

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 850**

51 Int. Cl.:

**A23C 9/123** (2006.01)

**A23C 9/152** (2006.01)

**A23C 19/084** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2012 PCT/US2012/042959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12177556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2012 E 12803279 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2734049**

54 Título: **Composiciones y métodos probióticos**

30 Prioridad:

**20.06.2011 US 201161498910 P**

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

**07.08.2018**

73 Titular/es:

**H.J. HEINZ COMPANY BRANDS LLC (100.0%)  
One PPG Place  
Pittsburgh, Pennsylvania 15222, US**

72 Inventor/es:

**BUDELLI, ANDREA;  
FASANO, FRANCESCA ROMANA;  
TERZANO, MIRYAM y  
BRAMATI, LORENZO**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 677 850 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**

Composiciones y métodos probióticos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a organismos probióticos, productos alimentarios preparados con organismos probióticos, y composiciones farmacéuticas que comprenden organismos probióticos. Estas composiciones son útiles en la estimulación del sistema inmunológico de las mucosas y para el tratamiento de trastornos asociados con la inmadurez del sistema inmunológico de las mucosas.

**Antecedentes de la invención**

10 El epitelio intestinal está expuesto constantemente a materiales extraños que pueden ser bien dañinos o bien beneficiosos para el hospedador. Como consecuencia, el sistema inmunológico debe alcanzar un difícil equilibrio entre: 1) proteger frente a respuestas inmunológicas que son inducidas por patógenos o toxinas intestinales y 2) eliminar las respuestas inmunológicas frente a tanto a antígenos alimentarios como frente a los 10<sup>14</sup> microorganismos beneficiosos comensales que residen normalmente en el intestino. La interrupción tanto de las respuestas protectoras como de las respuestas tolerantes pueden dar como resultado una amplia variedad de trastornos que incluyen, por ejemplo, infecciones, inflamación, alergias alimentarias, hipersensibilidad alimentaria, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca, enfermedad periodontal, artritis reumatoide, aterosclerosis y cáncer de colon.

15 La red inmuno-reguladora que comprende el sistema inmunológico intestinal cambia con la edad. La red está poco desarrollada en los recién nacidos y se establece gradualmente a lo largo de los primeros años de vida. La inmadurez del sistema inmunológico juega un papel importante en la prevalencia de las infecciones y en los trastornos alimentarios en lactantes y en niños pequeños. En cambio, la capacidad del sistema inmunológico intestinal para responder a nuevos cambios desciende en los ancianos.

20 Los trastornos gastrointestinales, por ejemplo, infecciones, trastornos inflamatorios y trastornos alimentarios, tales como alergias, intolerancia alimentaria o hipersensibilidad alimentaria, tienen un impacto significativo en la salud y en la calidad de vida tanto en niños como en adultos.

25 Los trastornos gastrointestinales, por ejemplo, infecciones, trastornos inflamatorios y trastornos alimentarios, tales como alergias, intolerancia alimentaria o hipersensibilidad alimentaria, tienen un impacto significativo en la salud y en la calidad de vida tanto en niños como en adultos. La gastroenteritis infecciosa es el trastorno gastrointestinal pediátrico más común. Aproximadamente 1 billón de episodios aparecen en el mundo cada año, más comúnmente en países en desarrollo en niños de menos de 5 años de edad. Las tasas de mortalidad mundial por gastroenteritis infecciosa tienen un promedio de 3 a 6 millones de niños por año. En los Estados Unidos, de 25 a 35 millones de nuevos casos aparecen cada año, dando como resultado de 300 a 400 muertes. Además, la gastroenteritis infecciosa en los EE.UU. dan como resultado 200.000 hospitalizaciones estimadas y 1,5 millones de visitas de pacientes ambulatorios con un coste que excede el billón de dólares. Los trastornos alimentarios, tales como las alergias, también tienen un efecto sustancial tanto sobre la salud de niños como en la de adultos. Los síntomas de las alergias alimentarias pueden variar dependiendo de la gravedad de la alergia y puede oscilar desde una leve sensación de hormigueo alrededor de la boca y de los labios hasta la anafilaxis mortal. Se estima que las alergias alimentarias afectan a entre 1-10% de la población en los EE.UU. El Centro para el Control de Enfermedades encontró que en el 2007, aproximadamente 3 millones de niños menores de 18 años (3,9%) presentaron una alergia alimentaria o una alergia digestiva en los 12 meses anteriores. Para algunos niños, las alergias alimentarias se vuelven menos graves con la edad, para otros, afectan durante toda la vida. Los niños que padecen de alergias en los primeros años de vida pueden desarrollar "marcha alérgica". Por ejemplo, muchos individuos que tienen reacciones alérgicas graves a la leche de vaca durante la infancia corren el riesgo de desarrollar asma después de la niñez. Hay evidencias de que la prevalencia de las alergias alimentarias está aumentando mundialmente.

30 Con independencia de la etiología, los trastornos gastrointestinales no sólo afectan de negativamente a la salud de los niños, sino que tienen un grave impacto sobre la economía familiar, en las interacciones sociales, y en la asistencia escolar y laboral de los padres. Existe una continua necesidad de estrategias terapéuticas que promuevan la salud gastrointestinal, en particular en individuos que padecen de trastornos gastrointestinales o que corren el riesgo de padecerlos.

35 CA 2761691 describe composiciones con cepas probióticas que incluyen *Lactobacillus paracasei*.

EP 1 364 586 se refiere a una fórmula infantil con cepas *Lactobacillus paracasei* y/o *Bifidobacterium lactis*.

40 WO 99/29833 divulga cepas *L. paracasei* para el uso como probióticos; también hay ejemplos de productos fermentados.

**Compendio de la invención**

La presente invención proporciona composiciones que comprenden un producto alimentario fermentado, en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778. El producto alimentario puede ser un producto lácteo o un producto de cereales. Se proporcionan también composiciones que comprenden la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y un vehículo aceptable fisiológicamente. El vehículo aceptable fisiológicamente puede ser un producto alimentario o un vehículo farmacéutico. Se proporcionan también métodos para preparar una composición nutricional, comprendiendo el método: proporcionar un producto alimentario; combinar el producto alimentario con una cantidad eficaz de la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y, opcionalmente, un co-inóculo, para formar una mezcla; e incubar la mezcla a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que ocurra la fermentación. La composición nutricional se puede secar. La composición nutricional se puede combinar con uno o más productos alimentarios adicionales. Para cualquiera de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, las células de *Lactobacillus paracasei* CBA L74 se pueden someter a tratamientos que las vuelvan no replicativas. La concentración de *Lactobacillus paracasei* CBA L74 en las composiciones puede variar dependiendo del uso al que se destinen, por ejemplo, como una composición nutricional o como una composición farmacéutica. Intervalos útiles incluyen el equivalente de aproximadamente  $1 \times 10^2$  unidades formadoras de colonias por gramo ("cfu/g") a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  unidades formadoras de colonias por gramo ("cfu/g") en peso seco.

Se proporcionan también métodos para tratar a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar un trastorno gastrointestinal, comprendiendo el método: identificar a un sujeto que corre el riesgo de padecer un trastorno gastrointestinal; administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un producto alimentario en donde el producto alimentario se ha fermentado por la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778. El trastorno gastrointestinal puede ser un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, para estudiar, un sistema inmunológico inmaduro, una alergia alimentaria, un trastorno asociado a diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome de intestino irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enterocolitis necrotizante o por envejecimiento, particularmente envejecimiento del sistema gastrointestinal.

Se proporcionan también métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno gastrointestinal. Los métodos incluyen: identificar a un sujeto que tiene un trastorno gastrointestinal; administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un producto alimentario en donde el producto alimentario se ha fermentado por la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778. En algunas realizaciones, los métodos incluyen: identificar a un sujeto que tiene un trastorno gastrointestinal; administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778. El trastorno gastrointestinal puede ser un sistema inmunológico deficitario, para examinar, un sistema inmunológico inmaduro, una alergia alimentaria, un trastorno asociado a diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome del intestino irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn o enterocolitis necrotizante.

Se proporcionan también métodos para modular el sistema inmunológico en un sujeto. Los métodos incluyen: identificar un sujeto que necesita la modulación del sistema inmunológico, y administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un producto alimentario en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778.

Se proporcionan también artículos de fabricación. Estos pueden incluir kits que comprenden una cantidad determinada de una composición nutricional que comprende un producto alimentario fermentado, en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778, y uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en el material de envasado, un prospecto que comprende las instrucciones de uso, un fluido estéril, y un envase estéril. En algunas realizaciones, el kit puede incluir una cantidad determinada de una composición farmacéutica que comprende un *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778, y uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en el material de envasado, un prospecto que comprende las instrucciones de uso, un fluido estéril, y un envase estéril.

En los dibujos adjuntos y en la descripción de a continuación se establecen los detalles de una o más realizaciones de la invención. Otras características, objetivos y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características y ventajas de la presente invención se describirán más a fondo, o serán evidentes, mediante la siguiente descripción detallada de la realización preferida de la invención, que se considera junto con los dibujos acompañantes en donde los números se refieren a las partes y en donde además:

La FIG. 1 es una tabla que muestra un análisis del efecto de *L. paracasei* CBA L74 en el fenotipo de células DC.

- La FIG. 2a es una gráfica que representa la producción de IL-10 en células DCs (células dendríticas, de sus siglas en inglés) co-cultivadas con células Caco2 (células de adenocarcinoma de colon humano) expuestas a *L. paracasei* CBA L74. La FIG. 2b es una gráfica que representa la producción de IL-12 en células DCs co-cultivadas con células Caco2 expuestas a *L. paracasei* CBA L74.
- 5 La FIG. 3 es una gráfica que representa la proliferación de células T expuestas a células DCs co-cultivadas con células CaCo2.
- La FIG. 4 es una gráfica que representa la producción de IL-1 $\beta$  en la mucosa intestinal de ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- 10 La FIG. 5 es una gráfica que representa la producción de IL-4 en la mucosa intestinal de ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 6 es una gráfica que representa la producción de IgA en la mucosa intestinal de ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 7 representa un análisis de los niveles de TLR2, TLR4 y TLR9 en la mucosa intestinal de ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- 15 La FIG. 8 representa un análisis de los niveles de PPAR $\gamma$  en la mucosa intestinal de ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 9a es una gráfica que representa los niveles séricos de IL-1 $\beta$  en ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74. La FIG. 9b es una gráfica que representa los niveles séricos de IL-4 de ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- 20 La FIG. 10 es una tabla que muestra un análisis del efecto *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de células DC en ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 11a es una gráfica que representa los fenotipos de linfocitos CD4+ intestinales en ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74. La FIG. 11b es una gráfica que representa los fenotipos de linfocitos CD8+ intestinales en ratones suplementados con *L. paracasei* CBA L74.
- 25 La FIG. 12 es una gráfica que representa la producción de IL-10 en la mucosa intestinal de ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 13 es una gráfica que representa la producción de IL-1 $\beta$  en la mucosa intestinal de ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74.
- 30 La FIG. 14 es una gráfica que representa la producción de IgA en la mucosa intestinal de ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 15 representa un análisis de los niveles de TLR2, TLR4, TLR9 y PPAR $\gamma$  en la mucosa intestinal de ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 16 representa un análisis de los niveles de pNF-kB y IKB $\alpha$  en la mucosa intestinal de ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA.
- 35 La FIG. 17 representa un análisis del efecto de *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de células DC en ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA.
- La FIG. 18 es un análisis del efecto de *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de las células DC después de la exposición a LPS o CpG en ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA.
- 40 La FIG. 19 es una gráfica que representa los fenotipos de linfocitos CD4+ intestinales en ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 20 es una gráfica que representa los fenotipos de linfocitos CD8+ intestinales en ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 21 muestra la evaluación histológica de la mucosa del íleon en ratones suplementados con leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74.
- 45 La FIG. 22 es una gráfica que representa la producción de IL-1 $\beta$  y IL-4 en la mucosa intestinal de ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.
- La FIG. 23 es una gráfica que representa la producción de IL-10 en la mucosa intestinal de ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.

La FIG. 24 es un análisis de los niveles de TLR2 y TLR4 en la mucosa intestinal de ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.

5 La FIG. 25a es un análisis de los niveles de PPAR $\gamma$  en la mucosa intestinal de ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74. La FIG. 25b es un análisis de los niveles de pNF-kB y IKB $\alpha$  en la mucosa intestinal de ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.

La FIG. 26 es una tabla que muestra un análisis del efecto *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de células DC en ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.

10 La FIG. 27 es una tabla que muestra un análisis del efecto *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de células DC después de la exposición a LPS o CpG en ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.

La FIG. 28 es una gráfica que representa los fenotipos de linfocitos CD4+ intestinales en ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.

La FIG. 29 es una gráfica que representa los fenotipos de linfocitos CD8+ intestinales en ratones suplementados con arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74.

15 La FIG. 30 es una gráfica que representa un análisis del efecto de células y del sobrenadante celular de *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-10 en MoDCs (células dendríticas humanas derivadas de monocitos) en presencia de *Salmonella typhimurium*.

La FIG. 31 es una gráfica que representa un análisis del efecto de células y del sobrenadante celular de *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-12p70 en MoDCs humanas en presencia de *Salmonella typhimurium*.

20 La FIG. 32 es una gráfica que representa un análisis del efecto de leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-10 en MoDCs humanas en presencia de *Salmonella typhimurium* y el efecto de inactivación de *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-10 en MoDCs humanas en presencia de *Salmonella typhimurium*.

25 La FIG. 33 es una gráfica que representa un análisis del efecto de leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-12p70 en MoDCs humanas en presencia de *Salmonella typhimurium* y el efecto de inactivación de *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-12p70 en MoDCs humanas en presencia de *Salmonella typhimurium*.

La FIG. 34 es una gráfica que representa un análisis del efecto de arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y IL-10 en el tejido intestinal de un explante modelo en presencia de *Salmonella typhimurium*.

### 30 Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento del inventor de que alimentos fermentados mediante el organismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, puede tener propiedades inmunomoduladoras. Esta cepa se aisló por los inventores y se depositó bajo el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los propósitos del Procedimiento de Patente el 9 de Septiembre, 2008 en las Colecciones Coordinadas Belgas de Micro-organismos (BCCM, de sus siglas en inglés) Laboratorio de Microbiología (LMG), Ghent, Bélgica. El Número de Acceso proporcionado por la Autoridad Depositaria Internacional es LMG P-24778. Para facilitar la lectura, no repetiremos la frase "Número de Acceso LMG P-24778" en cada ocasión. Se entiende que cuando nos referimos a *L. paracasei*, cepa CBA L74, nos referimos a la cepa depositada que tiene el Número de Acceso LMG P-24778.

40 Las composiciones de la invención incluyen el organismo probiótico *L. paracasei* CBA L74. La Organización Mundial de la Salud ha definido a los probióticos como: "Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedador". En algunas realizaciones, la cepa de *L. paracasei* CBA L74 se puede someter a la exposición al calor, desecación, irradiación  $\gamma$ , o irradiación uv, para hacerla no replicativa. Una célula de *L. paracasei* CBA L74 no replicativa puede ser una célula muerta o una célula viva que es incapaz de realizar la división celular. Una célula de *L. paracasei* CBA L74 no replicativa puede ser una célula intacta o una célula que ha experimentado una lisis parcial o completa. En algunas realizaciones, las células no replicativas pueden incluir una mezcla de células intactas y células lisadas.

50 Aunque creemos que comprendemos que ciertos acontecimientos ocurren tras la administración de las composiciones que comprenden o que se producen mediante fermentación con *L. paracasei* CBA L74, las composiciones de la presente invención no se limitan a aquellas que funcionan afectando a cualquier mecanismo celular particular. Nuestra hipótesis de trabajo es que los organismos probióticos o composiciones fermentadas con organismos probióticos pueden proporcionar una mayor barrera para la translocación de bacterias y productos bacterianos a través de la mucosa, excluyendo de manera competitiva a los patógenos potenciales, modificando la respuesta del hospedador a los productos microbianos, y mejorando la nutrición enteral de forma que se inhibe el

crecimiento de patógenos. Los efectos beneficiosos de las composiciones que comprenden organismos probióticos no replicativos pueden derivarse, por ejemplo, de metabolitos producidos durante la fermentación, por ejemplo, ácidos orgánicos, tales como ácido láctico, ácido butírico o ácido acético. Alternativamente o de forma adicional, el ADN microbiano, por ejemplo, dinucleótidos CpG sin metilar, fragmentos de la pared celular bacteriana y otros componentes bacterianos sub-celulares, tales como proteínas, carbohidratos y lípidos, pueden ejercer efectos inmunomoduladores en el sistema inmunológico de las mucosas.

Los inventores han encontrado que *L. paracasei* CBA L74 aislada modula los niveles tanto de marcadores pro- como anti-inflamatorios cuando se ensayó in vitro e in vivo. Por otra parte, también se observaron efectos inmunomoduladores después de la administración de alimentos que se habían fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74. Tales efectos inmunomoduladores se notaron incluso cuando los alimentos fermentados se habían tratado, por ejemplo, por calor, para llevar a cabo *L. paracasei* CBA L74 no replicativo. Por consiguiente, la invención caracteriza a composiciones y métodos que se pueden emplear para estimular el sistema inmunológico intestinal. Las composiciones pueden incluir productos alimentarios que se han fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74. Los productos alimentarios pueden ser una amplia gama de alimentos que son susceptibles de la fermentación mediante *L. paracasei* CBA L74. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir *L. paracasei* CBA L74 aislada y un vehículo fisiológico. El vehículo puede ser un producto alimentario, pero la invención no es tan limitante y en algunas realizaciones el vehículo puede ser un vehículo farmacológico. Se proporcionan también métodos para preparar y emplear las composiciones. Los métodos de la invención incluyen métodos para producir composiciones que comprenden *L. paracasei* CBA L74, métodos de fermentación de productos alimentarios con *L. paracasei* CBA L74 y métodos de administración de las composiciones para generar una respuesta inmunomoduladora en un sujeto. Las composiciones se pueden administrar a un sujeto que tiene un sistema inmunológico inmaduro, a un sujeto que corre riesgo de tener un trastorno gastrointestinal o a un sujeto que tiene un trastorno gastrointestinal. Los métodos se pueden emplear en sujetos humanos, por ejemplo, lactantes y niños, o en medicina veterinaria. Independientemente del sujeto (si es un ser humano o no), cualquiera de los métodos presentes puede incluir una etapa de identificación del sujeto. Por ejemplo, los métodos pueden incluir una etapa para determinar si el sujeto necesita de tratamiento.

