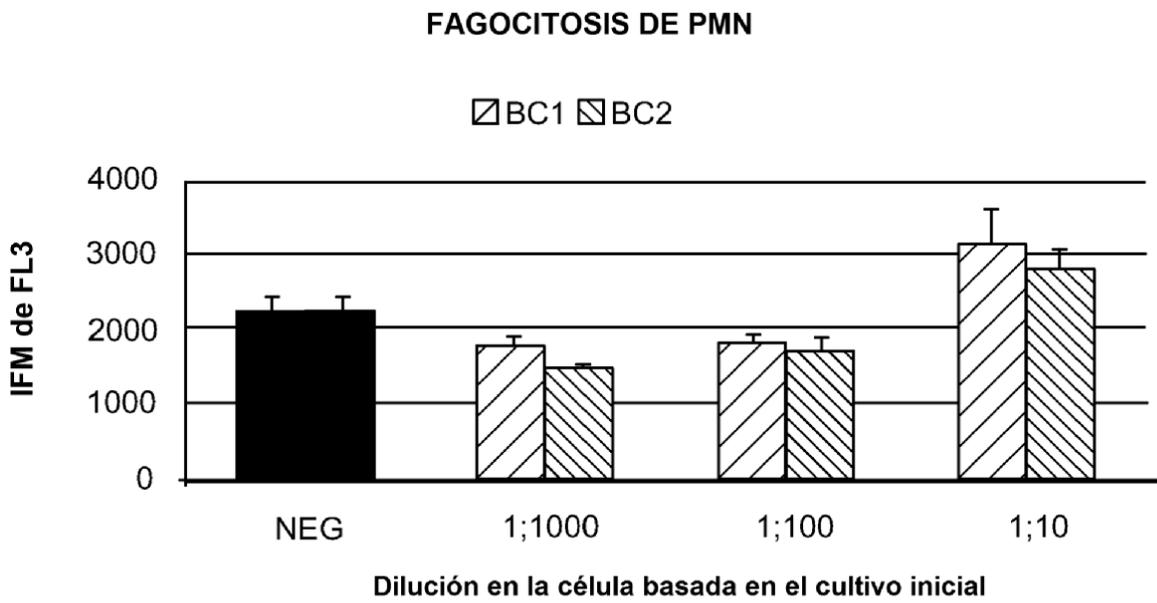


FIG. 13

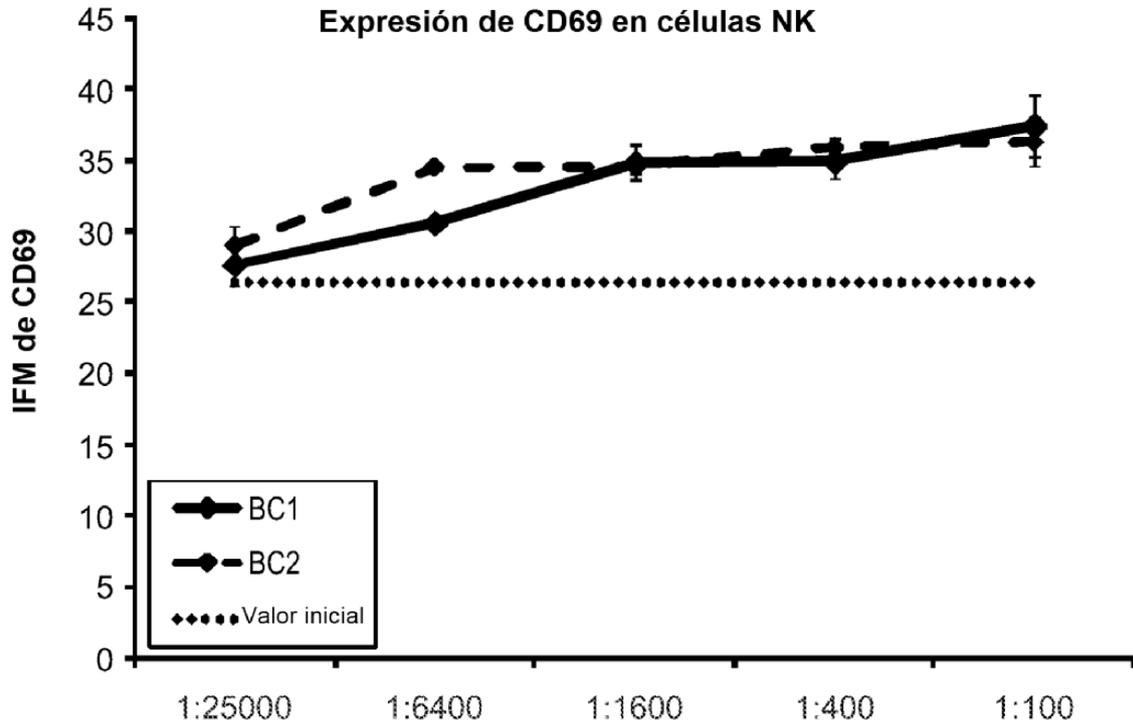


FIG. 14

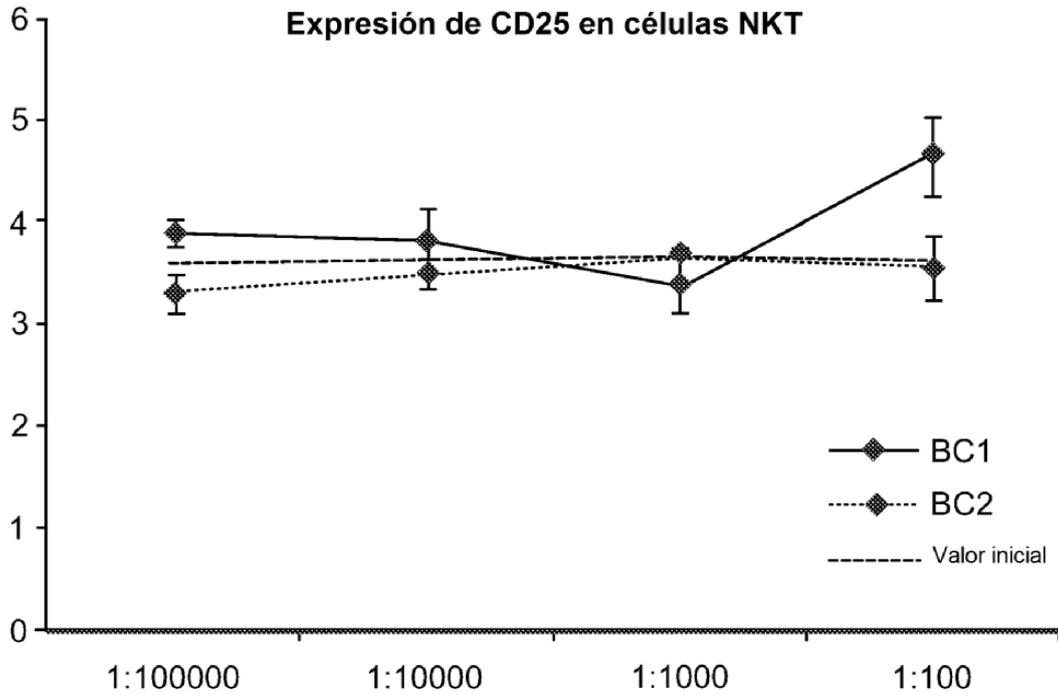


FIG. 15