## Composiciones

### *Alimentos fermentados*

Las composiciones de la invención incluyen composiciones nutricionales, es decir, productos alimentarios fermentados mediante el organismo probiótico, *L. paracasei* CBA L74. Se puede emplear cualquier producto alimentario susceptible de la fermentación mediante *L. paracasei* CBA L74. El producto alimentario puede ser un producto lácteo, por ejemplo, leche o un producto a base de leche. Ejemplos de fuentes lácteas incluyen, sin limitación, el ganado bovino, ovino, caprino, yaks, búfalo de agua, caballos, burros, renos y camellos. Independientemente de la fuente, la leche o los productos lácteos pueden estar en cualquier forma adecuada para la fermentación mediante *L. paracasei* CBA L74. Por ejemplo, la leche puede ser leche entera o leche que se ha procesado para eliminar parte o toda la grasa láctea, por ejemplo, leche al 2%, leche al 1% o leche sin grasa. Alternativamente o de forma adicional, la leche se puede pasteurizar y/o homogeneizar, secar y reconstituir, condensar o evaporar previamente. Se pueden emplear también partes de los productos lácteos que incluyen caseína, proteína del suero o lactosa. En algunas realizaciones, el producto lácteo puede ser de aproximadamente 1% a aproximadamente 30% de leche desnatada en polvo reconstituida, por ejemplo, aproximadamente 2%, aproximadamente 5%, aproximadamente 7%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 12%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30% de leche desnatada en polvo reconstituida. Antes de la fermentación, el producto lácteo se puede combinar con uno o más de lo siguiente: a) un carbohidrato (por ejemplo, un disacárido, tal como dextrosa o un almidón); b) un lípido; c) una vitamina y d) un mineral. Por ejemplo, la leche desnatada en polvo se puede combinar con dextrosa a aproximadamente el 2%, por ejemplo, aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,50%, aproximadamente 0,75%, aproximadamente 1,0%, aproximadamente 1,5% o aproximadamente 2,0%.

El producto alimentario puede ser un producto de un cereal, por ejemplo, arroz, trigo, avena, cebada, maíz, centeno, sorgo, mijo, o triticale. El producto de cereal puede ser un grano entero o puede molerse para convertirse en harina. El producto de cereal puede ser una única clase de cereal o una mezcla de dos o más clases de cereales, por ejemplo, harina de avena más harina de cebada malteada. Los productos de cereales pueden ser de una calidad y una clase adecuada para el consumo humano o pueden ser productos adecuados para el consumo de animales domésticos. Generalmente, el producto de cereal se hidrata antes de la fermentación. La concentración del cereal puede variar, pero intervalos útiles incluyen de aproximadamente 5% a aproximadamente 50% de peso/volumen, por ejemplo, aproximadamente 8% de peso/volumen, aproximadamente 10% de peso/volumen, aproximadamente 12% de peso/volumen, aproximadamente 15% de peso/volumen, aproximadamente 18% de peso/volumen, aproximadamente 20% de peso/volumen, aproximadamente 22% de peso/volumen, aproximadamente 25% de peso/volumen, aproximadamente 30% de peso/volumen, aproximadamente 35% de peso/volumen, aproximadamente 40% de peso/volumen, aproximadamente 45% de peso/volumen o aproximadamente 50% de peso/volumen. Ejemplos de concentraciones incluyen 15% de peso/volumen de arroz o una mezcla de 18,5% de peso/volumen de harina de avena más 5% de peso/volumen de harina de cebada malteada. El pH de los cereales hidratados se puede ajustar empleando cualquier ácido adecuado para el consumo. El ácido puede ser, por ejemplo,

un ácido orgánico. Ácidos orgánicos útiles incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido adípico, ácido málico y ácido tartárico. Se puede emplear cualquier combinación de dos o más ácidos. En algunas realizaciones, el pH se puede ajustar a aproximadamente 4,0 empleando ácido cítrico.

5 El producto alimentario puede ser también un producto vegetal o una fruta, por ejemplo, un zumo, un puré, un concentrado, una pasta, una crema, una salmuera o una salsa de tomate. Ejemplos de vegetales y de frutas incluyen, sin limitación, calabazas, por ejemplo, calabacines, calabaza amarilla, calabaza de invierno, calabaza; patatas, espárragos, brócoli, coles de Bruselas, judías, por ejemplo, judías verdes, frijoles, frijoles lima, habas, soja, repollo, zanahorias, coliflor, pepinos, colinabo, puerros, cebolletas, cebollas, guisantes mollaes, guisantes ingleses, pimientos, nabos, nabos suecos, tomates, manzanas, peras, melocotones, ciruelas, fresas, frambuesas, moras, arándanos azules, arándanos rojos, bayas de Boysen, grosellas espinosas, uvas, grosellas, naranjas, limones, pomelo, bananas, mangos, kiwi, y carambola.

10 El producto alimentario puede ser también una "leche" producida a partir de granos ("leche" de cebada, avena o espelta), frutos secos ("leche" de almendra, anacardo, coco, avellana o nuez), legumbres ("leche" de soja, cacahuete, guisante o altramuces) o semillas ("leche" de semilla de quinoa, sésamo o girasol)

15 Se contemplan también productos alimentarios que comprenden proteínas animales, por ejemplo, carne, por ejemplo, salchichas, carnes secas, pescado y productos de pescado seco.

Independientemente del tipo de producto alimentario que se use, el producto se combina con *L. paracasei* CBA L74 y se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que ocurra la fermentación. Se puede emplear cualquier método de fermentación estándar conocido en la técnica. Las condiciones de fermentación específicas variarán según muchos factores que incluyen, por ejemplo, el tipo de producto alimentario, la concentración del producto alimentario, la instrumentación que se utilice, el volumen de la muestra, la concentración inicial del inóculo de *L. paracasei* CBA L74, la presencia, si es necesaria, de un co-inóculo, las propiedades organolépticas del alimento fermentado, y del uso previsto del alimento fermentado.

20 Antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74 se esterilizan tanto la instrumentación como el sustrato (es decir, el producto alimentario a fermentar) para disminuir, o eliminar, el nivel de bacterias y/o hongos viables y/o virus infecciosos. La instrumentación se puede esterilizar empleando cualquiera de los métodos estándar o según las instrucciones del fabricante. La elección de un método particular para la esterilización del sustrato dependerá, en parte, de la estabilidad del sustrato al método de esterilización. Por ejemplo, el sustrato se puede esterilizar mediante vapor y presión, por ejemplo, mediante autoclave, exposición a ciclos repetidos de calor y frío (por ejemplo, tindalización), exposición a altas presiones (por ejemplo, pascalización), ultrafiltración, o radiación (por ejemplo, exposición a rayos gamma, rayos x, haces de radiación y/o radiación ultra-violeta (longitud de onda de 10 nm a 320 nm, por ejemplo, de 50 nm a 320 nm, de 100 nm a 320 nm, de 150 nm a 320 nm, de 180 nm a 320 nm, o de 200 nm a 300 nm). Después del tratamiento se pueden eliminar las alícuotas del sustrato y colocarlas en un medio adecuado para confirmar la ausencia de bacterias y/o hongos contaminantes. Si el sustrato se ha esterilizado mediante exposición a altas temperaturas, se deberá enfriar a al menos 37°C antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74.

25 El sustrato se puede inocular con *L. paracasei* CBA L74 según los métodos estándar, por ejemplo, a partir del cultivo líquido fresco o del cultivo liofilizado que se ha resuspendido en medio acuoso durante un tiempo corto antes de la inoculación. En general, el *L. paracasei* CBA L74 se añade a concentraciones de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml de sustrato, por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml, aproximadamente  $2 \times 10^6$  ufc/ml, aproximadamente  $5 \times 10^6$  ufc/ml,  $7 \times 10^6$  ufc/ml, o  $8 \times 10^6$  ufc/ml. El cultivo se debe agitar lo suficientemente como para producir una distribución relativamente uniforme de las bacterias y del sustrato, pero no excesivamente ya que *L. paracasei* CBA L74 es una bacteria anaeróbica. Por ejemplo, un cultivo de cinco litros se puede agitar a aproximadamente 150 rpm. La temperatura de fermentación generalmente es a 37°C. Durante la fermentación se pueden monitorear, y por consiguiente, ajustar, varios parámetros, por ejemplo, el pH, la presión parcial de O<sub>2</sub>, la velocidad de agitación, temperatura, mezcla de gas, nivel de espuma y concentración de sustrato. Se puede monitorear el crecimiento de *L. paracasei* CBA L74 empleando métodos microbiológicos estándar. La fermentación se lleva a cabo hasta que la concentración de *L. paracasei* CBA L74 está entre aproximadamente  $10^8$ /ml y aproximadamente  $10^9$ /ml. Dependiendo del sustrato y de otras condiciones, esta concentración se puede alcanzar en aproximadamente 10 a aproximadamente 30 horas después de la inoculación, por ejemplo, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas.

Las muestras del sustrato se pueden ensayar para el control de calidad antes, durante y después de la fermentación empleando métodos microbiológicos estándar. Ejemplos de métodos incluyen, pero no se limitan a, crecimiento en agar Rogosa para *L. paracasei* CBA L74, crecimiento para recuento en placa agar (PCA, de sus siglas en inglés) para el total de aerobios, crecimiento en agar McConkey para coliformes, crecimiento en agar reforzado para clostridios (RCM, de sus siglas en inglés). Además del recuento de colonias, se pueden observar morfologías de colonias y compararlas con las muestras de referencia.

En algunas realizaciones, se puede añadir un co-inóculo junto con el *L. paracasei* CBA L74 para ayudar a iniciar la fermentación. Co-inóculos útiles para la fermentación de productos lácteos incluyen, por ejemplo, sin limitación, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, subsp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, o *Leuconostoc mesenteroides*. En general, la concentración del co-inóculo será menor que la de *L. paracasei* CBA L74, por ejemplo, aproximadamente  $1 \times 10^4$ /ml x  $10^5$ /ml. La concentración final de *S. thermophilus* puede oscilar de aproximadamente  $0,5 \times 10^8$ /ml a aproximadamente  $2,5 \times 10^8$ /ml.

#### Productos alimentarios

Una vez que se han conseguido concentraciones adecuadas de *L. paracasei* CBA L74, el alimento fermentado se puede procesar adicionalmente para su uso. En algunas realizaciones, el pH del alimento fermentado se puede ajustar, por ejemplo, de aproximadamente 3,0 a cerca de la neutralidad, por ejemplo, 6,5, con la adición de NaOH o KOH. En algunas realizaciones el alimento fermentado se puede secar. El producto alimentario fermentado se puede secar mediante cualquier método conocido en la técnica que den como resultado la retención de las propiedades inmunomoduladoras del alimento fermentado. Ejemplos de métodos de secado incluyen el secado por pulverización, secado por congelación, por ejemplo, liofilización, o en un tambor de secado. El contenido de agua final del producto alimentario fermentado puede variar pero puede estar entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10% o más. En algunas realizaciones, el proceso de secado puede conseguir el *L. paracasei* CBA L74 no replicativo.

Los alimentos fermentados secos se pueden hidratar antes de su uso. Dependiendo de la cantidad de líquido que se emplee en la hidratación, los productos alimentarios fermentados pueden contener el equivalente a aproximadamente  $10^2$  y  $10^{12}$  ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. El *L. paracasei* CBA L74 seco no forma colonias, por lo que se entiende que esta cantidad se calcula en base al número de bacterias vivas que se presentaban en los alimentos fermentados antes de la etapa de secado. En algunas realizaciones, los productos alimentarios fermentados pueden incluir el equivalente de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{12}$  ufc/g, por ejemplo, aproximadamente  $5 \times 10^7$  ufc/g, aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^8$  ufc/ml, aproximadamente  $1 \times 10^9$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^9$  ufc/g, aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  ufc/g, aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  ufc/g en peso seco.

Antes de la administración se pueden combinar dos o más productos alimentarios fermentados preparados mediante los métodos de la invención. Por ejemplo, se pueden combinar productos lácteos fermentados con productos de cereales fermentados. Alternativamente, el producto alimentario fermentado se puede combinar con otros productos alimentarios, por ejemplo, productos alimentarios no fermentados o productos alimentarios fermentados empleando otras cepas bacterianas. Se puede emplear cualquier combinación que proporcione que se mantengan las propiedades inmunomoduladoras del alimento fermentado. Ejemplos de productos alimentarios incluyen, sin limitación, productos lácteos, por ejemplo, leche, yogurt, cuajada, queso y productos a base de queso, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, polvos a base de leche, fórmulas infantiles, alimentos infantiles colados a base de leche, helado, gelato, pudines, sopas, salsas, purés, o aliños, fórmulas nutricionales para ancianos; productos de cereales, por ejemplo, pabulum, alimentos infantiles colados a base de cereales, avena, harina, sémola, polenta, pasta, galletas, crackers, barritas energéticas; productos vegetales, por ejemplo, purés, alimentos infantiles colados a base de vegetales, verduras escabechadas que incluyen pepinos, calabaza, zanahorias, judías, pimientos, o aliños; productos de frutas, por ejemplo alimentos infantiles colados a base de fruta, productos de tomate, purés, salsas, pastas, salsa de tomate, purés de fruta; o productos a base de proteínas, por ejemplo, legumbres, salchichas, carnes curadas, perritos calientes, o carnes trituradas. En algunas realizaciones el alimento fermentado se puede combinar con alimentos para mascotas o comidas para animales.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir fermentos de *L. paracasei* CBA L74, a partir de los cuales se han eliminado todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74. Los métodos para separar las células del medio de crecimiento son bien conocidos en la técnica y pueden depender de métodos físicos, por ejemplo, centrifugación para producir un sedimento celular y un sobrenadante de cultivo, filtración, ultrafiltración, filtración de flujo tangencial, filtración de flujo normal u ósmosis inversa. Alternativamente o de forma adicional, el método de separación se puede basar en el ligando e incluye, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a *L. paracasei* CBA L74. El anticuerpo se puede unir a un soporte sólido, tal como una perla magnética.

#### Aislado de *L. paracasei* CBA L74

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención incluyen *L. paracasei* CBA L74 que se aísla parcial o sustancialmente del medio en las que crecen. El *L. paracasei* CBA L74 puede estar vivo o no replicarse, por ejemplo, inactivado, por ejemplo, mediante tratamiento por calor. Las células se pueden liofilizar o secarse mediante congelación bajo condiciones que preservan la viabilidad celular. Los métodos de liofilización son bien conocidos en la técnica.

#### Vehículos fisiológicos

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden incluir *L. paracasei* CBA L74 aislada en combinación con un vehículo aceptable fisiológicamente. El *L. paracasei* CBA L74 puede estar vivo o no replicarse, por ejemplo, inactivado, por ejemplo, mediante tratamiento con calor. La dosis puede variar, pero puede oscilar del equivalente de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^{12}$  ufc/g, por ejemplo,  $1 \times 10^2$  ufc/g,  $5 \times 10^2$  ufc/g,  $1 \times 10^3$  ufc/g,  $5 \times 10^3$  ufc/g,  $1 \times 10^4$  ufc/g,  $5 \times 10^4$  ufc/g,  $1 \times 10^5$  ufc/g,  $5 \times 10^5$  ufc/g,  $1 \times 10^6$  ufc/g,  $5 \times 10^6$  ufc/g,  $1 \times 10^7$  ufc/g,  $5 \times 10^7$  ufc/g,  $1 \times 10^8$  ufc/g,  $5 \times 10^8$  ufc/g,  $1 \times 10^9$  ufc/g,  $5 \times 10^9$  ufc/g,  $1 \times 10^{10}$  ufc/g,  $5 \times 10^{10}$  ufc/g,  $1 \times 10^{11}$  ufc/g,  $5 \times 10^{11}$  ufc/g,  $1 \times 10^{12}$  ufc/g en peso seco.

El vehículo aceptable fisiológicamente puede ser un alimento o un producto alimentario. El *L. paracasei* CBA L74 se puede añadir a un alimento o producto alimentario antes de su envasado o procesamiento. Alternativamente o de forma adicional, el *L. paracasei* CBA L74 aislado se puede añadir a un alimento o producto alimentario antes de su consumo. Por ejemplo, el *L. paracasei* CBA L74 aislado se puede combinar con cualquiera de los alimentos o de los productos alimentarios descritos anteriormente. El producto alimentario puede ser un producto alimentario fermentado o un producto alimentario no fermentado. Por ejemplo, el *L. paracasei* CBA L74 aislado se puede añadir a un producto lácteo o de cereal no fermentado. En algunas realizaciones, el *L. paracasei* CBA L74 se puede añadir a un alimento o producto alimentario para incluir el equivalente de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $10^{12}$  ufc/g, por ejemplo, aproximadamente  $5 \times 10^7$  ufc/g, aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^8$  ufc/g, aproximadamente  $1 \times 10^9$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^9$  ufc/g, aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  ufc/g, aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  ufc/g, aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  ufc/g en peso seco.

#### *Vehículos farmacéuticos*

Las composiciones incluyen también un vehículo aceptable farmacéuticamente. Nosotros empleamos los términos "aceptable farmacéuticamente" (o "aceptable farmacológicamente") para referirnos a entidades moleculares y a composiciones que no producen un efecto adverso, alergia u otra reacción perjudicial cuando se administra a un animal o a un ser humano, según sea apropiado. El término "vehículo aceptable farmacéuticamente", como se emplea en la presente memoria, incluye a cualquier y todos los disolventes, medio de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, isotónicos y agentes que retrasan la absorción, tampones, excipientes, aglutinantes, lubricantes, geles, tensioactivos y similares, que se pueden emplear como medio para una sustancia aceptable farmacéuticamente.

Esta invención incluye también composiciones farmacéuticas que contienen, como el ingrediente activo, el *L. paracasei* CBA L74 descrito en la presente memoria, en combinación con uno o más vehículos aceptables farmacéuticamente. En algunas realizaciones, el *L. paracasei* CBA L74 se puede esterilizar empleando técnicas de esterilización convencional antes o después de que se combine con el vehículo aceptable farmacéuticamente. En la fabricación de las composiciones de la invención, el *L. paracasei* CBA L74 se mezcla normalmente con un excipiente, diluido mediante un excipiente o encerrado dentro de dicho vehículo en forma de, por ejemplo, una cápsula, comprimido, sobre, papelillo, u otro envase. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido, o líquido (por ejemplo, solución salina normal), que actúa como un vehículo, transportador o medio para el ingrediente activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, papelillos, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles. Como se conoce en la técnica, el tipo de diluyente puede variar dependiendo de la ruta de administración prevista. Las composiciones resultantes pueden incluir agentes adicionales, tales como conservadores. El excipiente o vehículo se selecciona en base al modo y la vía de administración. Vehículos farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para el uso en las formulaciones farmacéuticas, se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (E. W. Martin), un texto de referencia bien conocido en este campo, y en la USP/NF (Farmacopea y Formulario Nacional de los Estados Unidos). Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y agentes de suspensión; agentes conservadores, tales como metilbenzoatos y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes saborizantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente mediante el empleo de procedimientos conocidos en la técnica.