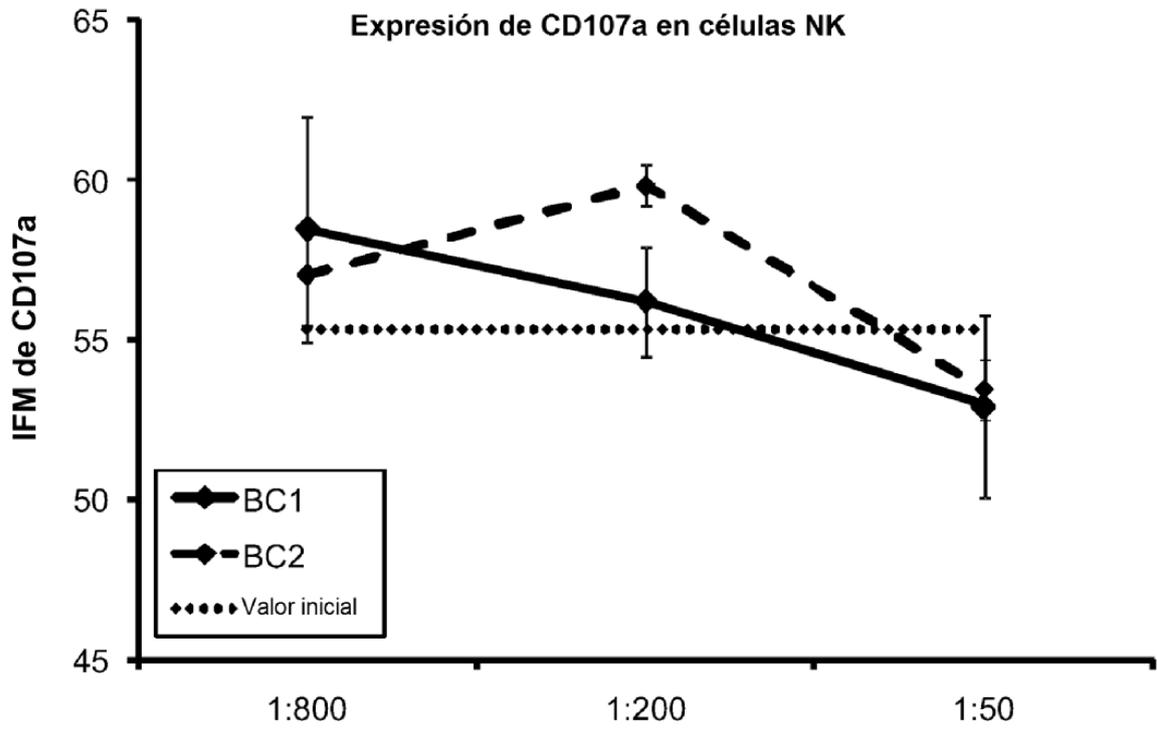


FIG. 16

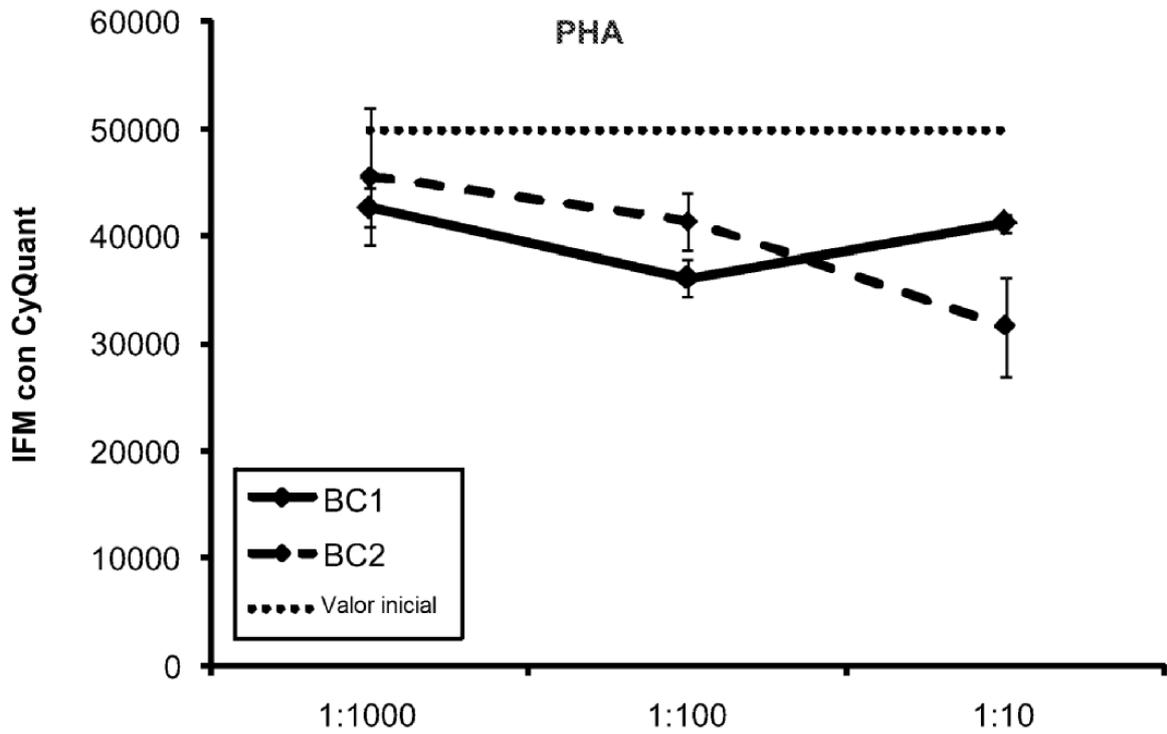


FIG. 17

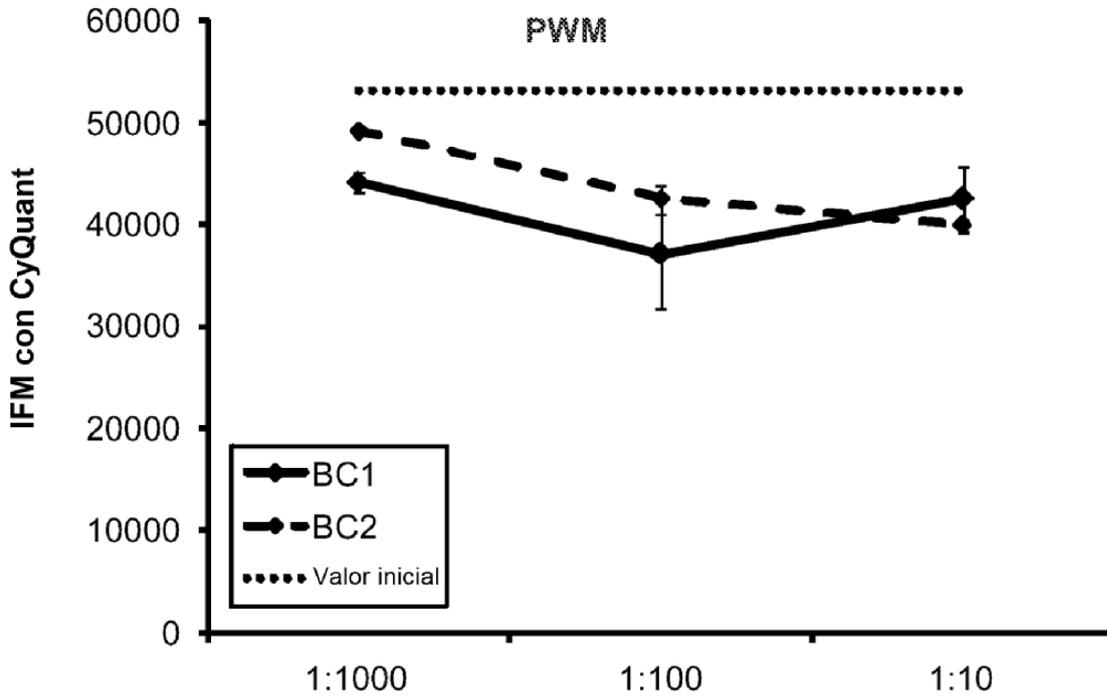


FIG. 18