Composiciones aceptables farmacéuticamente para emplear en los presentes métodos, incluyendo a aquellas en las que *L. paracasei* CBA L74 está atrapado en un coloide para su administración oral, se pueden preparar según técnicas estándar. El *L. paracasei* CBA L74 se puede secar y compactar mediante trituración o pulverización e insertándolo en una cápsula para administración oral. En algunas realizaciones, el *L. paracasei* CBA L74 se puede combinar con uno o más excipientes, por ejemplo, un disgregante, un relleno, un deslizante, o un conservador. Cápsulas adecuadas incluyen tanto cápsulas de capa dura como a cápsulas de capa blanda. Para formar la cápsula se puede emplear cualquier coloide de base lipídica o de base polimérica. Ejemplos de polímeros útiles para preparaciones coloidales incluyen gelatina, polisacáridos vegetales o sus derivados, tal como carragenatos y formas modificadas de almidón y celulosa, por ejemplo, hypromelosa. Opcionalmente, se pueden añadir otros ingredientes a la disolución del agente gelificante, por ejemplo, plastificantes, tales como glicerina y/o sorbitol para disminuir la

dureza de la cápsula, agentes colorantes, conservadores, disgregantes, lubricantes y tratamiento de superficie. En algunas realizaciones, la cápsula no incluye gelatina. En otras realizaciones, la cápsula no incluye polisacáridos vegetales o sus derivados.

5 Independientemente de su fuente original o de la manera en la que se obtengan, el *L. paracasei* CBA L74 de la invención se puede formular de acuerdo con su uso. Estas composiciones se pueden preparar en una manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y se pueden administrar mediante una variedad de vías, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico en el área a tratar. La administración puede ser oral o tópica (incluyendo la oftálmica y las membranas de mucosas que incluyen la administración intranasal, vaginal y rectal). En algunas realizaciones, la administración puede ser pulmonar (por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica) u ocular. Métodos para la administración ocular pueden incluir la administración tópica (gotas oculares), inyección subconjuntival, periocular o intravítreal o la introducción mediante un catéter con globo o insertos oftálmicos colocados quirúrgicamente en el saco conjuntival. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, la administración intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede estar en forma de una dosis en bolo única, o puede ser, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión continua. Composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos, polvos, y similares. Pueden ser deseables o necesarios vehículos farmacéuticos convencionales acuosos, en polvo o bases oleosas, espesantes y similares.

20 Las composiciones se pueden formular en forma de dosis unitaria, conteniendo cada dosis, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 2000 mg de *L. paracasei* CBA L74 por dosis diaria. El término "formas de dosis unitaria" se refiere a unidades discretas físicamente adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Para preparar composiciones sólidas, tal como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se refiere a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo normalmente se dispersa uniformemente a través de la composición para que la composición se pueda subdividir fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces, tal como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide después en formas de dosificación unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, 0,005 mg a aproximadamente 1000 mg de *L. paracasei* CBA L74 de la presente invención.

35 Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosis, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1 mg; de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo.

50 En algunas realizaciones, los comprimidos o píldoras de la presente invención se pueden recubrir o componer de otra manera para proporcionar una forma de dosificación que permita la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una dosis interna y un componente de dosis externa, estando el último en forma de envoltorio sobre el primero. Los dos componentes se pueden separar mediante una capa entérica que sirve para resistir a la disgregación en el estómago, y que permite al componente interno pasar intacto al duodeno o retrasarse en la liberación. Se pueden emplear para dichas capas o recubrimientos entéricos una variedad de materiales, tales materiales incluyen un número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con tales materiales como goma laca, alcohol cetílico, y acetato de celulosa.

55 Las formas líquidas en las que se pueden incorporar las composiciones de la presente invención para la administración oral o mediante inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes saborizados adecuadamente, suspensiones acuosas y oleosas, y emulsiones saborizadas con aceites comestibles, tal como aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco, o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

60 La proporción o concentración de las composiciones de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de un número de factores que incluyen la dosis, características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad),

y la vía de administración. Por ejemplo, el *L. paracasei* CBA L74 de la invención se puede proporcionar en una cápsula que contiene de aproximadamente 0,005 mg gramo a aproximadamente 1000 mg para administración oral. Alternativamente o de forma adicional, la dosis se puede expresar como ufc/g en peso seco. La dosis puede variar, pero puede oscilar del equivalente de aproximadamente  $10^2$  a aproximadamente  $10^{12}$  ufc/g, por ejemplo,  $1 \times 10^2$  ufc/g,  $5 \times 10^2$  ufc/g,  $1 \times 10^3$  ufc/g,  $5 \times 10^3$  ufc/g,  $1 \times 10^4$  ufc/g,  $5 \times 10^4$  ufc/g,  $1 \times 10^5$  ufc/g,  $5 \times 10^5$  ufc/g,  $1 \times 10^6$  ufc/g,  $5 \times 10^6$  ufc/g,  $1 \times 10^7$  ufc/g,  $5 \times 10^7$  ufc/g,  $1 \times 10^8$  ufc/g,  $5 \times 10^8$  ufc/g,  $1 \times 10^9$  ufc/g,  $5 \times 10^9$  ufc/g,  $1 \times 10^{10}$  ufc/g,  $5 \times 10^{10}$  ufc/g,  $1 \times 10^{11}$  ufc/g,  $5 \times 10^{11}$  ufc/g,  $1 \times 10^{12}$  ufc/g en peso seco.

#### Métodos de uso

Las composiciones descritas en la presente memoria son normalmente útiles de diferentes maneras para la estimulación de una respuesta inmunomoduladora en el sistema inmunológico de las mucosas. Los sujetos para los que es beneficiosa tal estimulación incluyen a aquellos que tienen un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, por ejemplo, aquellos que tienen un sistema inmunológico inmaduro, tal como lactantes o niños pequeños, aquellos que tienen un sistema inmunológico deprimido, tal como los ancianos, pacientes que toman fármacos inmunosupresores, radiación o quimioterapia, aquellos que tienen un sistema inmunológico hiperactivado debido a alergias o trastornos autoinmunes y aquellos que padecen de trastornos gastrointestinales. Los trastornos gastrointestinales pueden incluir infecciones debido a virus, por ejemplo, rotavirus; bacterias patogénicas, por ejemplo, *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Listeria*, *Clostridium*, *E. coli*, *E. sakazaki*, *H. pylori*; o protozoos patogénicos, por ejemplo, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium spp*, *Campylobacter spp*. Los trastornos gastrointestinales también pueden incluir, por ejemplo, alergias alimentarias, hipersensibilidad alimentaria, síndrome del intestino irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, pouchitis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca, enterocolitis necrotizante, y envejecimiento, en particular el envejecimiento del sistema gastrointestinal.

Un sujeto se trata eficazmente siempre que se genere un resultado beneficioso clínicamente. Esto puede significar, por ejemplo, una resolución completa de los síntomas asociados con un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, un descenso en la gravedad de los síntomas asociados con un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, o un enlentecimiento de la progresión de los síntomas asociados con un sistema inmunológico de las mucosas deficitario. Estos métodos pueden incluir además las etapas de a) identificar a un sujeto (por ejemplo, un paciente y, más específicamente, un paciente humano) que tiene un sistema inmunológico de las mucosas deficitario; y b) proporcionar al sujeto una composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 descrito en la presente memoria, tal como cualquier producto alimentario fermentado o composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 en un vehículo aceptable fisiológicamente. Se considera una cantidad eficaz terapéuticamente a una cantidad de tal composición proporcionada al sujeto que da como resultado una resolución completa de los síntomas asociados con un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, un descenso en la gravedad de los síntomas asociados con un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, o un enlentecimiento de la progresión de los síntomas con el sistema inmunológico de las mucosas deficitario. Los presentes métodos pueden incluir también una etapa de monitorización para ayudar a optimizar la dosis y la programación, así como predecir los resultados.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden aplicar a una amplia variedad de especies, por ejemplo, a seres humanos, a primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, cerdos, vacas u otro ganado, perros, gatos u otros mamíferos utilizados como mascotas, ratas, ratones, u otros animales de laboratorio. Las composiciones descritas en la presente memoria son útiles en composiciones y regímenes terapéuticos o para la fabricación de un medicamento para el uso en el tratamiento de condiciones como las que se describen en la presente memoria (por ejemplo, un sistema inmunológico de las mucosas deficitario debido a inmadurez, envejecimiento, infección, alergias alimentarias, un trastorno inflamatorio o autoinmune).

Las composiciones nutricionales descritas en la presente memoria se pueden administrar oralmente como parte de la dieta diaria normal de un sujeto. Las composiciones alimentarias se pueden administrar como soporte nutricional tanto a niños como a adultos. Cuando las composiciones se formulan como composiciones farmacéuticas se pueden administrar a cualquier parte del cuerpo del hospedador para su posterior reparto a una célula diana. Una composición se puede suministrar a, sin limitación, el cerebro, el fluido cerebroespinal, articulaciones, mucosa nasal, sangre, pulmones, intestinos, tejidos musculares, piel, o a la cavidad peritoneal de un mamífero. En términos de vías de suministro, una composición se puede administrar por inyección intravenosa, intracraneal, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intramuscular, intrarrectal, intravaginal, intratecal, intratraqueal, intradérmica, o transdérmica, por administración oral o nasal, o por perfusión gradual a lo largo del tiempo. En un ejemplo adicional, se puede proporcionar a un hospedador una preparación en aerosol mediante inhalación.

Independientemente de si las composiciones se formulan como productos alimentarios o como productos farmacéuticos, la dosis requerida dependerá de la vía de administración, de la naturaleza de la formulación, de la naturaleza de la condición del sujeto, por ejemplo, inmadurez del sistema inmunológico o un trastorno gastrointestinal, el tamaño del sujeto, peso, área superficial, edad, y sexo, otros fármacos administrados, y el criterio de los médicos que lo atienden. Dosis adecuadas están en el intervalo de 0,01-1.000 mg/kg. Algunas dosis típicas oscilan de aproximadamente  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  a aproximadamente  $1 \text{ g}/\text{kg}$  de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de la dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, la dosis puede ser, por ejemplo, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg o 100 mg/kg. La dosis probablemente dependa de tales variables como del tipo y de la extensión de la progresión de

la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente en particular, de la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente, y de su vía de administración.

Se pueden extrapolar dosis eficaces a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales. Por ejemplo, análisis in vitro de producción de citoquina mediante células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) pueden ser útiles para ensayar respuestas pro- y anti-inflamatorias, por ejemplo, secreción de IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-4, TNF- $\alpha$ , o IL-10 respectivamente. Las composiciones se pueden analizar también por los efectos en modelos animales, por ejemplo, la producción de IgA, la producción de citoquinas mediante explantes de placas de Peyer, y las respuestas de células dendríticas y de células T.

En vista de la variedad de dianas celulares y de las diferentes eficacias de las distintas vías de administración, cabe esperar variaciones amplias en la dosis necesaria. Las variaciones de estos niveles de dosificación se pueden ajustar empleando procedimientos empíricos estándar para la optimización, así como es bien conocido en la técnica. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (por ejemplo, 2- o 3-, 4-, 6-, 8-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150-, o más veces). La encapsulación de los compuestos en un vehículo de suministro adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) pueden aumentar la eficacia del reparto.

La duración del tratamiento con cualquier composición proporcionada en la presente memoria puede ser de cualquier magnitud de tiempo desde apenas un día hasta durante toda la vida del hospedar (por ejemplo, muchos años). Por ejemplo, una composición se puede administrar una vez a la semana (durante, por ejemplo, 4 semanas a muchos meses o años); una vez al mes (por ejemplo, de tres a doce meses o durante muchos años); o una vez al año durante un periodo de 5 años, diez años, o más. Cabe destacar también que la frecuencia del tratamiento puede ser variable. Por ejemplo, las presentes composiciones se pueden administrar una vez (o dos veces tres veces, etc) a diario, semanalmente, al mes, o al año. Cuando las composiciones se formulan como productos alimentarios, por ejemplo, las composiciones se pueden administrar a diario en cada comida.

Para determinar si se induce una respuesta particular se puede emplear cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se puede emplear métodos clínicos que pueden valorar el grado de un estado de enfermedad en particular para determinar si se induce una respuesta. Por ejemplo, un sujeto se puede monitorear por el alivio sintomático, por ejemplo, alivio de cólico, diarrea, estreñimiento, náuseas, vómitos, dolor abdominal, calambres, acidez, distensión abdominal, flatulencia, o incontinencia. Alternativamente o de forma adicional, se pueden emplear marcadores séricos, técnicas de imágenes, por ejemplo, métodos de ultrasonido, rayos-x, y endoscópicos.

Las composiciones se pueden administrar también junto con otras modalidades terapéuticas. Las otras modalidades terapéuticas variarán según el trastorno en particular, pero pueden incluir, por ejemplo, medicamentos anti-diarreicos, anti-eméticos, agentes anti-colinérgicos, agentes anti-inflamatorios, antibióticos, anti-histamínicos y otros tratamientos dietéticos, por ejemplo, fórmulas infantiles hipoalergénicas. La administración simultánea de dos o más agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren a la vez o mediante la misma vía, siempre y cuando haya un solapamiento en el periodo de tiempo durante el que los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla una administración simultánea o secuencial, como una administración en diferentes días o semanas.

### **Fabricación de artículos**

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden ensamblar también en kits, junto con las instrucciones de uso. Por consiguiente, están también dentro del alcance de la invención productos envasados (por ejemplo, envases que contienen uno o más composiciones de *L. paracasei* CBA L74 descritas en la presente memoria y envasados para el almacenamiento, transporte o venta en concentrados o concentraciones listas para usar) y kits, que incluyen al menos un compuesto de la invención y las instrucciones de uso. En cualquiera de los productos envasados o kits, las composiciones de *L. paracasei* CBA L74 pueden incluir *L. paracasei* CBA L74 no replicativo. Por ejemplo, los kits pueden incluir determinadas cantidades de una composición nutricional que incluye uno o más productos alimentarios fermentados con *L. paracasei* CBA L74. Las instrucciones de uso se pueden comunicar mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, se pueden imprimir en un papel impreso en uno o más lenguajes o facilitarse de forma audible o visual (por ejemplo, en un disco compacto). Los materiales de envasado pueden incluir materiales de envasado, por ejemplo, viales, sobres, envases. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir determinadas cantidades de una composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 en un vehículo aceptable fisiológicamente junto con materiales de envasado y las instrucciones de uso en cualquiera de los formatos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir envases que contienen uno o más composiciones de *L. paracasei* CBA L74, por ejemplo *L. paracasei* CBA L74 y un vehículo farmacéutico, y uno o más de un estabilizador adecuado, molécula transportadora, saborizante, y/o similares, según sea apropiado para el uso previsto. Un producto puede incluir un envase (por ejemplo, un vial, frasco, botella, bolsa, o similar) que contiene uno o más composiciones de *L. paracasei* CBA L74. Además, la fabricación de un artículo puede incluir de forma adicional, por ejemplo, materiales de envasado, instrucciones de uso, jeringas, tampones u otros reactivos control para tratar o monitorear la condición para la que se requiere la profilaxis o tratamiento. El producto puede incluir también una leyenda (por ejemplo, una etiqueta o prospecto impreso u otro medio que describa el uso del producto (por ejemplo, un audio o cinta de vídeo)). La leyenda se puede asociar con el envase (por ejemplo, pegada al

- 5 envase) y puede describir la manera en la que se deberá administrar el producto (por ejemplo, la frecuencia y la vía de administración), indicaciones correspondientes, y otros usos. Los componentes del kit pueden ser adecuados para su uso inmediato. Los compuestos pueden ser fáciles para la administración (por ejemplo, presentarse en unidades adecuadas de dosis), y pueden incluir un adyuvante aceptable farmacéuticamente, vehículo u otro diluyente y/o un agente terapéutico adicional. La invención comprende kits que, sin embargo, incluyen formulaciones concentradas y/o materiales que pueden requerir dilución antes de su uso. Alternativamente, los compuestos se pueden proporcionar en una forma concentrada con un diluyente e instrucciones para la dilución. Los componentes del kit pueden ser adecuados para su uso inmediato. La invención comprende kits que, sin embargo, incluyen formulaciones concentradas y/o materiales que pueden requerir la dilución antes de su uso.
- 10 La invención se describirá a continuación por medio de las siguientes cláusulas preferidas:
1. Una composición que comprende un producto alimentario fermentado, en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778.
  - 15 2. La composición de la cláusula 1, en donde el producto alimentario es un producto lácteo o un producto de cereal.
  3. La composición de la cláusula 2, en donde el producto lácteo es leche, yogurt, cuajada, queso o una fórmula infantil.
  4. La composición de la cláusula 2, en donde el producto de cereal es arroz, trigo, avena, cebada, maíz, sorgo, mijo, o triticale.
  - 20 5. La composición de cualquiera de las cláusulas 1-4, en donde el producto alimentario está seco.
  6. La composición de cualquiera de las cláusulas 1-5, en donde el producto seco está rehidratado.
  7. La composición de la cláusula 6, en donde el producto alimentario seco rehidratado es inmunomodulador.
  8. La composición de cualquiera de las cláusulas 1-7, en donde la bacteria probiótica es no replicativa.
  - 25 9. La composición de cualquiera de las cláusulas 1-8, en donde el producto alimentario comprende de aproximadamente  $1 \times 10^2$  ufc/g a aproximadamente  $10^{12}$  ufc de bacteria probiótica por gramo en peso seco.
  10. Una composición que comprende la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y un vehículo aceptable fisiológicamente.
  11. La composición de la cláusula 10, en donde el vehículo aceptable fisiológicamente es un producto alimentario.
  - 30 12. La composición de la cláusula 11, en donde el producto alimentario es un producto lácteo o un producto de cereal.
  13. La composición de la cláusula 12, en donde el producto lácteo es leche, yogurt, cuajada, queso o una fórmula infantil.
  - 35 14. La composición de la cláusula 12, en donde el producto de cereal es arroz, trigo, avena, cebada, maíz, sorgo, mijo, o triticale.
  15. La composición de cualquiera de las cláusulas 10-14, en donde el producto alimentario está seco.
  16. La composición de cualquiera de las cláusulas 10-15, en donde el producto seco está rehidratado.
  17. La composición de la cláusula 16, en donde el producto alimentario rehidratado es inmunomodulador.
  18. La composición de cualquiera de las cláusulas 10-17, en donde la bacteria probiótica es no replicativa.
  - 40 19. La composición de cualquiera de las cláusulas 10-18, en donde el producto alimentario comprende de aproximadamente  $1 \times 10^2$  ufc/g a aproximadamente  $10^{12}$  ufc de bacteria probiótica por gramo en peso seco.
  20. La composición de la cláusula 10, en donde el vehículo aceptable fisiológicamente es un vehículo aceptable farmacéuticamente.
  - 45 21. La composición de la cláusula 20, en donde el vehículo aceptable farmacéuticamente comprende un coloide de base lipídica o de base polimérica.
  22. La composición de la cláusula 21, en donde el coloide es un liposoma, un hidrogel, una micropartícula, una nanopartícula o una micela copolímera en bloque.