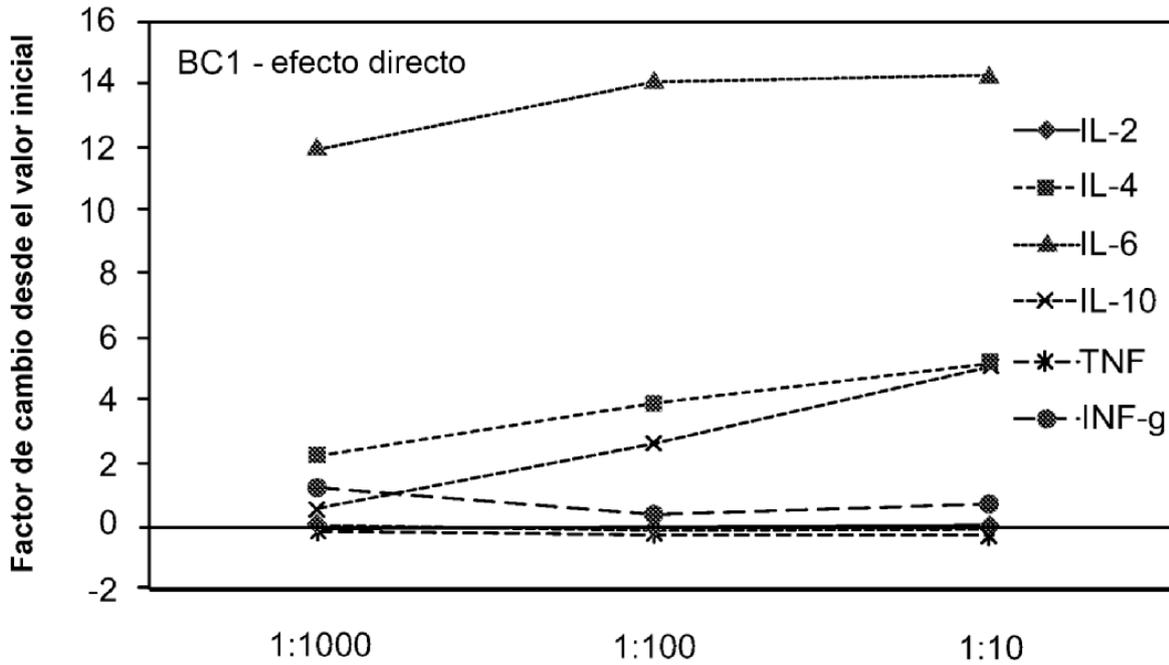


FIG. 19A

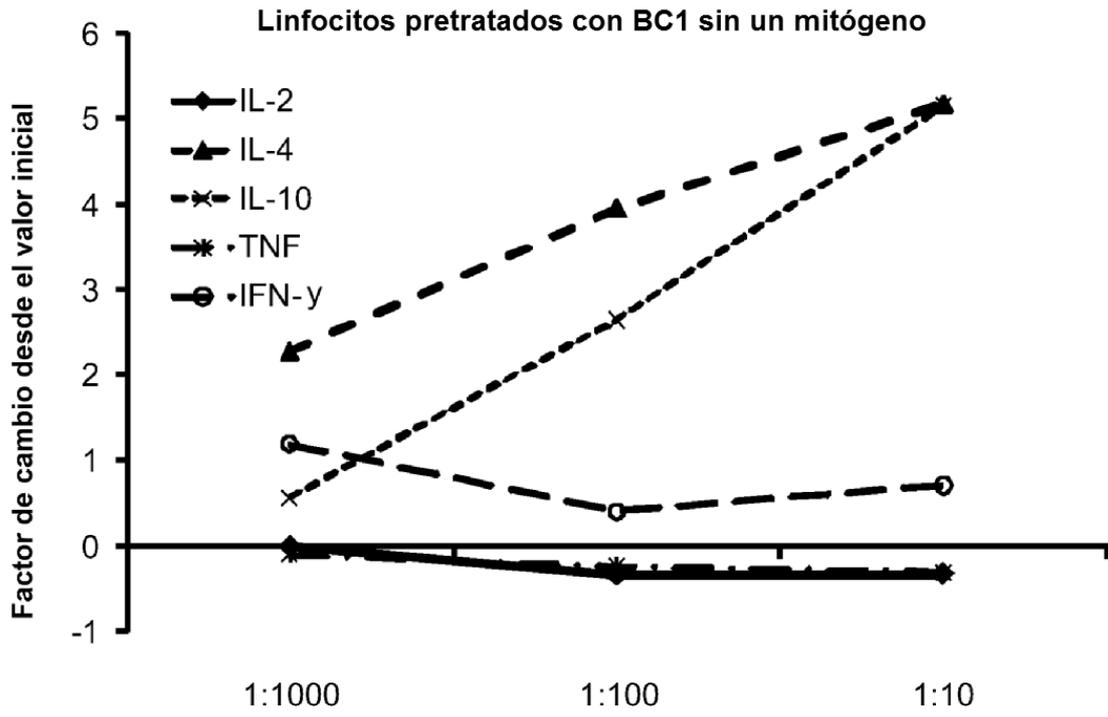


FIG. 19B

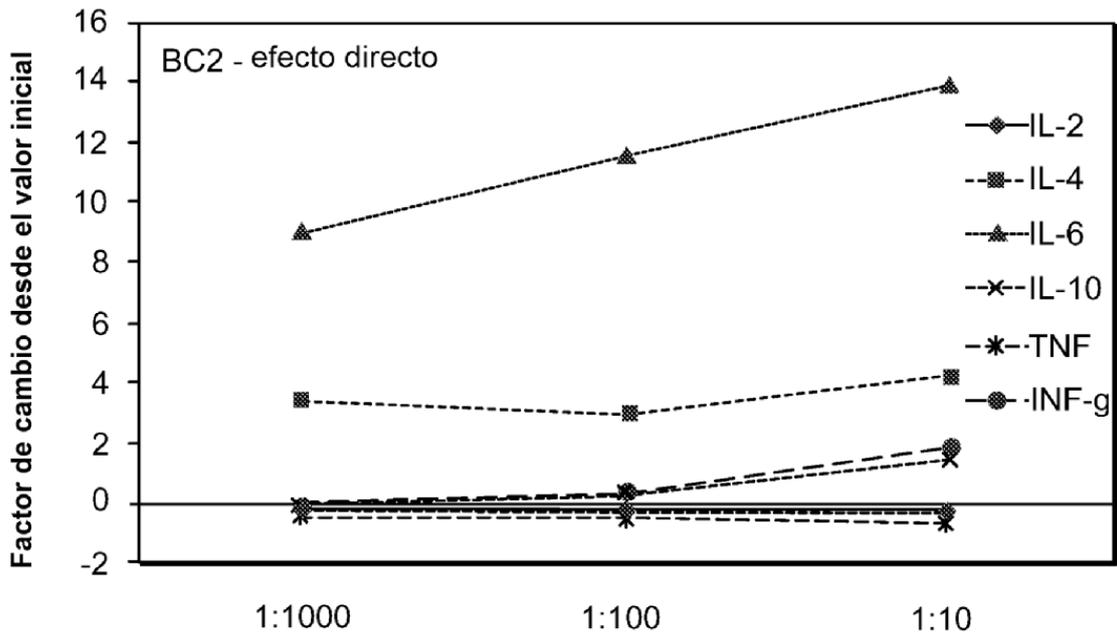


FIG. 20A

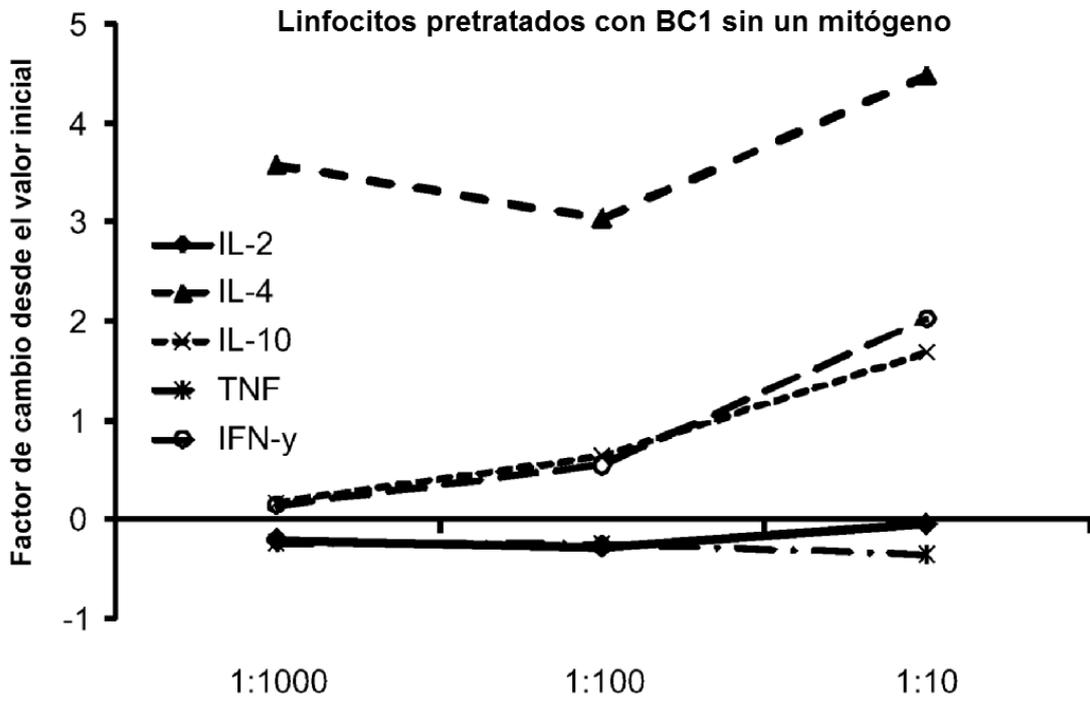


FIG. 20B

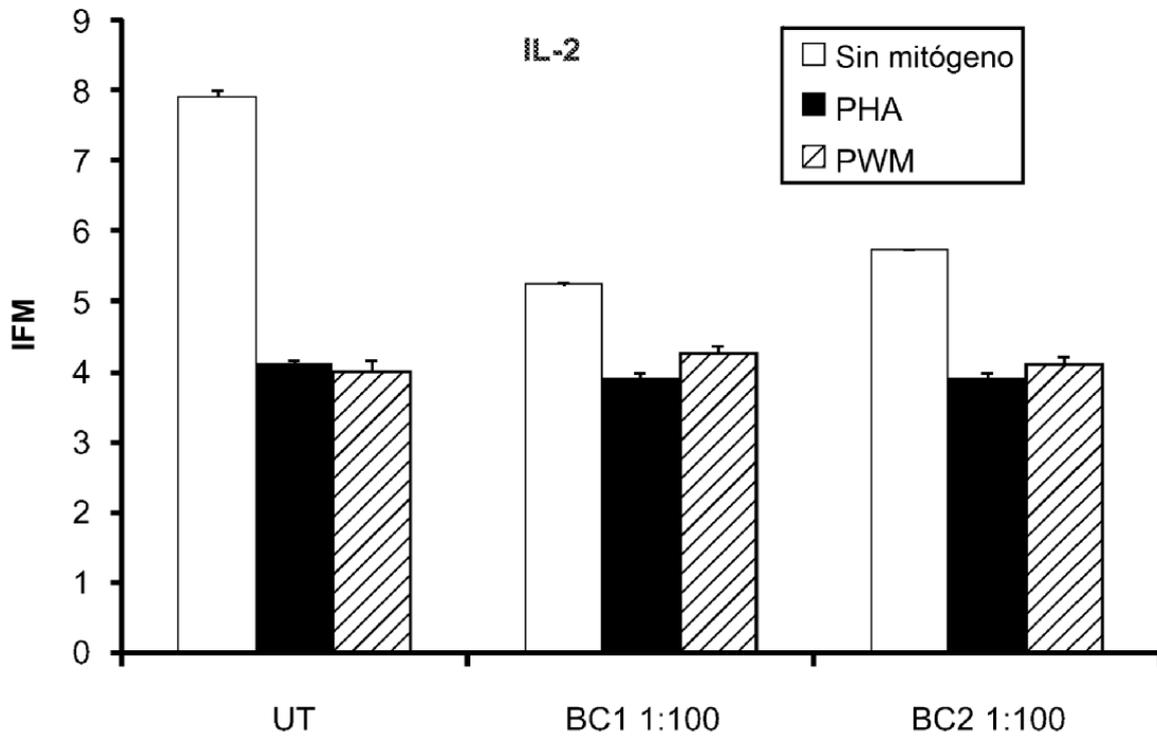


FIG. 21

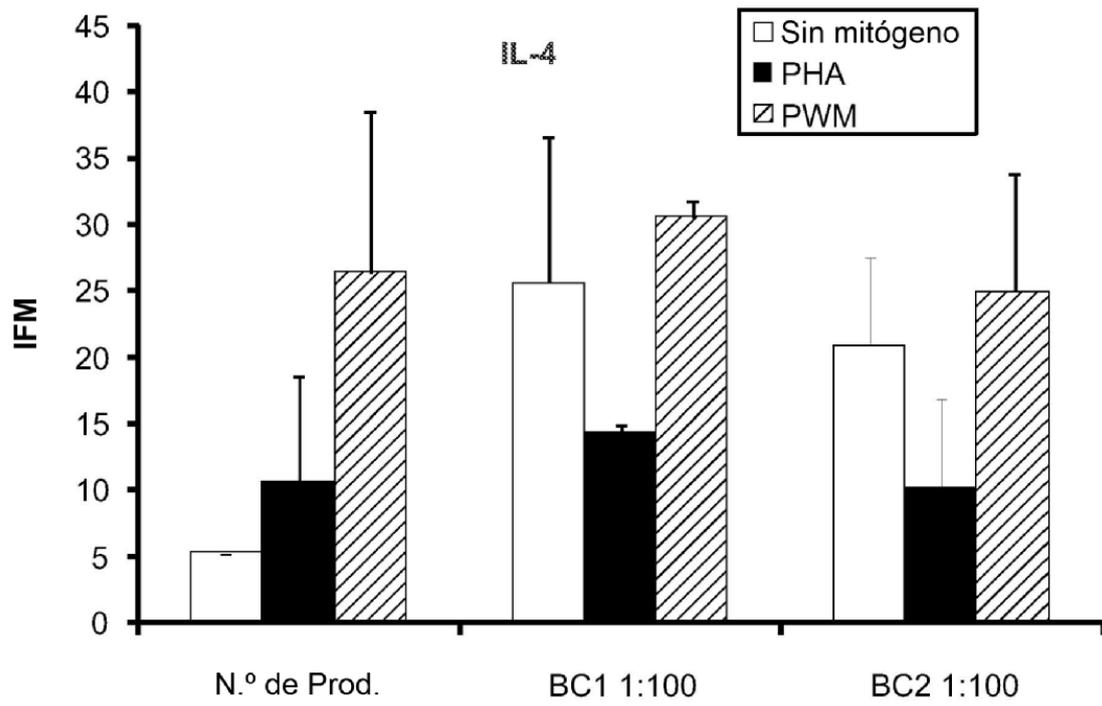


FIG. 22