23. La composición de la cláusula 21, en donde el coloide de base polimérica es una cápsula.
24. La composición de cualquiera de las cláusulas 20-23, en donde la bacteria probiótica es no replicativa.
25. La composición de cualquiera de las cláusulas 20-24, en donde la bacteria probiótica está en una forma de dosificación unitaria de aproximadamente  $1 \times 10^2$  ufc/g a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  ufc/g en peso seco.
- 5 26. La composición de cualquiera de las cláusulas 20-25, en donde la composición se formula para la administración oral.
27. Un método para fabricar una composición nutricional, comprendiendo el método:
- a) proporcionar un producto alimentario;
- 10 b) combinar el producto alimentario con una cantidad eficaz de la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y, opcionalmente, un co-inóculo, para formar una mezcla;
- c) incubar la mezcla a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que ocurra la fermentación.
- 15 28. El método de la cláusula 27, en donde el producto alimentario es un producto lácteo o un producto de cereal.
29. El método de la cláusula 27 ó 28, en donde la cantidad de la bacteria probiótica es de aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml a aproximadamente  $5 \times 10^6$  ufc/ml.
30. El método de cualquiera de las cláusulas 27-29, en donde el co-inóculo es *Streptococcus thermophilus*.
- 20 31. El método de la cláusula 30 en donde la cantidad del co-inóculo es de aproximadamente  $1 \times 10^4$  ufc/ml a aproximadamente  $1 \times 10^5$  ufc/ml.
32. El método de cualquiera de las cláusulas 27-31, en donde la etapa de incubación continua hasta que el nivel de bacteria probiótica en la mezcla alcanza de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  ufc/ml.
33. El método de cualquiera de las cláusulas 27-32, que comprende además secar la composición nutricional.
- 25 34. El método de la cláusula 33, en donde la etapa de secado es secado por atomización.
35. El método de cualquiera de las cláusulas 27-34, en donde la composición nutricional se combina además con uno o más productos alimentarios adicionales.
- 30 36. El método de la cláusula 35, en donde el producto alimentario adicional comprende un producto lácteo, un producto de cereal, un producto basado en un vegetal, un producto basado en una fruta o un producto basado en una proteína.
37. El método de la cláusula 36, en donde el producto basado en una fruta comprende un producto de tomate.
38. Un método para modular el sistema inmunológico en un sujeto, comprendiendo el método:
- a) identificar a un sujeto que necesita de la modulación del sistema inmunológico;
- 35 b) administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un producto alimentario en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778.
39. El método de la cláusula 38, en donde el producto alimentario comprende el producto alimentario de cualquiera de las cláusulas 1-19.
40. El método de la cláusula 38 ó 39, en donde el sujeto es un niño humano.
- 40 41. Un método para tratar a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar un trastorno gastrointestinal, comprendiendo el método:
- a) identificar a un sujeto que corre el riesgo de tener un trastorno gastrointestinal;
- 45 b) administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un producto alimentario en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778.

42. El método de la cláusula 41, en donde el producto alimentario comprende el producto alimentario de cualquiera de las cláusulas 1-19.
- 5 43. El método de la cláusula 41, en donde el trastorno gastrointestinal es un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, una alergia alimentaria, un trastorno asociado con diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome intestinal irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca o enterocolitis necrotizante.
44. El método de la cláusula 43, en donde el sistema inmunológico de las mucosas deficitario es un sistema inmunológico inmaduro.
45. El método de cualquiera de las cláusulas 41-44, en donde el sujeto es un niño humano.
- 10 46. Un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno gastrointestinal, comprendiendo el método:
- a) identificar a un sujeto que tienen un trastorno gastrointestinal;
- b) administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un producto alimentario en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778.
- 15 47. El método de la cláusula 46, en donde el producto alimentario comprende el producto alimentario de cualquiera de las cláusulas 1-19.
48. El método de la cláusula 46, en donde el trastorno gastrointestinal es un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, una alergia alimentaria, un trastorno asociado con diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome intestinal irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca o enterocolitis necrotizante.
- 20 49. El método de la cláusula 48, en donde el sistema inmunológico de las mucosas deficitario es un sistema inmunológico inmaduro.
50. El método de cualquiera de las cláusulas 46-49, en donde el sujeto es un niño humano.
51. Un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno gastrointestinal, comprendiendo el método:
- 25 a) identificar a un sujeto que tienen un trastorno gastrointestinal;
- b) administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778.
- 30 52. El método de la cláusula 51, en donde la composición farmacéutica comprende la composición de cualquiera de las cláusulas 20-26.
53. El método de la cláusula 51, en donde el trastorno gastrointestinal es un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, una alergia alimentaria, un trastorno asociado con diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome intestinal irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca o enterocolitis necrotizante.
- 35 54. El método de la cláusula 53, en donde el sistema inmunológico de las mucosas deficitario es un sistema inmunológico inmaduro.
55. El método de cualquiera de las cláusulas 51-54, en donde el sujeto es un niño humano.
56. El uso de la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 para la preparación de un producto alimentario para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal.
- 40 57. El uso de la cláusula 56, en donde el producto alimentario comprende el producto alimentario de cualquiera de las cláusulas 1-19.
58. El uso de las cláusulas 56 ó 57, en donde el trastorno gastrointestinal es un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, una alergia alimentaria, un trastorno asociado con diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome intestinal irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca o enterocolitis necrotizante.
- 45 59. El uso de la cláusula 58, en donde el sistema inmunológico de las mucosas deficitario es un sistema inmunológico inmaduro.

60. El uso de cualquiera de las cláusulas 56-59, en donde el sujeto es un niño humano.
61. El uso de la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno gastrointestinal.
- 5 62. El uso de la cláusula 61, en donde la composición farmacéutica comprende la composición de cualquiera de las cláusulas 20-26.
63. El uso de la cláusula 61, en donde el trastorno gastrointestinal es un sistema inmunológico de las mucosas deficitario, una alergia alimentaria, un trastorno asociado con diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome intestinal irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca o enterocolitis necrotizante.
- 10 64. El uso de la cláusula 63, en donde el sistema inmunológico de las mucosas deficitario es un sistema inmunológico inmaduro.
65. El uso de cualquiera de las cláusulas 61-64, en donde el sujeto es un niño humano.
66. La composición nutricional producida mediante el método de cualquiera de las cláusulas 27-37.
- 15 67. Un kit que comprende una cantidad determinada de una composición nutricional que comprende un producto alimentario fermentado, en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y uno o más artículos seleccionados del grupo que consiste en un material de envasado, un prospecto que comprende instrucciones de uso, un fluido estéril, una jeringa y un envase estéril.
- 20 68. Un kit que comprende una cantidad determinada de una composición farmacéutica que comprende *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y uno o más artículos seleccionados del grupo que consiste en material de envasado, un prospecto que comprende instrucciones de uso, un fluido estéril y un envase estéril.

### Ejemplos

#### 25 Ejemplo 1: Aislamiento y caracterización de *L. paracasei* CBA-174

30 Analizamos diferentes cepas de *Lactobacilli* por su capacidad de fermentar suspensiones acuosas que contienen diferentes concentraciones de harina de arroz o harina de trigo. *L. paracasei* CBA L74 se seleccionó para el análisis adicional en base a sus valores de pH bajos y a los altos recuentos de UFC. Esta cepa se depositó bajo el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los propósitos del Procedimiento de Patente el 9 de Septiembre, 2008 en la Colecciones Coordinadas Belgas de Micro-organismos (BCCM) Laboratorio de Microbiología (LMG), Ghent, Bélgica. El Número de Acceso proporcionado por la Autoridad Depositaria Internacional es LMG P-24778.

#### Ejemplo 2: Preparación de leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74

Condiciones:

- 35
- Sustrato: leche en polvo desnatada reconstituida al 9%, dextrosa añadida al 0,25%
  - Tratamiento del sustrato por calor: UHT – 135°C durante 3s o F<sub>0</sub> equivalente
  - Co-inóculo: 5 x 10<sup>6</sup> para *Lactobacillus paracasei* CBA-L74  
5 x 10<sup>4</sup> para *Streptococcus thermophilus* (como iniciador de la fermentación)
- 40
- Temperatura de fermentación: 37°C
  - Tiempo de fermentación: 15 horas
  - pH durante la fermentación: sin ajustar
  - Al final de la fermentación el pH se ajusta a 6,5 con una disolución de NaOH
  - Secado por atomización con una temperatura de entrada de 190°C y una temperatura de salida de 90°C
- 45
- Análisis: Recuento de células en el fermentado para determinar *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus paracasei* CBA-L74

Revestimiento: se usó agar selectivo para Lactobacilli (LBS, de sus siglas en inglés) para la detección de *Lactobacillus paracasei* CBA-L74. Se usó agar L-M17 para los recuentos de *Streptococcus thermophilus*. Ambos se incubaron a 37°C de manera anaerobia. Se empleó el recuento en placa agar (PCA) para la detección de los contaminantes y se incubó a 30°C de manera aerobia.

5 Fermentación: Se añadieron co-inóculos de *L. paracasei* CBA L74 y *S. thermophilus* 1773 como cultivos frescos. La fermentación se llevó a cabo durante 15 horas, a una concentración de  $10^8$  ufc/ml de *L. paracasei* CBA-L74. El pH inicial era de 6,6. Al final de la fermentación el pH era 5,1. El pH se ajustó a 6,5 mediante la adición de NaOH 2,5 N. La concentración inicial de *L. paracasei* CBA-74 era  $5 \times 10^6$  ufc/ml; la  
 10 concentración final era de más de  $10^8$  ufc/ml. La concentración inicial de *Streptococcus thermophilus* era  $5 \times 10^4$  ufc/ml; la concentración final era  $1 \times 10^8$  ufc/ml. El recuento total de bacterias inicial en PCA era 0 en la leche antes de la inoculación y a T0 se contaban muy pocas colonias (TFTC, de sus siglas en inglés), después de un período de fermentación de 15 horas era  $5 \times 10^4$  ufc/ml; la concentración final era  $1 \times 10^8$  ufc/ml.

15 Secado: El fermento se secó a una temperatura de entrada de 190°C y una temperatura de salida de 90°C. El contenido de humedad del polvo después del secado por atomización era 4,87%.

Ejemplo 3: Preparación de harina de avena y cebada fermentadas con *L. paracasei* CBA L74

Preparamos un litro de disolución de harina de avena 18,5% (p/vol) + harina de cebada malteada 5% (p/p), empleando 185 g de harina de avena y 9,25 g de harina de cebada malteada. La mezcla de harina y agua se ajustó a pH 4,00 con ácido cítrico 0,5 M. El fermentador se esterilizó por autoclave, después se añadió al  
 20 fermentador la mezcla de harina + agua + ácido cítrico.

La mezcla se trató por calor a 80°C durante 30 minutos y después se enfrió a 37°C. Se ensayaron tres grupos de condiciones de fermentación diferentes. Todas la fermentaciones terminaron después de 16 horas, un tiempo que coincidió con el fin de la fase logarítmica de crecimiento.

25 Ensayo 1: A la disolución de cereal tratada con calor se añadió con *L. paracasei* CBA L74 a una concentración final de  $2,3 \times 10^6$  ufc/ml y se incubó con agitación a 37°C. Después de 16 horas el recuento en placa MRS era  $7,6 \times 10^8$  ufc/ml (bacterias de ácido láctico); los contaminantes medidos en PCA, MC y SB estaban por debajo de 1000 ufc/ml. El pH final era 3,8. Después de 20 horas el recuento en placa MRS era  $1,2 \times 10^8$  ufc/ml (bacterias de ácido láctico); los contaminantes estaban ausentes. Después de 24 horas  
 30 el recuento en placa MRS era  $5 \times 10^8$  ufc/ml (bacterias de ácido láctico); los contaminantes estaban ausentes. Debido a que la fase logarítmica se detiene a las 16 horas, era preferible parar la fermentación a las 16 horas.

35 Ensayo 2 (pH estabilizado): Esta fermentación se llevó a cabo manteniendo el pH a 4 empleando NaOH 2N. Se añadió *L. paracasei* CBA L74 a la disolución de cereal tratado por calor hasta una concentración final de  $2,1 \times 10^6$  ufc/ml y se incubó con agitación a 37°C. Después de 16 horas el recuento en placa MRS era  $7,5 \times 10^8$  ufc/ml (bacterias de ácido láctico); los contaminantes medidos en PCA, MC y SB estaban por debajo de 1000 ufc/ml.

40 Ensayo 3 (pH estabilizado): Esta fermentación se llevó a cabo manteniendo el pH a 4 empleando NaOH 2N. Se añadió *L. paracasei* CBA L74 a la disolución de cereal tratado por calor hasta una concentración final de  $5,1 \times 10^6$  ufc/ml y se incubó con agitación a 37°C. Después de 16 horas el recuento en placa MRS era  $2,1 \times 10^9$  ufc/ml (bacterias de ácido láctico); los contaminantes medidos en PCA, MC y SB estaban por debajo de 1000 ufc/ml.

Ejemplo 4: Preparación de harina de arroz y trigo fermentadas con *L. paracasei* CBA L74

45 Preparamos un litro de disolución de arroz 15% peso/volumen combinando 150 g de arroz y 900 ml de agua. La mezcla se preparó a temperatura ambiente y se mezcló mediante agitación durante varios minutos a 1000-1300 rpm. La mezcla de arroz se trató mediante tindalización calentando la mezcla dentro del instrumento a 70°C, inanición a 70°C durante 20-30 minutos, enfriando a 30-37°C, inanición a 30-37°C durante 20-30 minutos, calentando a 70°C, inanición a 70°C durante 20-30 minutos, enfriando a la temperatura de fermentación (37°C) mientras se agita a 150-600 rpm.

50 A la muestra liofilizada se añadió *L. paracasei* CBA L74 hasta una concentración final de  $1 \times 10^6$  ufc/ml. La muestra liofilizada se resuspendió en agua y se incubó brevemente a 37°C para activar las bacterias. Después de la inoculación, la mezcla se homogeneizó mediante breve agitación a 300-600 rpm; durante la fermentación la disolución se agitó a 150 rpm. La fermentación se llevó a cabo a 37°C durante 24 horas a una  $pO_2$  de < 15%. Se recogieron las alícuotas en el momento de la inoculación (T0), a las 16 horas (T16), 18 horas (T18), 21 horas (T21), y a las 24 horas (T24). Después de la fermentación, el cereal se calentó a 50°C con mezclado continuo. El cereal calentado se secó por atomización después a una  $T^a$  del aire de entrada de 80°C, y una  $T^a$  del aire de salida de 210°C. El contenido de humedad final era 6%.

55

Las muestras se analizaron en agar Rogosa (+ vancomicina 12 microgr/ml) (48 horas a 37°C), para la cuantificación de *L. paracasei* CBA-174), en PCA para el total de aerobios (24 horas a 37°C), en agar McConkay para coliformes y agar RCM para clostridios.

Los resultados de esta fermentación fueron como sigue:

- 5 Inóculo (*L. paracasei* CBA-174):  $1 \times 10^6$  ( $\pm \frac{1}{2}$  log) UFC/ml (en el instrumento)
- Concentración de *L. paracasei* CBA L74 después de 24 horas de fermentación:  $1 \times 10^8$  ( $\pm \frac{1}{2}$  log) UFC/ml
- Contaminantes en PCA antes de la inoculación:  $<10^4$  UFC/ml
- Contaminantes en agar McConkay antes de la inoculación:  $<10^4$  UFC/ml
- Contaminantes en RCM antes de la inoculación:  $<10$  UFC/ml
- 10 Contaminantes en PCA después de la inoculación:  $<10^4$  UFC/ml
- Contaminantes en PCA 24 horas después de la fermentación:  $<10^4$  UFC/ml
- pH antes de la adición del inóculo:  $6 (\pm 0,20)$
- pH a las 16-18 horas:  $3,70 (\pm 0,20)$
- pH a las 24 horas:  $3,60 (\pm 0,20)$
- 15 Ejemplo 5: Efectos de *L. paracasei* CBA L74 sobre células dendríticas en un sistema de co-cultivo con células Caco2
- Analizamos el efecto de *L. paracasei* CBA L74 vivo no replicativo en un co-cultivo de células epiteliales intestinales (células Caco2) y de células dendríticas humanas (DCs). Las células Caco2 se sembraron en una membrana Transwell y después de aproximadamente 3 semanas, cuando la resistencia tras-epitelial era adecuada, se suplementaron con *L. paracasei* CBA L74 durante 96 horas. Las DCs humanas se diferenciaron de los monocitos sanguíneos periféricos y se sembraron en el compartimento basal de la cámara de co-cultivo. La resistencia trans-epitelial permaneció constante durante el experimento.
- 20 Para caracterizar el fenotipo de DCs, monitoreamos la expresión superficial de células DC de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86), MHC-II y moléculas de adhesión (CD40) mediante análisis citofluorimétrico. Para determinar el perfil de citoquinas producidas por las DCs co-cultivadas con células epiteliales intestinales expuestas a *L. paracasei* CBA L74, recogimos el medio de cultivo y cuantificamos IL-10 y IL-12p70 mediante ELISA. Para verificar la capacidad de las células Caco2 expuestas a *L. paracasei* CBA L74 para condicionar a las DCs a promover la proliferación de células T, realizamos análisis FACS (células activadas por fluorescencia, de sus siglas en inglés) y mezclamos cultivos de linfocitos.
- 25 Como se muestra en la Tabla en la Figura 1, la incubación de células Caco2 durante 24 horas con *L. paracasei* CBA L74 vivo o inactivado (inactivación térmica) modificó el fenotipo de células dendríticas co-cultivadas. Además, la presencia de *L. paracasei* CBA L74 moduló los cambios mediados por LPS en el fenotipo de DC.
- 30 A continuación cuantificamos las citoquinas liberadas a partir de células DC co-cultivadas con células Caco2 acondicionadas con *L. paracasei* (vivo o inactivado). Como muestra la Figura 2a, las células DCs co-cultivadas con Caco2 expuestas a *L. paracasei* CBA L74 vivo o inactivado, mostraron un incremento significativo estadísticamente en la producción de IL-10. No observamos un incremento significativo en la producción de IL-12 en ausencia de LPS (Figura 2b). Sin embargo, las células DCs mantuvieron la capacidad para responder a cambios de LPS mediante la mejora en la producción de IL-12, sugiriendo que la exposición a *L. paracasei* CBA L74 no afectaba a la capacidad global de las células DCs para responder a los patógenos.
- 35 A continuación realizamos un ensayo funcional para verificar la capacidad de las células DCs expuestas a células CaCo2 cultivadas en presencia de un medio o de un medio suplementado con *L. paracasei* para modular la capacidad de proliferar las células T después de la reacción de una mezcla de linfocitos. Como se muestra en la Figura 3, no observamos diferencias significativas en la capacidad de las células DC co-cultivadas con células CaCo2 para modificar la proliferación de células T.
- 40 Tomados en conjunto, los datos in vitro indican que *L. paracasei* CBA L74 vivo o inactivado por calor, puede influir en el entorno generado por las células del epitelio intestinal que, a su vez, modula la actividad de otras células inmunológicas, tales como las células DC. El gráfico en conjunto indica que las células DCs expuestas a las células Caco2 con medio acondicionado, reducen la expresión de marcadores de
- 45
- 50

activación, y producen citoquinas anti-inflamatorias como IL-10, mientras mantienen la capacidad de responder a LPS mediante la producción mejorada de IL-12.