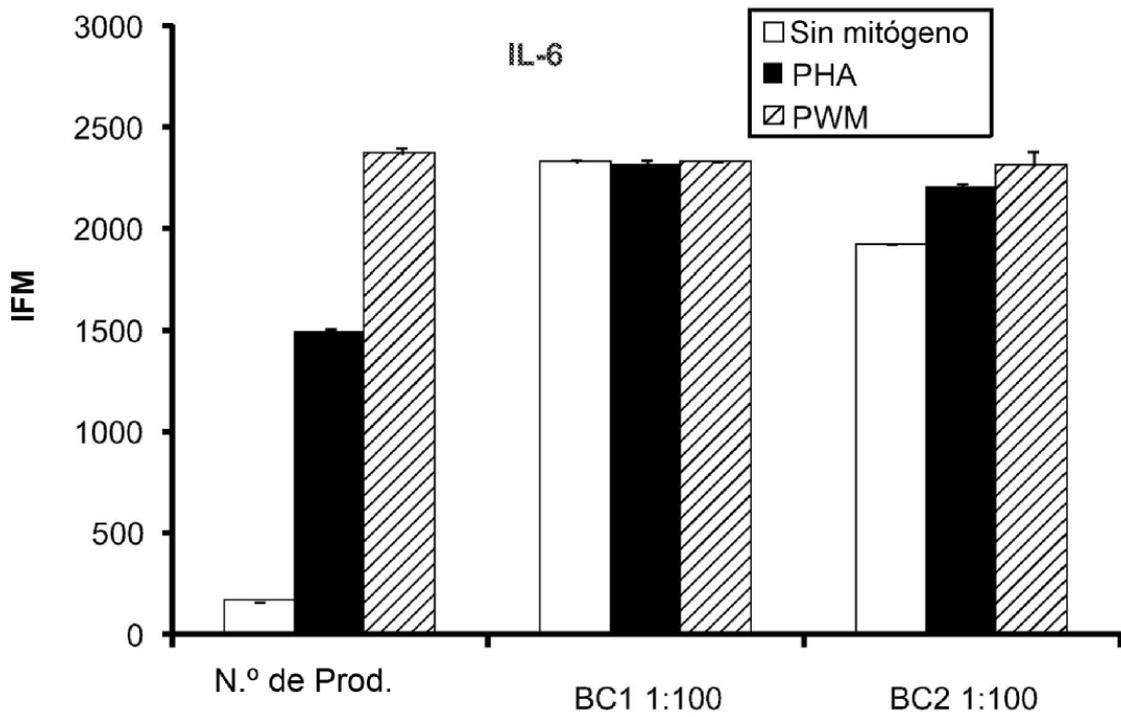


FIG. 23

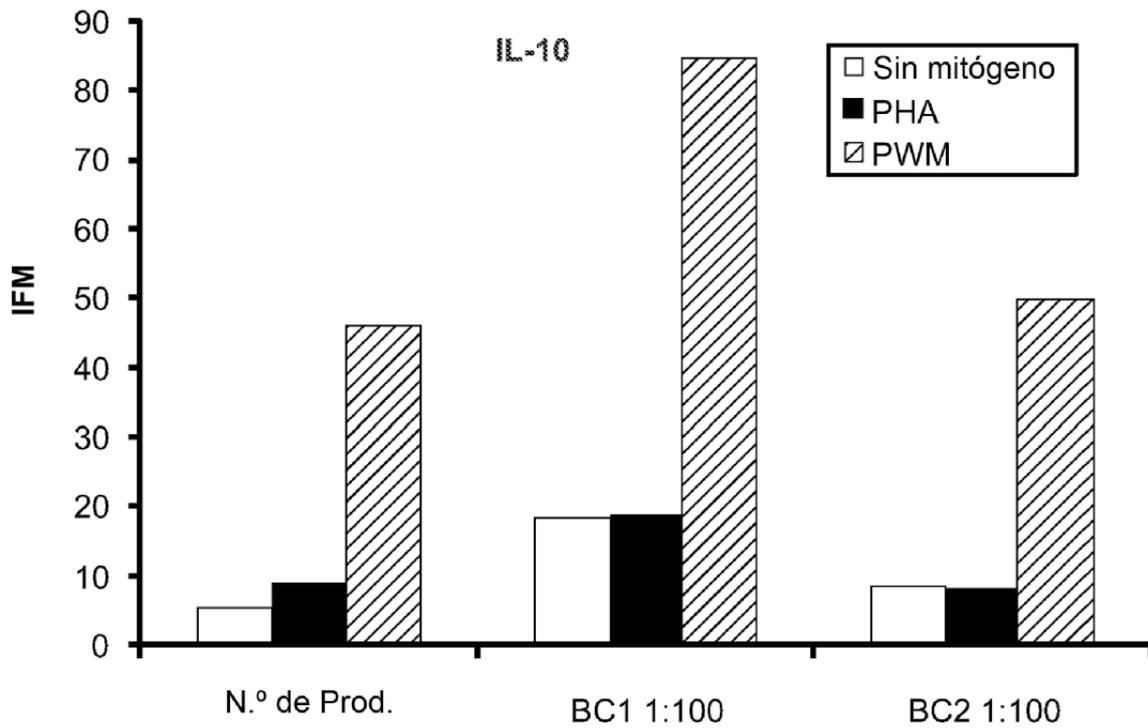


FIG. 24

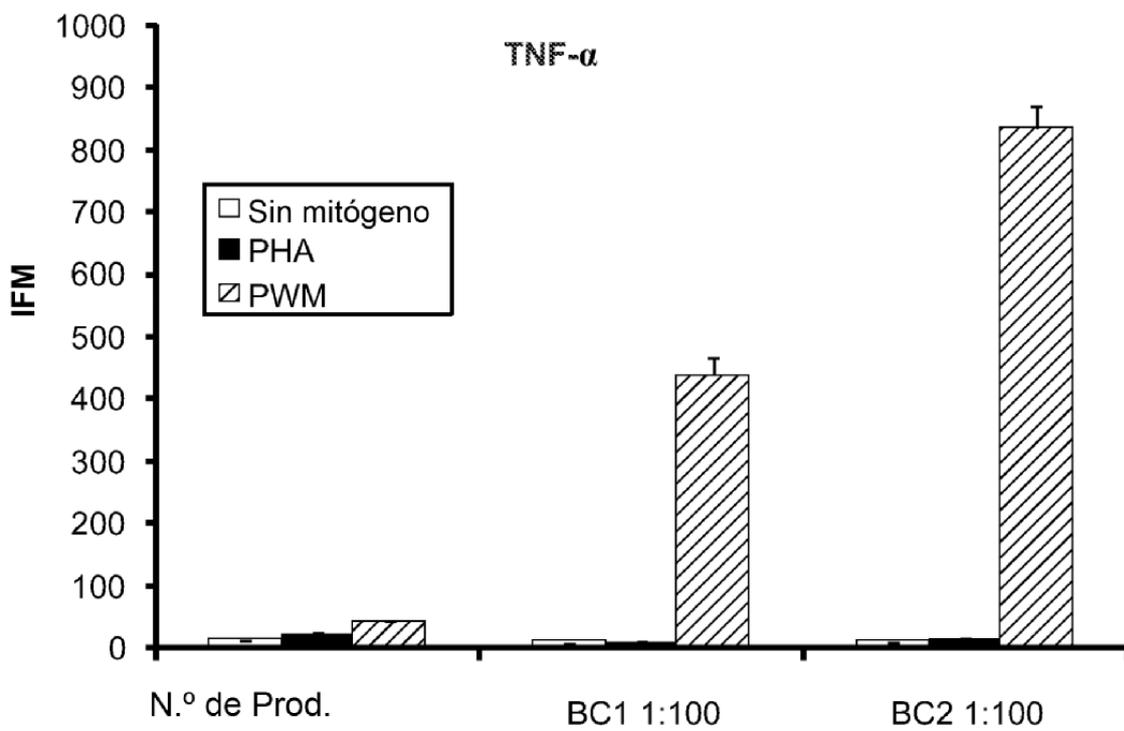


FIG. 25A

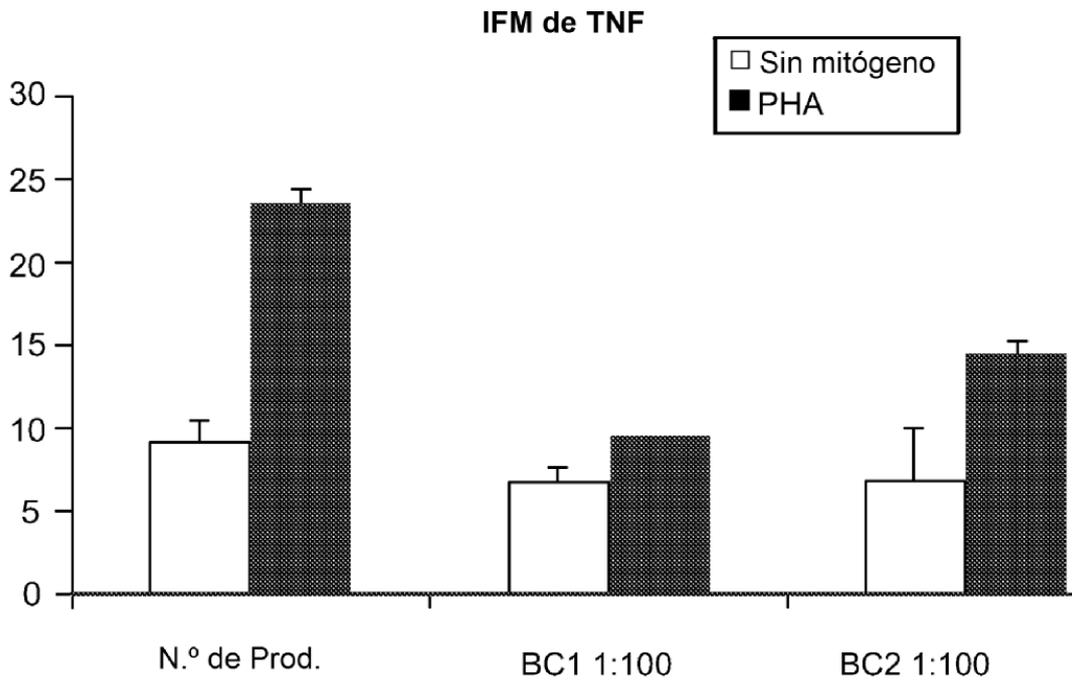


FIG. 25B

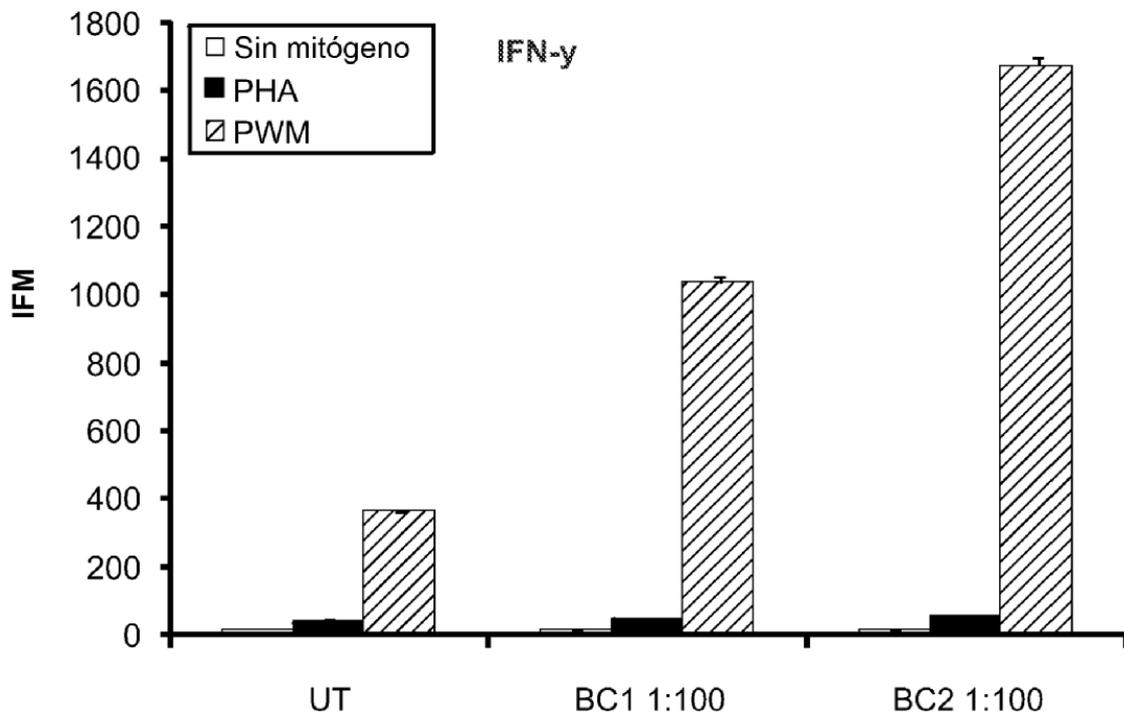
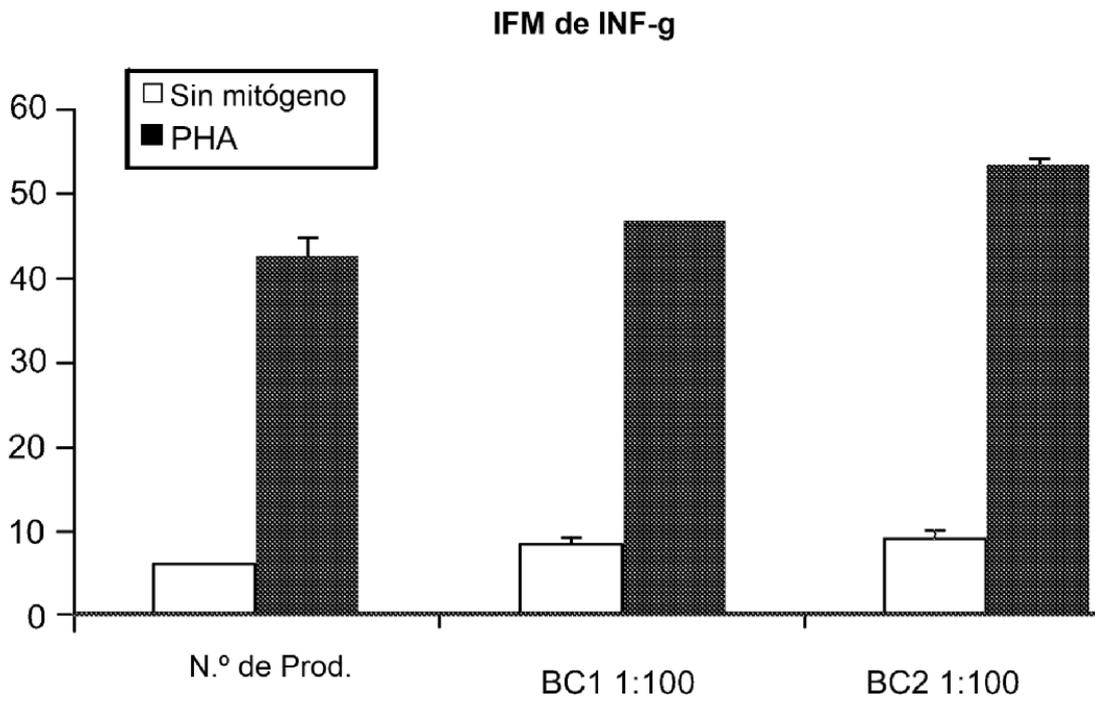
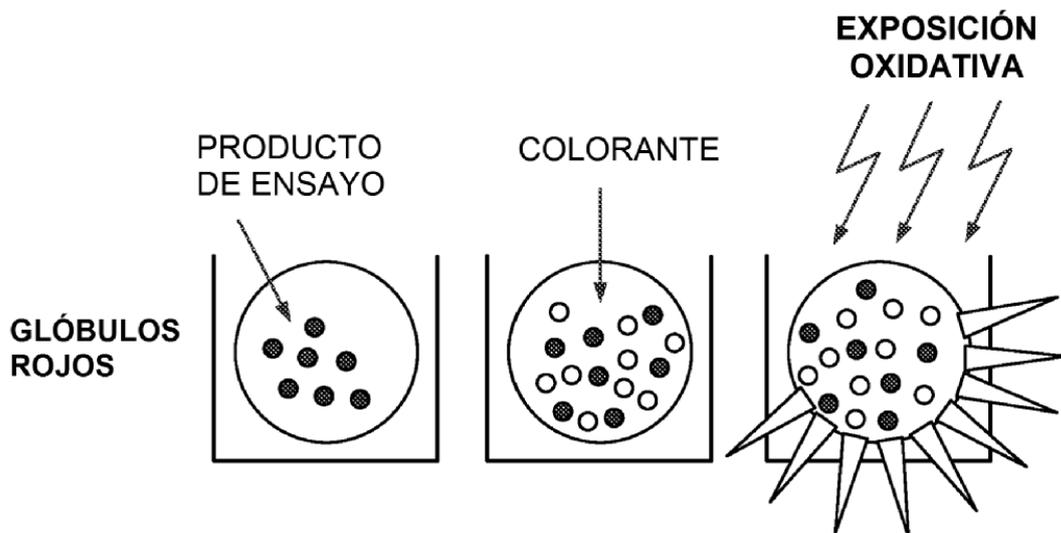