Ejemplo 6: Efectos de *L. paracasei* CBA L74 sobre la morfología, la expresión de citoquinas y la inmunidad innata de toda la mucosa intestinal

5 Examinamos los efectos in vivo mediante la administración de *L. paracasei* CBA L74 (vivo e inactivado por calor) como un suplemento de la dieta en ratones. Después de dos semanas de suplementación, los animales se sacrificaron y se analizó toda la mucosa intestinal.

10 Morfología de la mucosa: Realizamos una tinción de hematoxilina y eosina en secciones del íleon embebidas en parafina. Ningún suplemento tuvo efectos significativos en la estructura intestinal o causó la infiltración de células inflamatorias.

15 Expresión de citoquinas y de IgA: Determinamos si la administración de *L. paracasei* CBA L74 (vivo o inactivado) afectó al nivel de citoquinas anti- y pro-inflamatorias en la mucosa intestinal. Como se muestra en la Figura 4, la administración de *L. paracasei* CBA L74 vivo o inactivado, descendió significativamente el nivel de IL-1 $\beta$ , un potente mediador pro-inflamatorio, en la mucosa intestinal de los ratones. Como se muestra en la Figura 5, observamos también una reducción en el nivel de IL-4 de la mucosa basal después de la administración de *L. paracasei* CBA L74 vivo o inactivado. Finalmente, determinamos el efecto de diferentes regímenes de suplementación sobre el nivel de IgA de la mucosa. Después de dos semanas de suplementación en la dieta con *L. paracasei* CBA L74, los animales se sacrificaron y se recogió y homogeneizó la mucosa intestinal. Se midió entonces mediante ELISA el total de IgA y los valores normalizados para las proteínas de toda la mucosa. Como se muestra en la Figura 6, el *L. paracasei* CBA L74 inactivado por calor aumentó significativamente la IgA de la mucosa.

20 Inmunidad innata: Analizamos el efecto de la suplementación en la dieta sobre los niveles de receptores de tipo Toll, TLR, 2, 4, y 9. Estos receptores están implicados en el reconocimiento de estructuras bacterianas conservadas y, por tanto, juegan un papel clave en la modulación de la reactividad de células inmunológicas y células no inmunológicas hacia las estructuras microbianas conservadas. Como se muestra en la Figura 7, la suplementación de la dieta con *L. paracasei* CBA L74 vivo o inactivado por calor, incrementó los niveles de la expresión proteica de TLR2 y TLR4. Se ensayó también el efecto de la suplementación en la dieta sobre los niveles de PPAR $\gamma$  en la mucosa. Como se muestra en la Figura 8, *L. paracasei* CBA L74 aumentó significativamente el nivel de PPAR $\gamma$ .

30 Ejemplo 7: Efectos de *L. paracasei* CBA L74 en los niveles de citoquinas circulantes

35 Para analizar si los suplementos en la dieta eran capaces de modificar el nivel de citoquinas circulantes, medimos los efectos de la administración en la dieta de la cepa (viva o inactivada) sobre el nivel de citoquinas anti- y pro-inflamatorias en el suero. Como se muestra en las Figuras 9a y 9b, *L. paracasei* CBA L74 vivo indujo un descenso significativo estadísticamente en IL-1 $\beta$  y un incremento modesto en IL-4, respectivamente.

Ejemplo 8: Efectos de *L. paracasei* CBA L74 sobre la actividad de células dendríticas y de linfocitos T

40 A continuación nos centramos en el impacto de la suplementación de la dieta con *L. paracasei* CBA L74 sobre las células inmunológicas relevantes para la actividad del sistema inmunológico asociados con las mucosas, principalmente de células dendríticas y linfocitos. Evaluamos el fenotipo de las DCs dentro de las Placas de Peyer (PP), ya que estas células son fundamentales en establecer el destino de un antígeno y contribuyen en el medio que determinará la naturaleza de la respuesta inmunológica adaptativa.

45 Como se muestra en la Tabla en la Figura 10, la suplementación con *L. paracasei* CBA L74 (vivo o inactivado) descendió la expresión de la molécula co-estimuladora CD80 y la molécula de adhesión CD40 mientras que reguló al alza la expresión de MHCII. Estos datos sugieren que las DCs de los animales suplementados con *L. paracasei* CBA L74 parecían menos dispuestas a interactuar con las células T y organizar una respuesta inmunológica pero se conservaba su capacidad para procesar y presentar antígenos.

50 Después determinamos la capacidad de la suplementación en la dieta con *L. paracasei* CBA L74 para modificar la reactividad de DCs a estímulos pro-inflamatorios (tal como LPS y CpG bacterianos). La exposición de DCs de los ratones control a LPS o CpG indujo una potente regulación al alza de CD80 en las DCs control. La suplementación de DCs con *L. paracasei* CBA L74 inactivado por calor no modificó la reactividad a estímulos inflamatorios. La suplementación con bacterias vivas redujo significativamente la regulación al alza de CD80 inducida por LPS y CpG.

55 Finalmente, investigamos si la suplementación en la dieta con *L. paracasei* CBA L74 (vivo o inactivado) afectaba a la polarización de los linfocitos T intestinales (tanto CD4+ como CD8+) hacia un fenotipo Th1 o Th2. Para estos estudios, expusimos a las Placas de Peyer a PHA, un potente estímulo no específico, y a

continuación se evaluó la polarización linfocitaria mediante tinción de intraquina para IL-4 y IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la Figura 11a, en ausencia de PHA (la "condición basal") en linfocitos CD4+, IL-4 y IFN estaban casi en equilibrio. Aproximadamente 10-12% de las células eran positivas para estas citoquinas. Como se muestra en la Figura 11b, para linfocitos CD8+ en la condición basal, había un ligero predominio de células que expresan IL-4 sobre las que expresan IFN. La exposición de linfocitos tanto CD4+ como CD8+ a PHA causó un potente incremento en la tinción intracelular para IL-4 y IFN- $\gamma$  con tendencia hacia la producción de IFN- $\gamma$ .

En células CD4+, la suplementación en la dieta con *L. paracasei* CBA L74 vivo incrementó los niveles de IFN- $\gamma$  en la condición basal. Después de la exposición a PHA no habían diferencias significativas en la respuesta entre los grupos suplementados (Figura 11a). En linfocitos CD8+, la suplementación oral con *L. paracasei* CBA L74 inactivado favoreció un perfil Th2 con una estimulación de la producción de IL-4 sobre la producción de IFN- $\gamma$  (Figura 11b). El perfil anti-inflamatorio se corrobora además por la respuesta suavizada a PHA. Era también evidente una tendencia similar aunque menos pronunciada, en linfocitos CD8+ aislados a partir de ratones suplementados con *L. paracasei* CBA-L74 vivo.

Ejemplo 9: Efecto de leche fermentada por *L. paracasei* CBA L74 sobre marcadores del sistema inmunológico en la mucosa intestinal

Los ratones se suplementaron dos veces al día durante dos semanas bien con: 1) Control (PBS); 2) Leche desnatada (no fermentada); 3) Leche desnatada fermentada con *L. paracasei* CBA L74 ( $1 \times 10^8$  ufc/ml); 4) Leche desnatada fermentada con *S. thermophilus* ( $6,7 \times 10^6$  ufc/ml); 5) Leche desnatada fermentada con *L. paracasei* CBA L74 ( $1 \times 10^8$  ufc/ml) y *S. thermophilus* ( $1,18 \times 10^7$  ufc/ml); 6) Leche desnatada fermentada con *L. paracasei* CBA L74 ( $1,9 \times 10^9$  ufc/ml) y *S. thermophilus* ( $2,2 \times 10^8$  ufc/ml). Al finalizar el tratamiento los animales se sacrificaron y se recogió la mucosa intestinal y las Placas de Peyer, y se procesaron para el análisis como se describe a continuación.

Niveles de citoquinas en la mucosa intestinal. Como se muestra en la Figura 12, la suplementación con leche desnatada fermentada con *L. paracasei* CBA L74 causó un incremento significativo en los niveles de IL-10 en la mucosa intestinal. La administración de leche desnatada fermentada con *S. thermophilus* indujo una ligera reducción en comparación con los controles. La administración de leche desnatada con ambas cepas a dosis altas indujo un incremento de 2,1 veces en IL-10 en la mucosa. Ninguno de los tratamientos tuvo un efecto significativo en IL-1 $\beta$  de la mucosa aunque la suplementación con leche desnatada fermentada con *L. paracasei* CBA L74 causó un ligero incremento en los niveles de la mucosa de esta citoquina.

Actividad mieloperoxidasa en la mucosa intestinal. Se ensayó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en homogeneizados de la mucosa intestinal. La administración de leche fermentada o no fermentada con diferentes bacterias no indujo a diferencias significativas estadísticamente en la actividad de la mieloperoxidasa, aunque había un ligero incremento en la actividad MPO observada en la mucosa de animales que recibieron leche no fermentada.

Niveles de IgA en la mucosa intestinal. Como se muestra en la Figura 14, la suplementación con leche desnatada no fermentada causó un incremento significativo en la IgA de la mucosa intestinal. Este incremento no se observó en animales suplementados con leche desnatada fermentada tanto con *L. paracasei* CBA L74 como con *S. thermophilus* en solitario. La administración de leche fermentada con ambas cepas a dosis más altas indujo un incremento en la IgA de las mucosas.

Niveles de TLR2, TLR4, TLR9 y PPAR $\gamma$  en la mucosa intestinal. A continuación determinamos mediante WB los niveles clave de receptores del sistema inmunológico innato de la mucosa. Como se muestra en la Figura 15, ninguno de los tratamientos tuvo ningún efecto significativo sobre la expresión del receptor TLR4. La leche no fermentada causó un incremento modesto en TLR2. La administración de leche desnatada fermentada bien con *L. paracasei* CBA L74 o *S. thermophilus* en solitario o en combinación a dosis bajas previnieron este efecto. También fue evidente un incremento modesto en TLR2 comparable a la de la leche en solitario, en ratones que recibieron leche fermentada con ambas cepas a dosis más altas. La administración de leche desnatada en solitario tuvo efectos profundos en los niveles de TLR9, mientras que la administración de leche fermentada con ambas cepas re-establecieron a niveles de las mucosas comparables con los de los controles. Como se muestra en la Figura 15, la administración de leche no fermentada causó por sí misma un potente incremento en la PPAR $\gamma$  de la mucosa. Se evidenció un efecto similar en ratones suplementados con leche desnatada fermentada con *L. paracasei* CBA L74 y dosis más bajas de leche fermentada con ambas cepas.

Niveles de pNF-kB y IKB en la mucosa intestinal. Determinamos el estado de activación de NF-kB, un factor de transcripción clave implicado tanto en la inflamación intestinal como en la supervivencia de células epiteliales. Como se muestra en la Figura 16, NF-kB activado (pNF-kB) era detectable en el control, mucosa normal. Después de los distintos tratamientos, observamos sólo un ligero incremento en los niveles de pNF-kB en la mucosa de los ratones tratados con leche desnatada fermentada bien con *L. paracasei* CBA L74 o con *S. thermophilus* en solitario, mientras que en ratones que recibieron leche desnatada fermentada con ambas cepas, pNF-kB era comparable al de los controles. El incremento en pNF-kB era similar a la desaparición de la subunidad inhibitoria de NF-kB, IKB, que no era detectable en la mucosa de los ratones suplementados con leche desnatada fermentada bien con *L.*

*paracasei* CBA L74 o con *S. thermophilus* en solitario. Los ratones que recibieron leche desnatada fermentada con ambas cepas mostraron niveles de IκB comparables a los controles.

Ejemplo 10: Efecto de la leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de células dendríticas en la mucosa intestinal

5 Fenotipo de células dendríticas extraídas a partir de Placas de Peyer. Examinamos el efecto de la suplementación en la dieta sobre el fenotipo de DCs intestinales. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 17. La administración de leche fermentada con *L. paracasei* en solitario así como con *S. thermophilus* a dosis más altas y más bajas produjeron un descenso significativo estadísticamente en la expresión de CD80 y CD86 en comparación con los ratones control (\* significa  $p < 0,05$  frente al control), mientras que los niveles generales de HLAII y CD40 se mantuvieron estables. Los datos de la Figura 17 se expresan como la media±S.E. de los tres experimentos separados.

15 Respuestas de las células dendríticas expuestas a LPS/CpG. Determinamos la capacidad de la suplementación en la dieta para modificar la reactividad de células DCs a estímulos pro-inflamatorios (tales como LPS y CpG bacterianas). Como se muestra en la Figura 18, la exposición de células DCs aisladas a partir de animales a LPS y CpG causó un incremento significativo en la expresión de CD80 (\* significa  $p < 0,05$  frente a las células DCs sin estimular de ratones control). Se observó un efecto similar en las células DCs purificadas a partir de ratones que recibieron leche no fermentada (° significa  $p < 0,05$  frente a las células DCs sin estimular de ratones tratados con leche no fermentada). La administración de leche desnatada fermentada con *L. paracasei* CBA L74 en solitario previno completamente los efectos mediados por LPS en los ratones tratados con leche no fermentada, aunque era menos efectivo en la regulación al alza de CD80 inducido por CpG. La leche desnatada fermentada con *S. thermophilus* en solitario previno los efectos de LPS y CpG y redujo la expresión de CD80. Finalmente, la administración de leche desnatada fermentada con ambas cepas previno la regulación al alza de CD80 inducida por LPS y CpG, y mantuvo la expresión de CD80 a niveles basales. Los datos en la Figura 18 se expresan como la media±S.E. de los tres experimentos separados.

25 Ejemplo 11: Efecto de la leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de linfocitos T en la mucosa intestinal

30 Respuestas de los linfocitos intestinales CD4+ y CD8+ expuestos a PHA. Nos planteamos si la suplementación en la dieta con leche (bien fermentada o sin fermentar) afectaría a la polarización de los linfocitos T intestinales (CD4+ y CD8+) hacia un fenotipo Th1 o Th2. Se expusieron los linfocitos derivados de las Placas de Peyer a PHA, y después se evaluó la polarización de los linfocitos mediante tinción para IL-4 y IFN-γ intracelular.

35 Como se muestra en la Figura 19, la exposición a PHA incrementó significativamente la producción de IL4 y IFN-γ en los linfocitos CD4+ de ratones control (\* significa  $p < 0,05$  frente a los linfocitos sin estimular de ratones control). Esta inducción no se observó en los ratones tratados tanto con leche fermentada como no fermentada. Después de la suplementación con leche no fermentada, los linfocitos CD4+ mostraron niveles basales aumentados de IL4 y IFN-γ en comparación con los animales control (° significa  $p < 0,05$  frente a los linfocitos sin estimular de ratones control). Estos datos sugerían que la suplementación con leche fermentada prevenía la activación no específica y mantenía la producción de IL4 y IFN-γ en niveles basales.

40 Como se muestra en la Figura 20, la exposición de linfocitos intestinales CD8+ a PHA en ratones control incrementó la producción de IL4 y IFN-γ (\* significa  $p < 0,05$  frente a los linfocitos sin estimular de ratones control). Esta inducción no se observó en los ratones tratados tanto con leche fermentada como no fermentada. La administración de leche fermentada con *L. paracasei* y *S. thermophilus* a dosis más altas descendió la producción basal de IL4 mientras que tras la estimulación con PHA, los niveles tanto de IL4 como de IFN-γ se redujeron en comparación con los linfocitos estimulados de los ratones control (§ significa  $p < 0,05$ ).

Ejemplo 12: Efecto de leche fermentada mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre la histología de la mucosa intestinal

45 Para determinar la distribución de las células que proliferan en la mucosa intestinal, se realizó un análisis inmunohistoquímico de la expresión de Ki67, un antígeno expresado por las células en división. En los ratones control había una clara inmunorreactividad en las criptas intestinales, mientras que no hubo tinción en las vellosidades. En el tejido de los ratones que recibieron leche no fermentada hubo una potente expresión en las criptas, aunque no había expresión ectópica del antígeno. En ratones que recibieron los diferentes tipos de leche fermentada se observaron patrones de tinción comparables. Se realizó una evaluación histológica de la mucosa del íleon de los diferentes grupos experimentales. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 21. La administración de leche no fermentada redujo el número y la extensión de la vellosidades intestinales, mientras que la morfología intestinal se conservó en los animales que recibieron las diferentes formas de leche fermentada.