FIG. 26A



**FIG. 26B**



**FIG. 27**

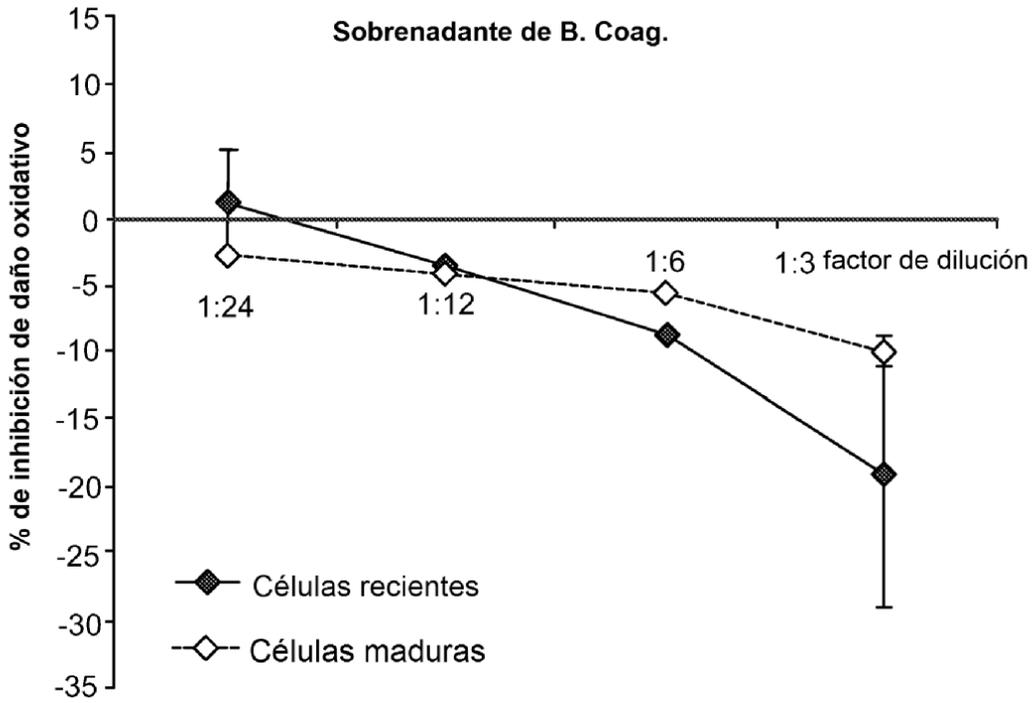


FIG. 28

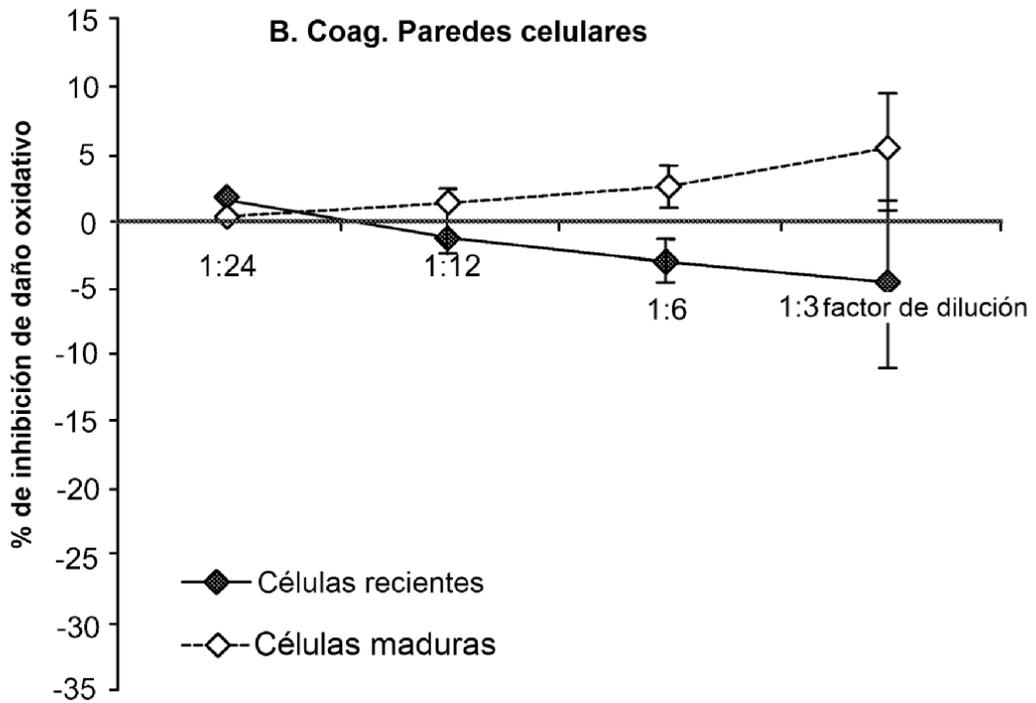


FIG. 29

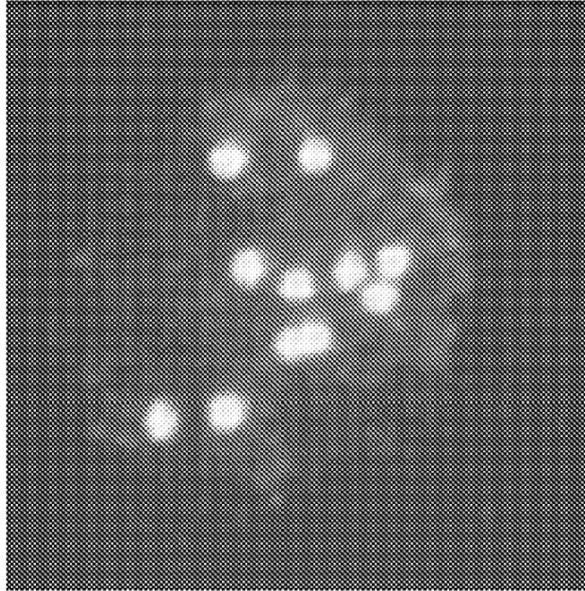


FIG. 30A

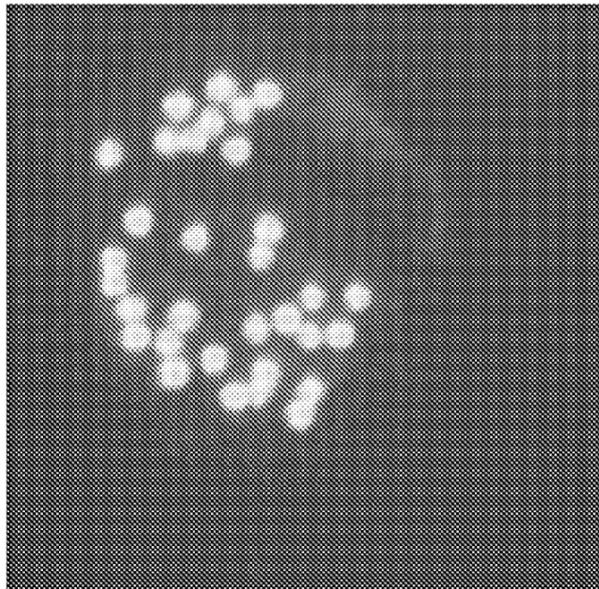
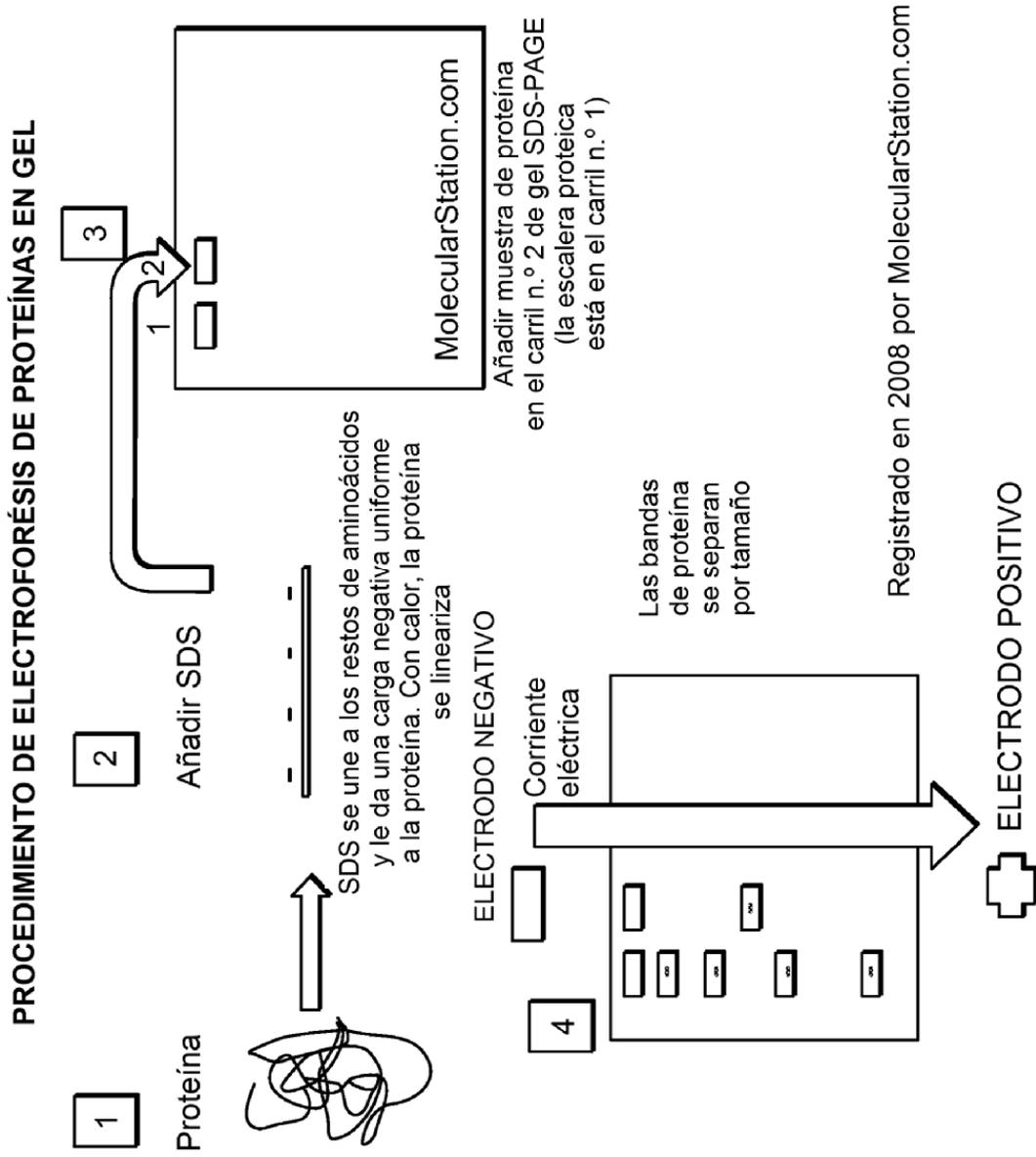