55 Ejemplo 13: Efecto del arroz fermentado por *L. paracasei* CBA L74 sobre marcadores del sistema inmunológico en la mucosa intestinal

Estos experimentos se diseñaron para evaluar las propiedades inmuno-moduladoras de cereales fermentados por *L. paracasei* CBA-L74. Los estudios incluían la administración intragástrica diaria durante dos semanas de: 1)

Arroz no fermentado; 2) 100 mg al día de arroz fermentado (con *L. paracasei* CBA L74) (correspondiente a  $2 \times 10^8$  ufc/L de *L. paracasei* CBA-L74) y 3) 500 mg al día de arroz fermentado (con *L. paracasei* CBA L74) (correspondiente a  $10^9$  ufc/L de *L. paracasei* CBA-L74). Durante el tratamiento los ratones no mostraron ningún signo de enfermedades o diarrea. Al finalizar el tratamiento se mataron los ratones y se recogieron las Placas de Peyer (PP) de manera aséptica. Se eliminaron las células epiteliales de las PP mediante la incubación en HBSS sin  $Ca_2^+$  más EDTA y después los tejidos se sometieron a digestión enzimática. La suspensión celular única, se lavó, se resuspendió en RMPI frío y se empleó para los ensayos siguientes.

Inicialmente ensayamos el efecto sobre la mucosa intestinal completa de diferentes suplementos en la dieta. Primero, realizamos una tinción de hematoxilina y eosina en secciones del ileon embebidas en parafina. Ninguno de los suplementos en la dieta empleados tuvo efectos significativos en la estructura intestinal o causó la infiltración de células inflamatorias.

Después determinamos si la administración de arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 afectaba el nivel de citoquinas anti- y pro-inflamatorias en la mucosa intestinal. Como se muestra en la Figura 22, la administración de arroz o arroz fermentado incrementaron tanto IL-1 $\beta$  como IL-4 en la mucosa. La suplementación con arroz fermentado a dosis más altas causó una reducción en IL-10 como se muestra en la Figura 23.

Después determinamos el efecto de diferentes regímenes de suplementación sobre el nivel de IgA en las mucosas. Tras dos semanas de suplementación en la dieta, los animales se sacrificaron y se recogió y homogeneizó la mucosa intestinal. Se midió entonces mediante ELISA el total de IgA y los valores normalizados para las proteínas de toda la mucosa. Ninguno de los suplementos tuvo efectos significativos sobre la IgA de la mucosa.

Analizamos los efectos del arroz o del arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 sobre la inmunidad innata de la mucosa intestinal. Como se muestra en la Figura 24, la suplementación de la dieta con arroz y arroz fermentado (a dosis bajas) tuvieron sólo efectos moderados sobre los TLRs de la mucosa. Como se muestra en la Figura 25a, la suplementación en la dieta con arroz no fermentado incrementó drásticamente los niveles de PPAR $\gamma$  de la mucosa. Dosis altas de arroz fermentado incrementaron también los niveles de PPAR $\gamma$  de la mucosa. Como se muestra en la Figura 25b, dos semanas después de la suplementación de la dieta con arroz no fermentado redujo la activación en la mucosa de NF-kB y descendió la de IKB. La suplementación con arroz fermentado a dosis bajas no tuvo ningún efecto en comparación con el control, mientras que dosis más altas tuvieron efectos comparables a los observados con arroz no fermentado.

Medimos también los efectos de la administración en la dieta sobre el nivel de citoquinas anti- y pro-inflamatorias en el suero. La suplementación de la dieta bien con arroz o bien con arroz fermentado (a baja dosis) no tuvo influencia sobre los niveles de IL-1 $\beta$  y IL-4 en el suero.

Ejemplo 14: Efecto del arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de células dendríticas en la mucosa intestinal

A continuación nos centramos en el impacto de la suplementación de la dieta con arroz no fermentado o con arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 sobre células inmunológicas relevantes para la actividad del sistema inmunológico asociado con las mucosas, principalmente de células dendríticas y linfocitos. Primero marcamos la suspensión de células únicas con anti-CD1 (para identificar DCs) y bien con anti CD-80 y CD-86, MHC-II y CD-40, para determinar el nivel de actividad y madurez de DCs intestinales en estos órganos linfoides. Como se muestra en la tabla de la Figura 26, se observó un efecto significativo del arroz fermentado a altas dosis sobre el fenotipo de DCs. La suplementación con arroz no fermentado (en estos experimentos usamos dos dosis diferentes) no tuvo efecto, mientras que los efectos del arroz fermentado sobre el nivel de CD80, CD40 y MHC-II eran evidentes a 100 mg/día y más pronunciado a 500 mg/día.

A continuación determinamos la capacidad de la suplementación en la dieta con arroz o con arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 para modificar la reactividad de las DCs por estímulos pro-inflamatorios (tal como LPS y CpG bacterianos). Como se muestra en la tabla de la Figura 27, la exposición de DCs a LPS o CpG en ratones control, indujo una regulación al alza de CD80 en las DCs control. La suplementación con arroz no fermentado no modificó la reactividad a estímulos inflamatorios. La suplementación con las dosis ensayadas de arroz fermentado redujo la regulación al alza de CD80 inducida por LPS y CpG.

Ejemplo 15: Efecto del arroz fermentado mediante *L. paracasei* CBA L74 sobre el fenotipo de linfocitos T en la mucosa intestinal

Investigamos si la suplementación en la dieta con arroz o con arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 era capaz de influir en la polarización de los linfocitos T intestinales (bien de CD4+ o de CD8+) hacia un fenotipo Th1 o Th2. Los linfocitos derivados de las Placas de Peyer se expusieron a PHA y a continuación se evaluó la polarización de linfocitos mediante tinción de intraquina para IL-4 y IFN- $\gamma$ .

Los resultados de este experimento para linfocitos CD4+ y CD8+ se muestran en las Figuras 28 y 29, respectivamente. Como se muestra en la Figura 28, en la condición basal, en linfocitos CD4+ IL-4 y IFN- $\gamma$

estaban casi en equilibrio ya que aproximadamente el 10-12% de las células eran positivas para estas citoquinas. Como se muestra en la Figura 29, en CD8+, en la condición basal había un ligero predominio de las células que expresan IL-4 sobre las que expresan IFN $\gamma$ . La exposición tanto de linfocitos CD4+ como CD8+ a PHA causó un potente incremento en la tinción intracelular para IL-4 y IFN $\gamma$ , con un predominio en la producción de IFN $\gamma$ .

En ratones que recibieron arroz no fermentado se observó un predominio de la producción de IL-4 (fenotipo Th2) tanto en la condición basal como tras la estimulación de PHA para linfocitos CD4+ y CD8+. Sin embargo, la producción de IL-4 se asoció a la persistencia de la producción de IFN $\gamma$  en la condición basal, tras la estimulación de PHA se observó un incremento en la expresión de esta citoquina aunque la respuesta se suavizó en comparación con la respuesta en células control. En ratones que recibieron arroz fermentado en la condición basal observamos un predominio de células positivas IFN $\gamma$  sobre las IL-4, aunque en la condición basal el porcentaje era comparable (para CD4+) o ligeramente menor (para CD8+) comparado con los controles. Tras la estimulación con PHA, la respuesta de citoquinas en ambas poblaciones celulares era más suave en comparación con los ratones control, aunque dirigida hacia un fenotipo Th1 (predominio de células positivas IFN $\gamma$ ).

Ejemplo 16: Efecto de *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-10 en células dendríticas humanas derivadas de monocitos (MoDCs) en presencia de *Salmonella typhimurium*

Se ensayó la capacidad tanto de las células *L. paracasei* CBA L74 como de los sobrenadantes celulares de *L. paracasei* CBA L74, para inducir la producción de citoquinas anti-inflamatorias, IL-10, MoDCs humanas en presencia del patógeno bacteriano, *Salmonella typhimurium*. Las MoDCs humanas se obtuvieron a partir de al menos cuatro, y en algunos casos, siete donantes. Como se muestra en la Figura 30, todas las células de *Salmonella typhimurium* ("FB62"), de la cepa *Lactobacillus* control, *L. paracasei* 21060 ("B21060") y *L. paracasei* CBA L74 ("CBAL74"), inducen la producción de IL-10. Por el contrario, aunque el sobrenadante de *Salmonella typhimurium* ("sn fb62") induce la producción de IL-10, los sobrenadantes a partir de *Lactobacilli*, cepa *Lactobacillus*, *L. paracasei* 21060 ("sn b21060") y *L. paracasei* CBA L74 ("sn cbal74") no lo hicieron. La co-incubación del sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 con *Salmonella typhimurium* ("sn cbal74 + FB62"), induce a niveles de IL-10 por encima de los vistos con *Salmonella typhimurium* en solitario ("sn fb62 + FB62"). Curiosamente, se observó un efecto similar incluso si las MoDCs se preconditionaban con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 durante sólo una hora y se lavaban después para eliminar el sobrenadante ("1h sn cbal74 + FB62").

Ejemplo 17: Efecto de *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-12p70 en células dendríticas humanas derivadas de monocitos (MoDCs) en presencia de *Salmonella typhimurium*

Se ensayó la capacidad tanto de las células *L. paracasei* CBA L74 como de los sobrenadantes celulares de *L. paracasei* CBA L74, para inducir la producción de citoquinas anpro-inflamatorias, IL-12p70, en MoDCs humanas en presencia del patógeno bacteriano, *Salmonella typhimurium*. Las MoDCs humanas se obtuvieron a partir de al menos cuatro, y en algunos casos, siete donantes. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 31. Por el contrario, para los resultados obtenidos en el Ejemplo 16 para citoquina anti-inflamatoria, encontramos que *Salmonella typhimurium* ("FB62") induce niveles altos de IL-12p70 mientras que la cepa de células *Lactobacillus* control, *L. paracasei* 21060 ("B21060") y *L. paracasei* CBA L74 ("CBAL74"), inducen sólo bajos niveles de IL-12p70. Una vez más, el sobrenadante a partir de *Salmonella typhimurium* ("sn fb62") induce la producción de IL-12p70, pero los sobrenadantes a partir tanto de cepas de *Lactobacillus*, *L. paracasei* 21060 ("sn b21060") y *L. paracasei* CBA L74 ("sn cbal74") no lo hicieron. La co-incubación del sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 con *Salmonella typhimurium* ("sn cbal74 + FB62") causó una notable reducción en la producción de IL-12p70. El efecto se observó incluso si las MoDCs se preconditionaban con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 durante sólo una hora y se lavaban después para eliminar el sobrenadante ("1h sn cbal74 + FB62"). Esta reducción superó a la observada para el *Lactobacillus* control, *L. paracasei* 21060 ("1h sn b21060 + FB62"). Estos datos sugerían que tanto *L. paracasei* CBA L74 como el cultivo del sobrenadante a partir de *L. paracasei* CBA L74 tienen propiedades anti-inflamatorias que pueden aliviar la inflamación inducida por el patógeno bacteriano, *Salmonella typhimurium*.

Ejemplo 18: Efecto de leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-10 en células dendríticas humanas derivadas de monocitos (MoDCs) en presencia de *Salmonella typhimurium*

Se ensayó la capacidad de la leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 para inducir la producción de citoquinas anti-inflamatorias, IL-10, en MoDCs humanas en presencia del patógeno bacteriano, *Salmonella typhimurium*. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 32. Aunque las células MoDCs desactivadas normalmente no producen IL-10, encontramos que la incubación de MoDCs con leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 induce la producción de IL-10 de una manera dependiente de la dosis (véase "matriz CBAL74 1,41gr/100ml" y "matriz CBAL74 0,14gr/100ml"). La capacidad se mantiene incluso en presencia de *Salmonella typhimurium* (véase "matriz CBAL74 1,41gr/100ml + FB62" y "matriz CBAL74 0,14gr/100ml + FB62").

La Figura 32 muestra también que *L. paracasei* CBA L74 que se ha activado mediante calor ("6,3\*106 UFC CBA74 hervido"), se ha tratado con formaldehído ("6,3\*106 UFC CBA74 PFA"), o se ha congelado-descongelado ("6,3\*106 UFC CBA74 F&amp;T"), retiene la capacidad para inducir IL-10.

- 5 Como se observó para el medio de cultivo de *L. paracasei* CBA L74, la leche fermentada con *L. paracasei* CBA L74 causó una reducción significativa dependiente de la dosis en la producción de IL-12p70 inducida por *Salmonella typhimurium* (Figura 33). La leche fermentada por *S. thermophilus* causó un incremento en la producción de IL-12p70 en presencia de *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, la leche fermentada por *L. paracasei* CBA L74 no estimuló la producción de IL-12p70, acorde con las propiedades anti-inflamatorias de *L. paracasei* CBA L74. Estos datos sugieren que *L. paracasei* CBA L74 retiene sus propiedades anti-inflamatorias incluso en presencia de más especies pro-inflamatorias.
- Ejemplo 19: Efecto de sobrenadantes celulares *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de IL-10 y IL12p70 en células dendríticas humanas derivadas de monocitos (MoDCs) en presencia de *Enterobacter sakazaki*
- 10 Ensayamos la capacidad de los sobrenadantes celulares *L. paracasei* CBA L74 para inducir la producción de citoquinas anti-inflamatorias, IL-10 y citoquinas pro-inflamatorias, IL-12p70, en MoDCs humanas en presencia del patógeno bacteriano, *Enterobacter sakazaki*. Ensayamos dos cepas de *E. sakazaki*, N9 y N13. *E. sakazaki* induce la producción tanto de IL-10 como de IL-12p70 en MoDCs humanas. La adición de sobrenadantes celulares *L. paracasei* CBA L74 dio como resultado un incremento en IL-10 y un descenso significativo en IL-12p70.
- 15 Ejemplo 20: Efecto de arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74 sobre la producción de citoquinas en modelos de explantes tisulares en presencia de *Salmonella typhimurium*
- 20 Para establecer un sistema de co-cultivo tridimensional, se usó epitelio de intestino de ratón como se describe en Abud (Exp. Cell Res. 303: 252-262 (2005)). Los explantes tisulares se cultivaron durante 24 horas en presencia de 100% de O<sub>2</sub> con una presión de una atmósfera. La cámara inferior contenía 1 ml de hEC DMEM más ITS-X y EGF. La cámara superior contenía 200 ml de medio más o bien *S. typhimurium*, arroz fermentado por *L. paracasei* CBA L74, o bien una combinación de *S. typhimurium* y arroz fermentado por *L. paracasei* CBA L74. Se recogieron los sobrenadantes y se evaluaron mediante ELISA los niveles de IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y IL-10. Como se muestra en la Figura 33, la adición de arroz fermentado redujo significativamente la producción de citoquinas pro-inflamatorias, IL- $\beta$  y TNF- $\alpha$  en presencia de *S. typhimurium*, con sólo un efecto moderado sobre los niveles de citoquina anti-inflamatoria, IL-10.
- 25

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende un producto alimentario fermentado, en donde el producto alimentario se ha fermentado mediante la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778.
- 5 2. Una composición que comprende la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y un vehículo aceptable fisiológicamente.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde el vehículo aceptable fisiológicamente es un producto alimentario.
- 10 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el producto alimentario es un producto lácteo o un producto de cereal, siendo el producto lácteo seleccionado del grupo que consiste en leche, yogurt, cuajada, queso o una fórmula infantil y siendo el producto de cereal seleccionado del grupo que consiste en arroz, trigo, avena, cebada, maíz, centeno, sorgo, mijo, o triticale.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde producto alimentario está seco.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la bacteria probiótica es no replicativa.
- 15 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el producto alimentario comprende el equivalente de aproximadamente  $1 \times 10^2$  ufc/g a aproximadamente  $10^{12}$  ufc/g de bacteria probiótica por gramo en peso seco.
8. La composición de la reivindicación 2, en donde el vehículo aceptable fisiológicamente es un vehículo aceptable farmacéuticamente.
- 20 9. La composición de la reivindicación 8, en donde el vehículo aceptable farmacéuticamente comprende un coloide de base lipídica o de base polimérica, siendo el coloide seleccionado preferiblemente del grupo que consiste en un liposoma, un hidrogel, una micropartícula, una nanopartícula o una micela copolímera en bloque.
10. La composición de la reivindicación 9, en donde el coloide de base polimérica es una cápsula.
- 25 11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde la bacteria probiótica está en una forma de dosis unitaria de aproximadamente  $1 \times 10^2$  ufc/g a aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  ufc/g de peso seco y se formula preferiblemente para administración oral.
12. Un método para preparar una composición nutricional, comprendiendo el método:
  - a) proporcionar un producto alimentario;
  - 30 b) combinar el producto alimentario con una cantidad eficaz de la bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 y, opcionalmente, un co-inóculo, para formar una mezcla;
  - c) incubar la mezcla a una temperatura y durante un tiempo suficiente para que ocurra la fermentación.
- 35 13. El método de la reivindicación 12, en donde la cantidad de la bacteria probiótica es de aproximadamente  $1 \times 10^6$  ufc/ml a aproximadamente  $5 \times 10^6$  ufc/ml.
14. El método de la reivindicación 12 ó 13, en donde el co-inóculo es *Streptococcus thermophilus*, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente  $1 \times 10^4$  ufc/ml a aproximadamente  $1 \times 10^5$  ufc/ml.
- 40 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la etapa de incubación continúa hasta que el nivel de bacteria probiótica en la mezcla alcanza aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/ml a aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  ufc/ml.
16. La bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 para el uso en el tratamiento de un trastorno gastrointestinal en un sujeto.
- 45 17. La bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 para el uso según la reivindicación 16, en donde la bacteria probiótica se formula en un producto alimentario o en una composición farmacéutica, comprendiendo el producto alimentario preferiblemente el producto alimentario de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, comprendiendo la composición farmacéutica preferiblemente la composición de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
18. La bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 para el uso según la reivindicación 16 ó 17, en donde el trastorno gastrointestinal es un

sistema inmunológico de las mucosas deficitario, una alergia alimentaria, un trastorno asociado a diarrea, una infección bacteriana o viral, síndrome de intestino irritable, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, enfermedad celíaca o enterocolitis necrotizante.

- 5
19. La bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 para el uso según la reivindicación 18, en donde el sistema inmunológico de las mucosas deficitario es un sistema inmunológico inmaduro.
  20. La bacteria probiótica, *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso del Depósito Internacional LMG P-24778 para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde el sujeto es un niño humano.

10

-	<u>CD 80</u>	<u>CD 86</u>	<u>CD 40</u>	<u>MHCII</u>
Caco2 control	70,84±6,5	81,77±6,7	69,97±5,1	61,69±6,4
Caco2 + <i>L. paracasei</i> CBA-L74 VIVO	49,01±4,9*	68,51±4,4	58,12±6,4	56,27±1,8
Caco2 + <i>L. paracasei</i> CBA-L74 inactivado	54,09±3,5	68,34±2,5	57,96±2,3	61,55±2,4
Caco2 control + LPS	76,51±2,9	87,56±2,99	73,01±2,2	71,93±2,4
Caco2 + <i>L. paracasei</i> CBA-L74 VIVO + LPS	49,32±1,7°	58,09±3,3 °	59,34±4,1	52,75±2,1°
Caco2 + <i>L. paracasei</i> CBA-L74 inactivado + LPS	44,64±2,3°	68,64±1,5 °	63,37±4,1	62,35±2,6

\* frente al Caco2 control y °p<0,05 frente a Caco2 control + LPS

## Figura 1

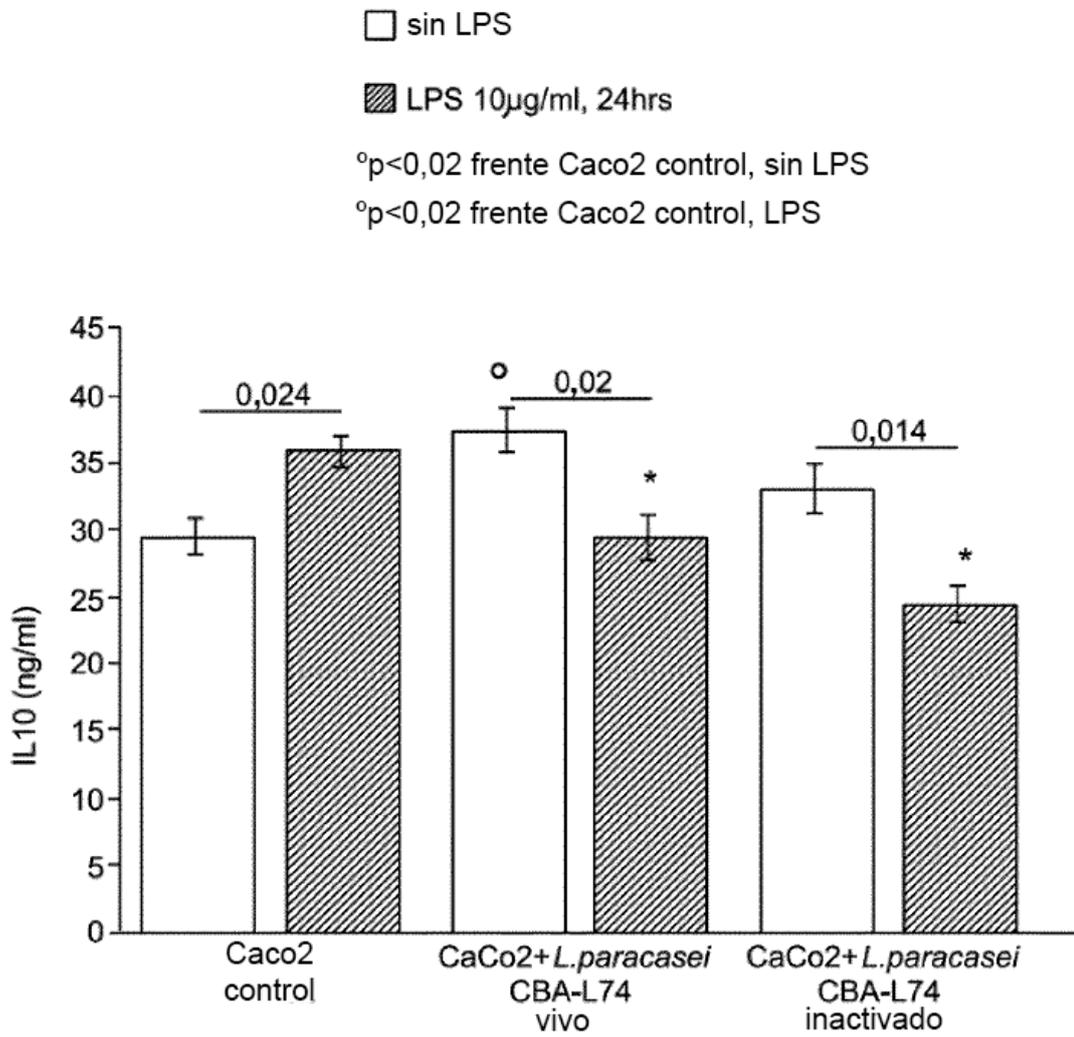


Figura 2a

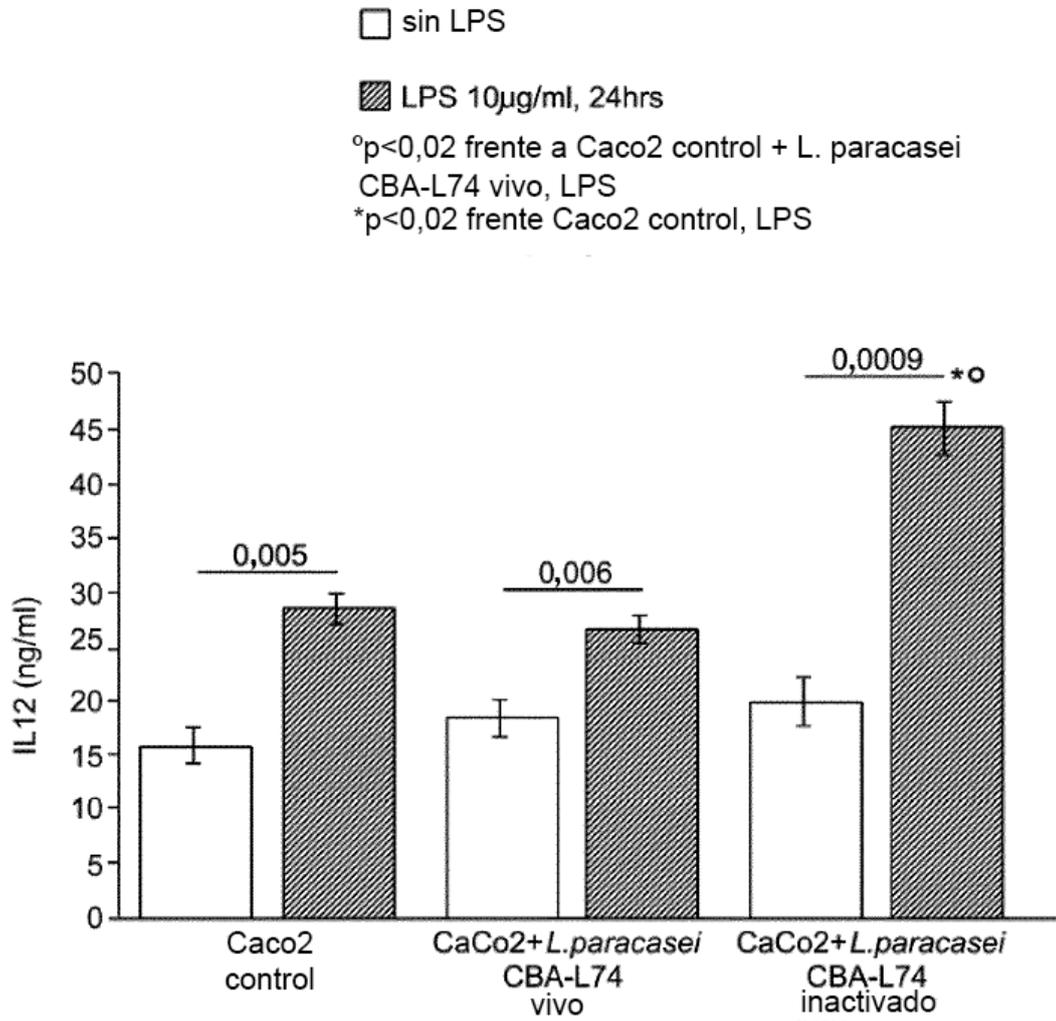


Figura 2b

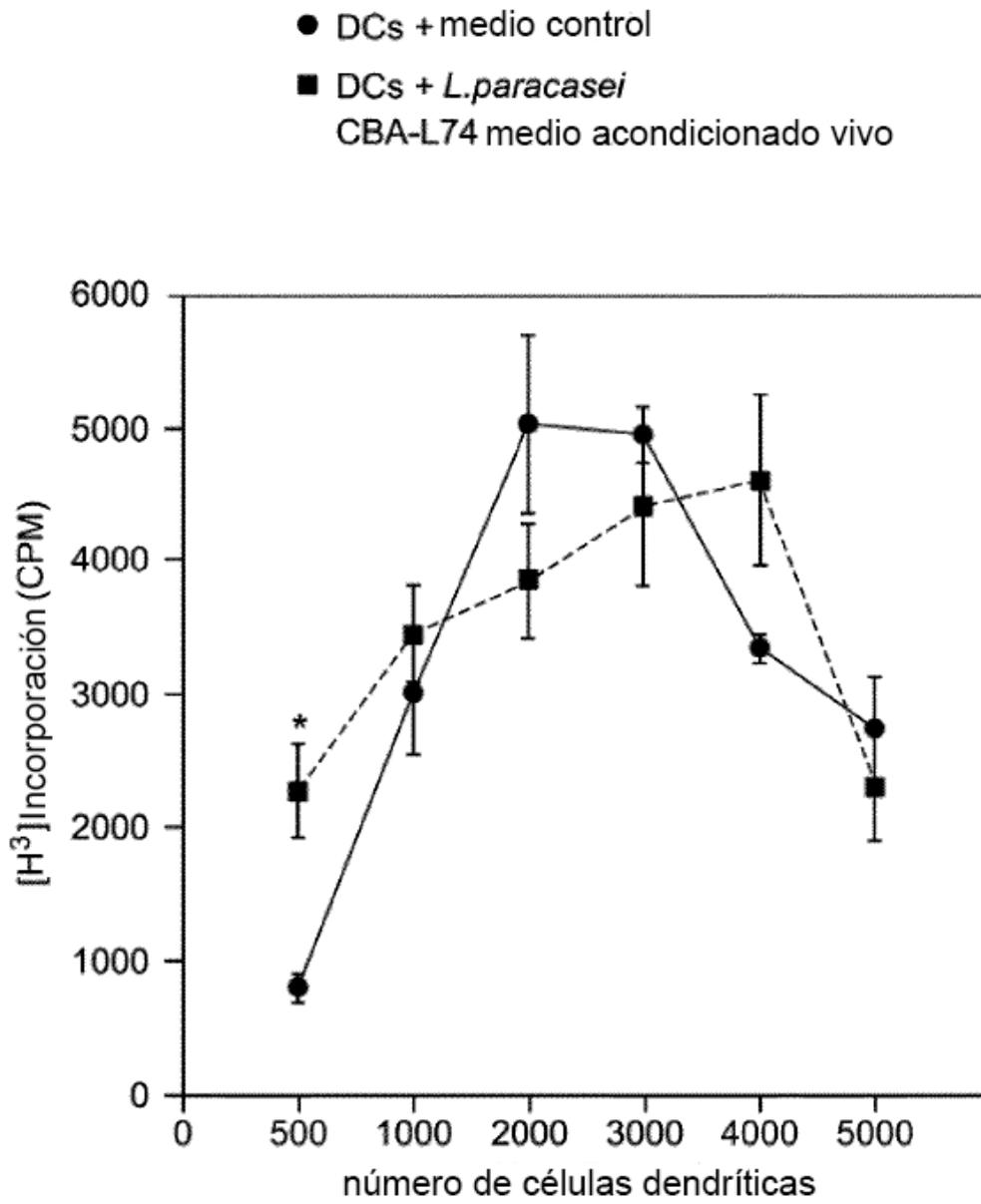


Figura 3

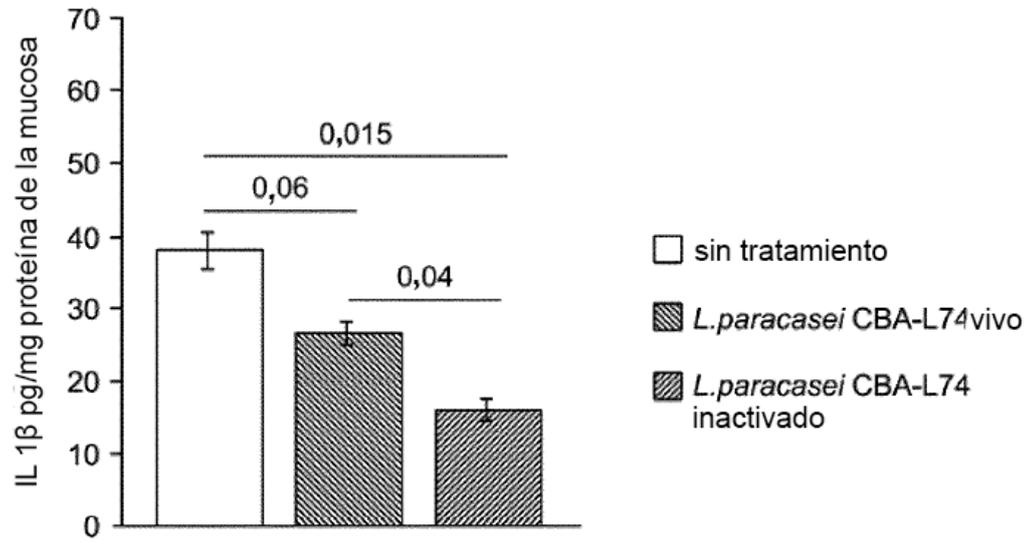


Figura 4