FIG. 30B

FIG. 31



Imagen, cortesía de Molecular station: <http://www.molecularstation.com/images/protein-gel-electrophoresis.jpg>

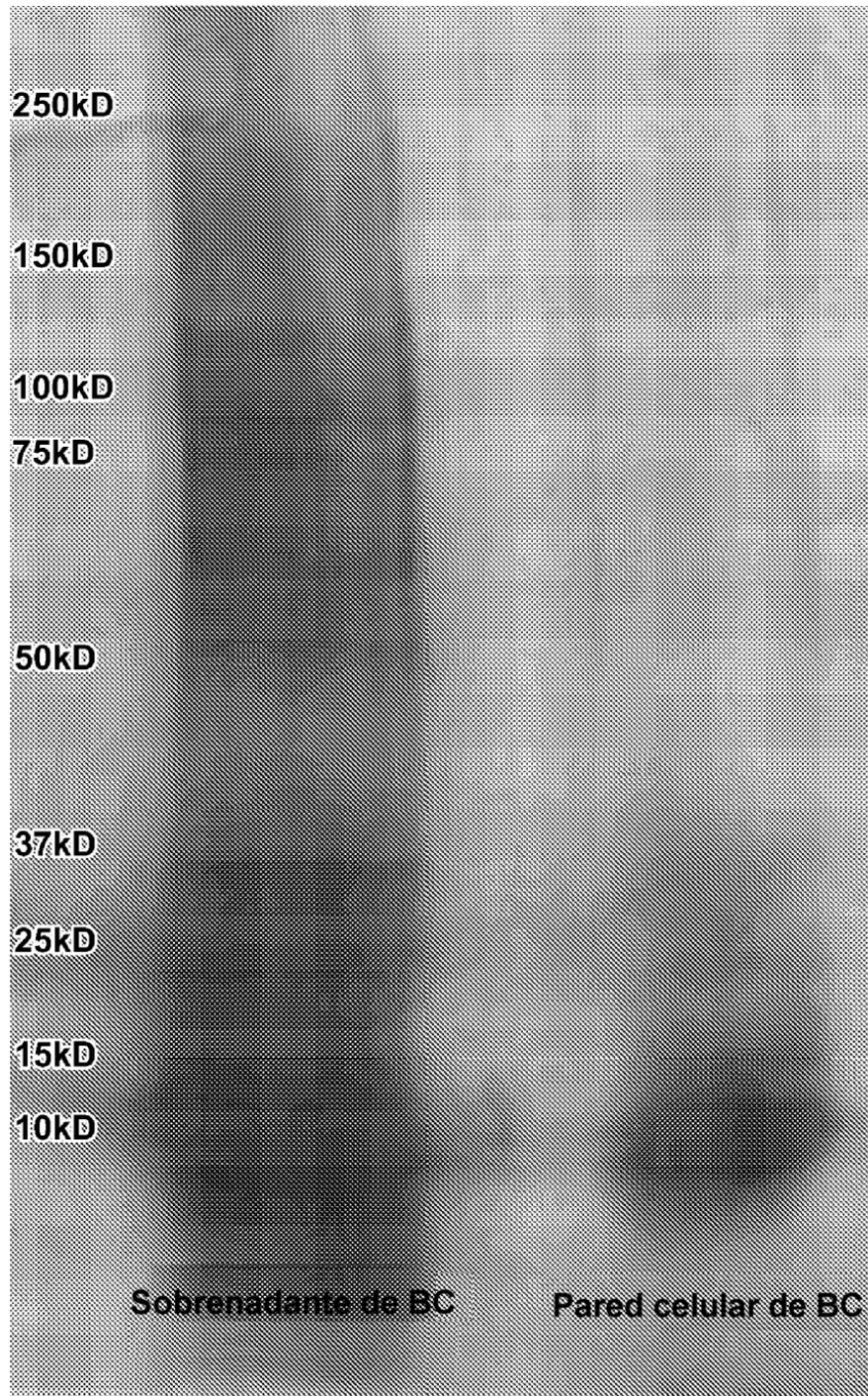


FIG. 32

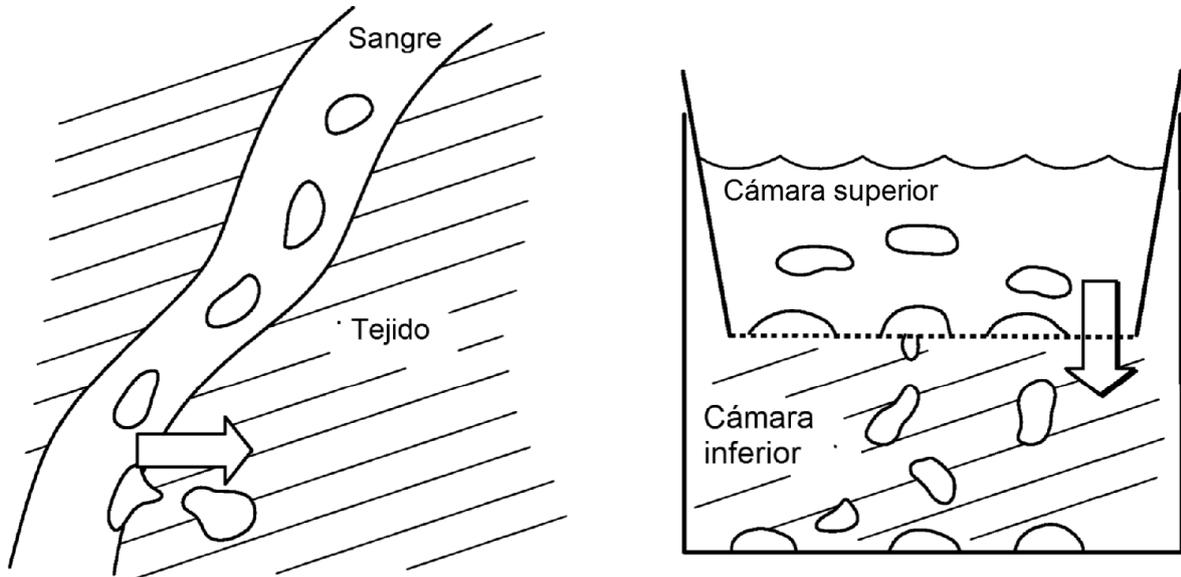


FIG. 33