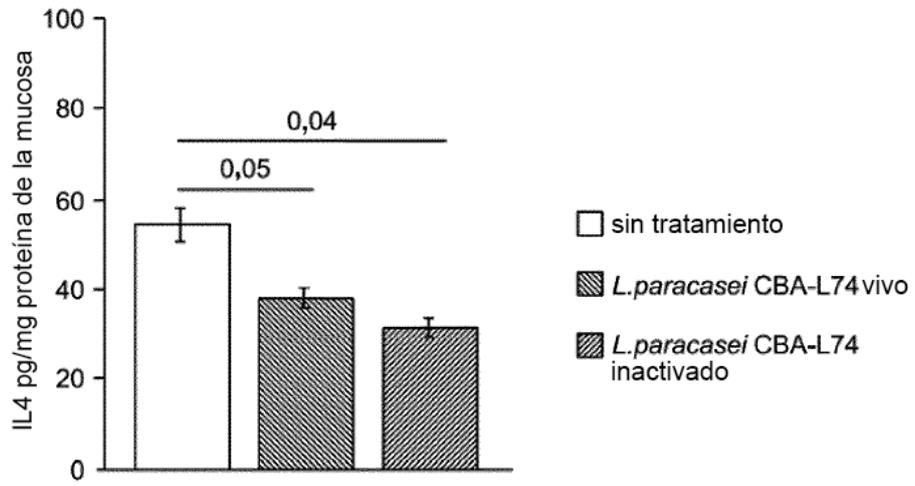


Figura 5

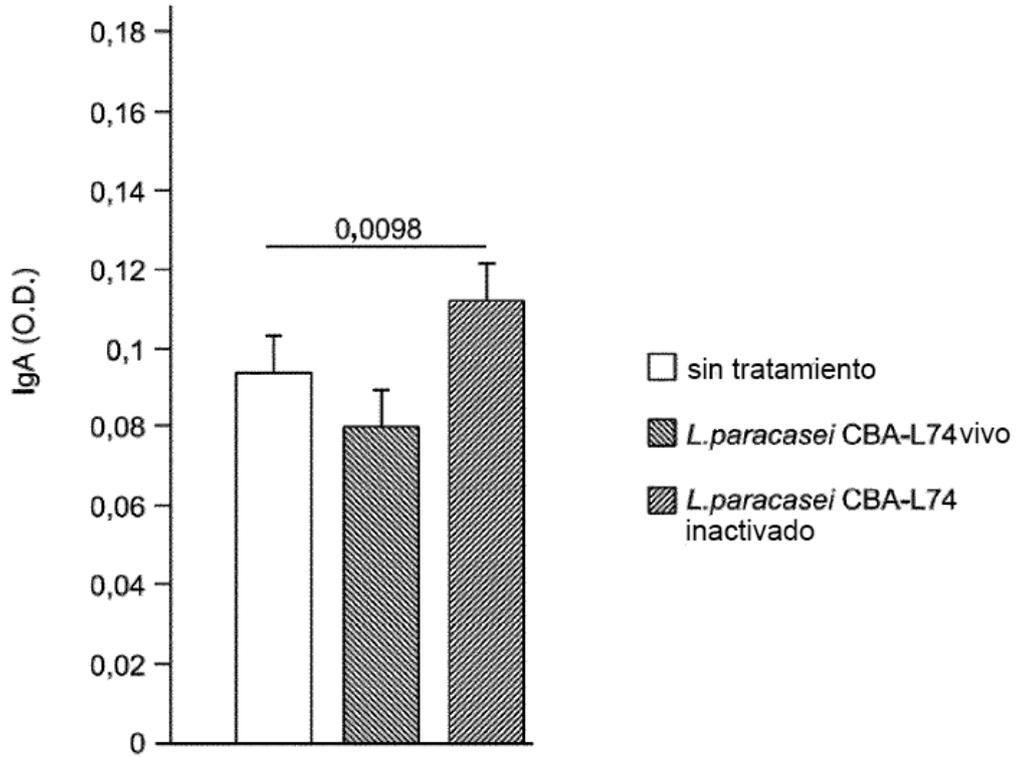


Figura 6

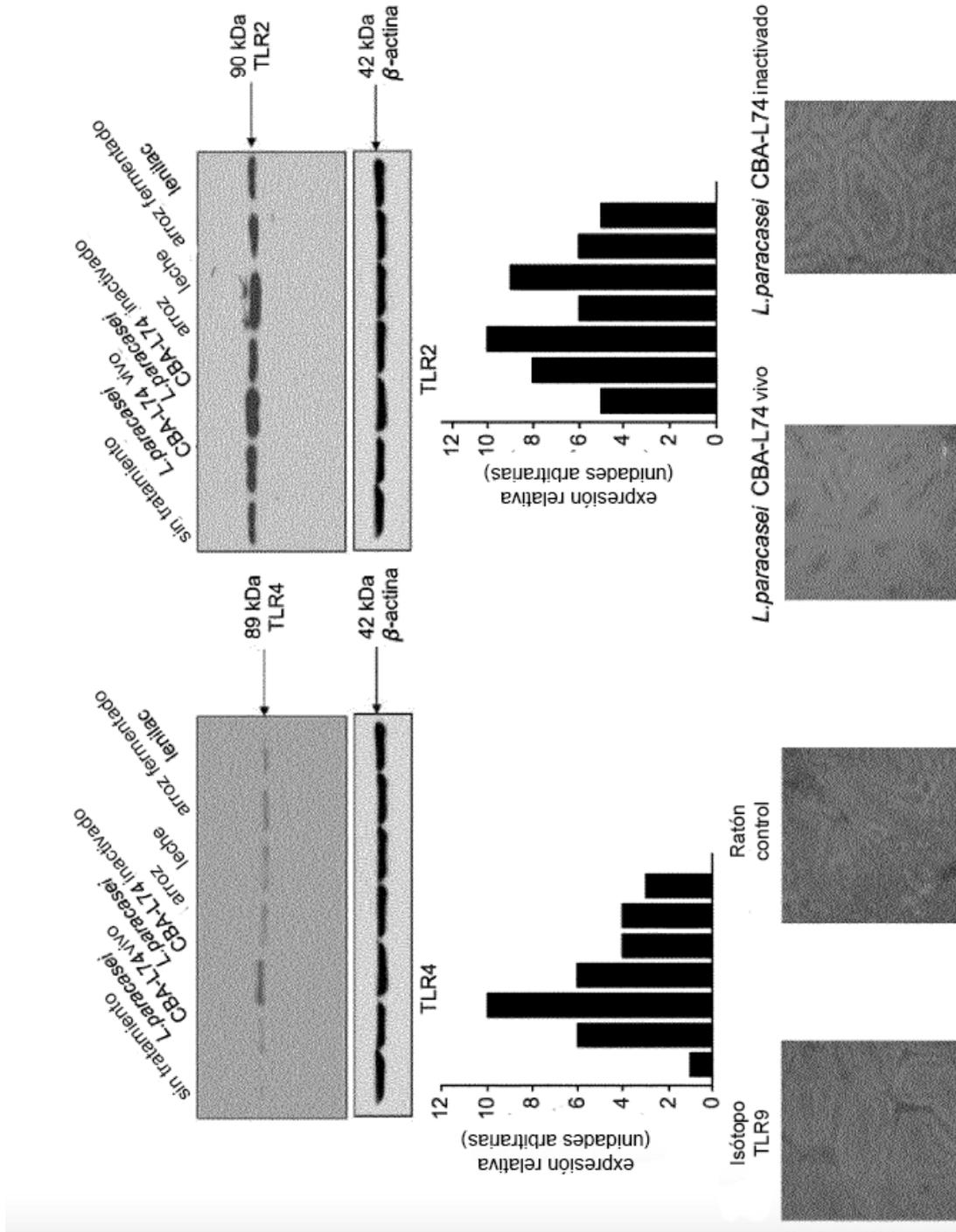


Figura 7

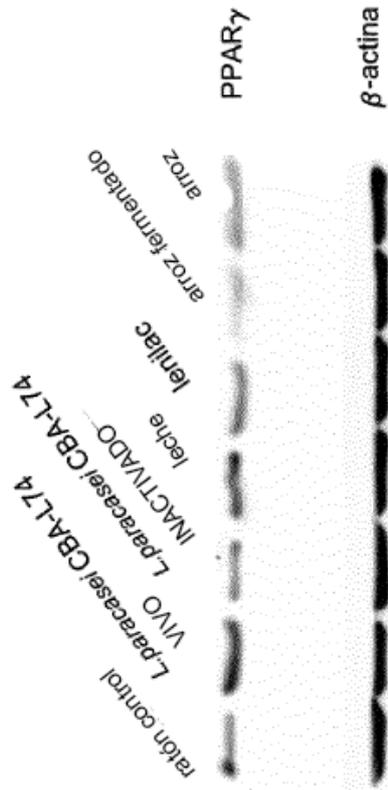
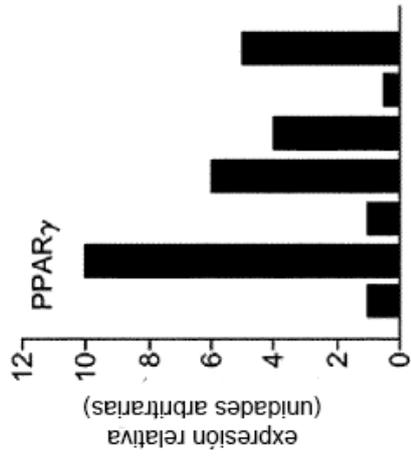


Figura 8

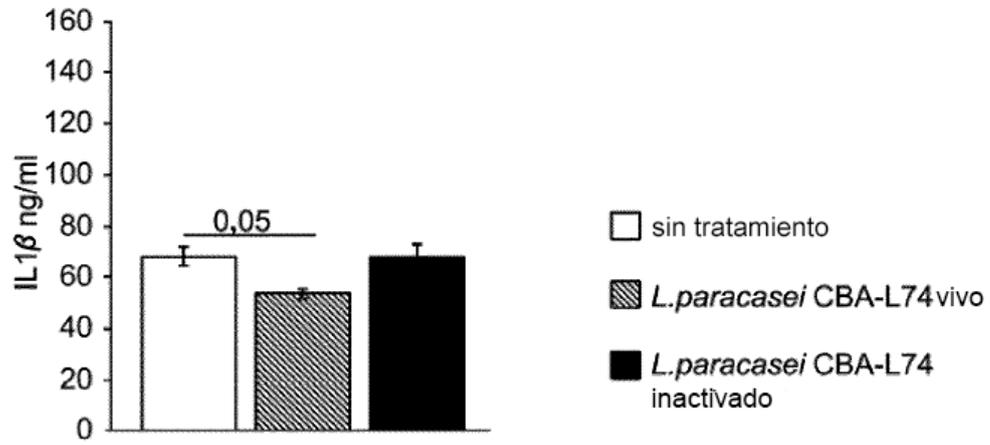


Figura 9a

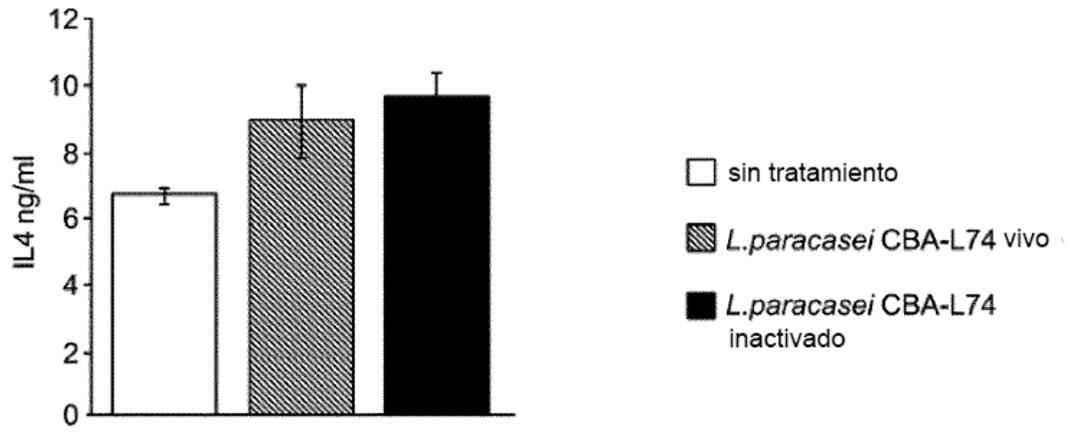


Figura 9b

	% CD1+ / CD80+	% CD1+ / CD86+	% CD1+ / CD40+	% CD1+ / MHC-II
RATONES CONTROL	8,27±0,13	8,15±1,03	9,66±0,76	11,05±0,40
Ratón+ <i>L.paracasei</i> CBA-L74 VIVO	6,99±0,51	7,28±1,07	6,04±0,84	14,74±0,85
Ratón+ <i>L.paracasei</i> CBA-L74 Inactivado	8,76±0,34	8,76±0,95	7,46±0,89	16,98±0,63

Figura 10

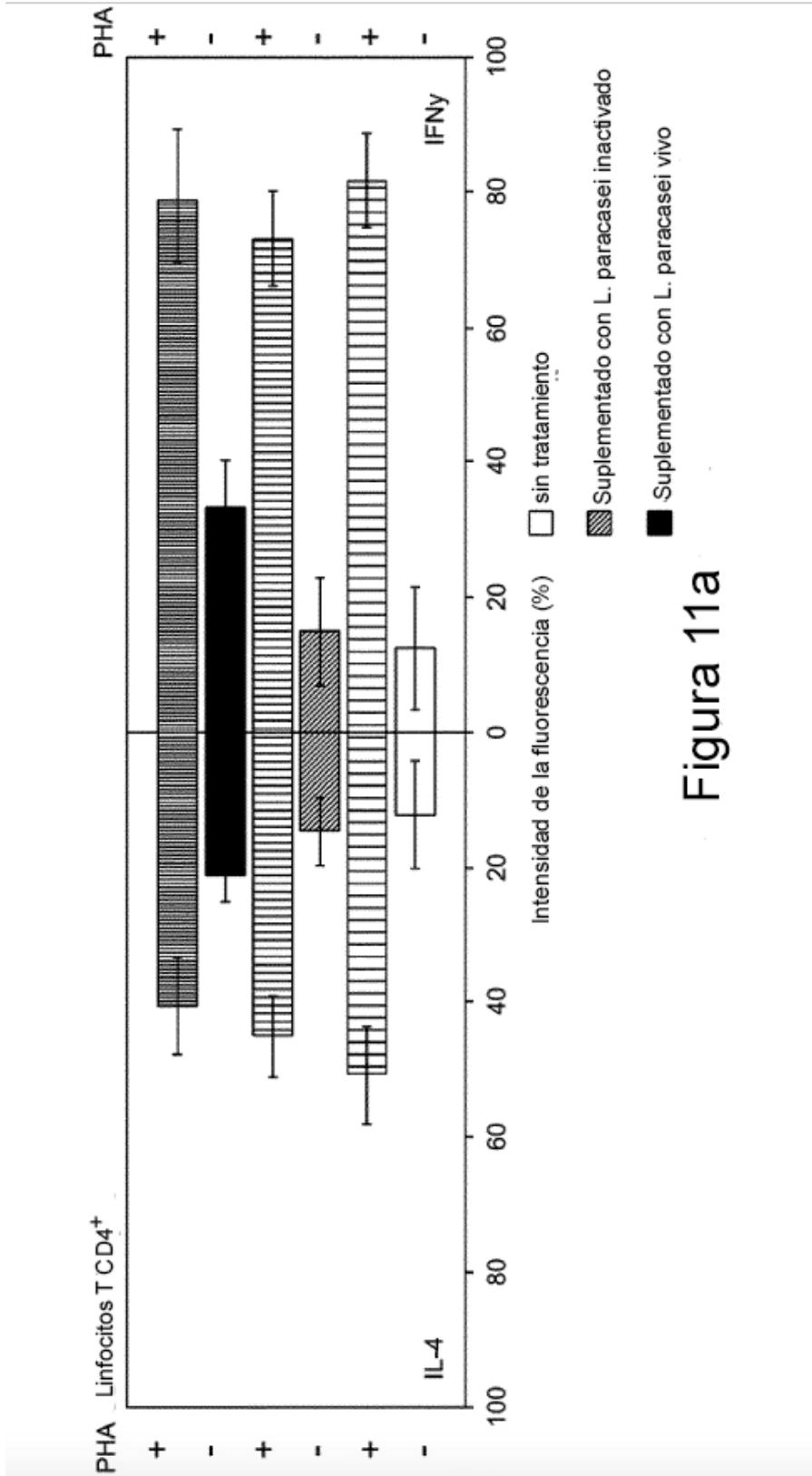


Figura 11a

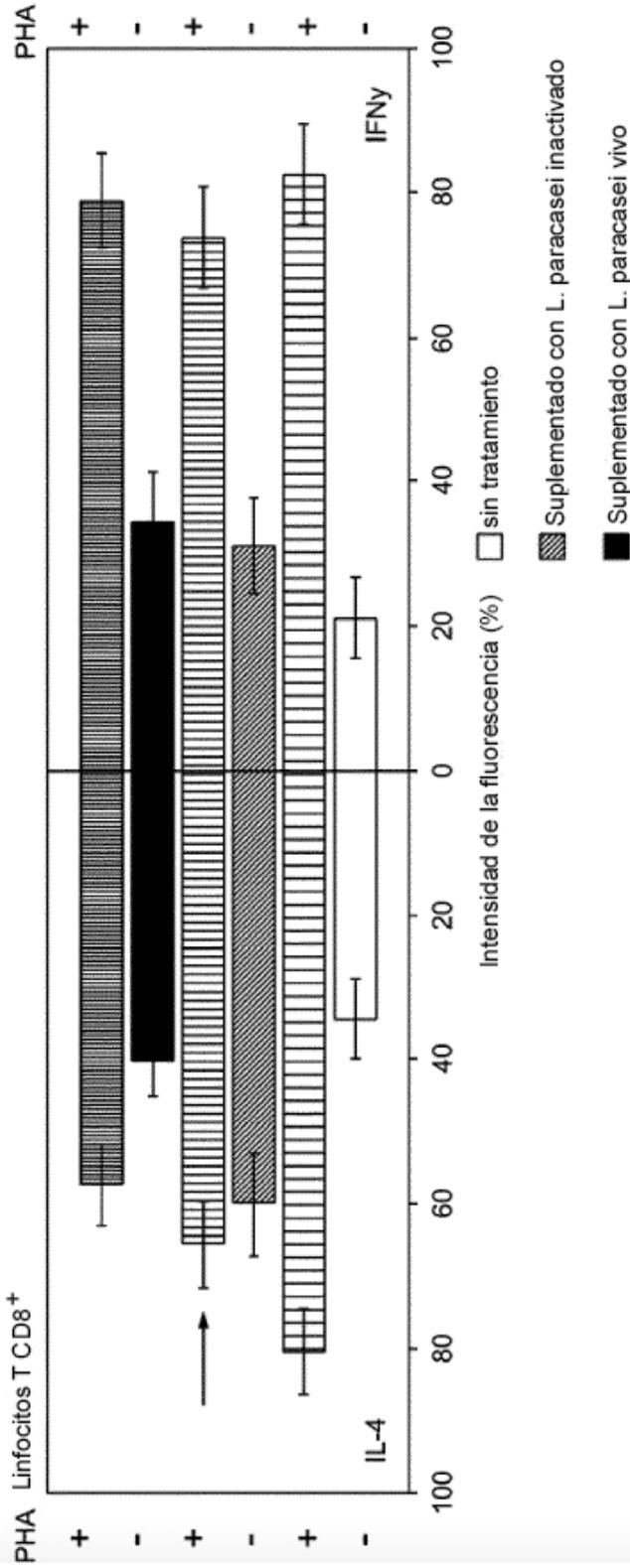


Figura 11b

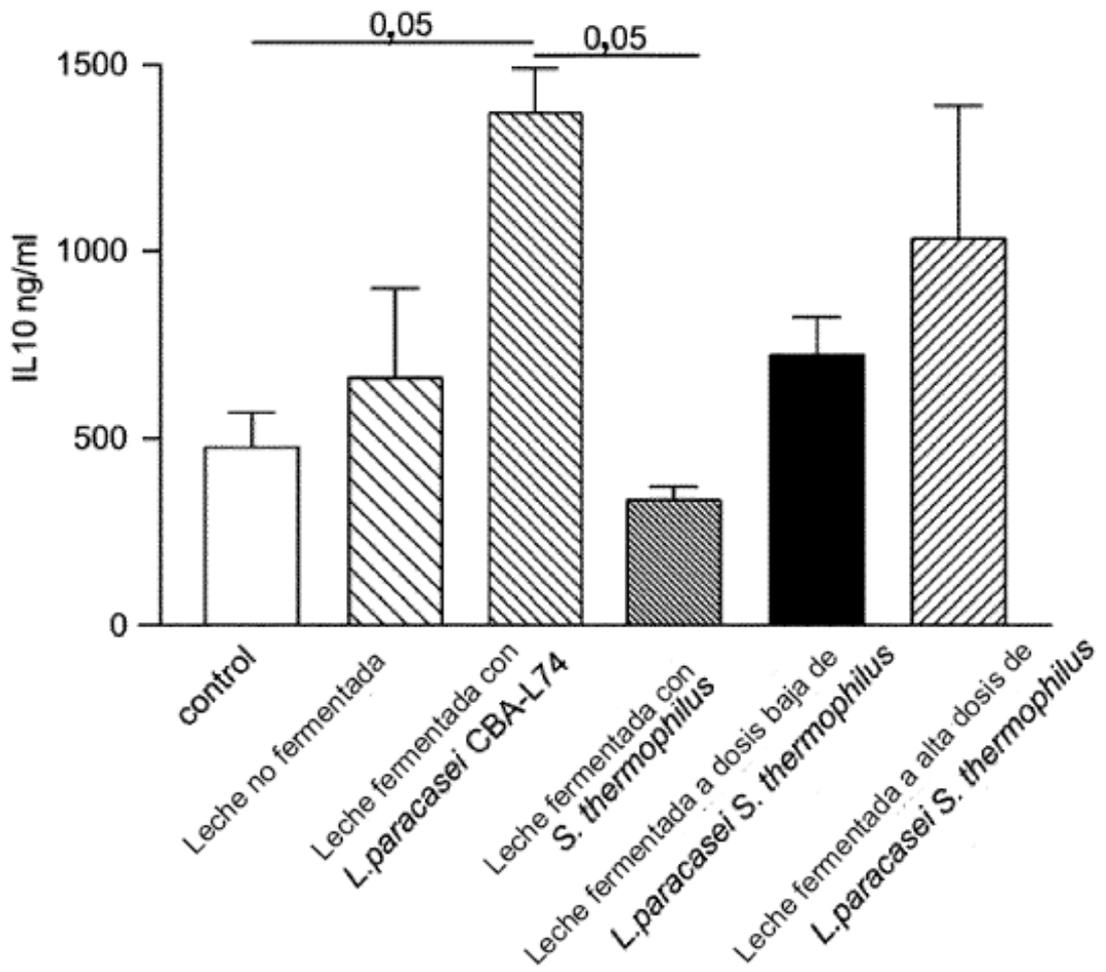


Figura 12

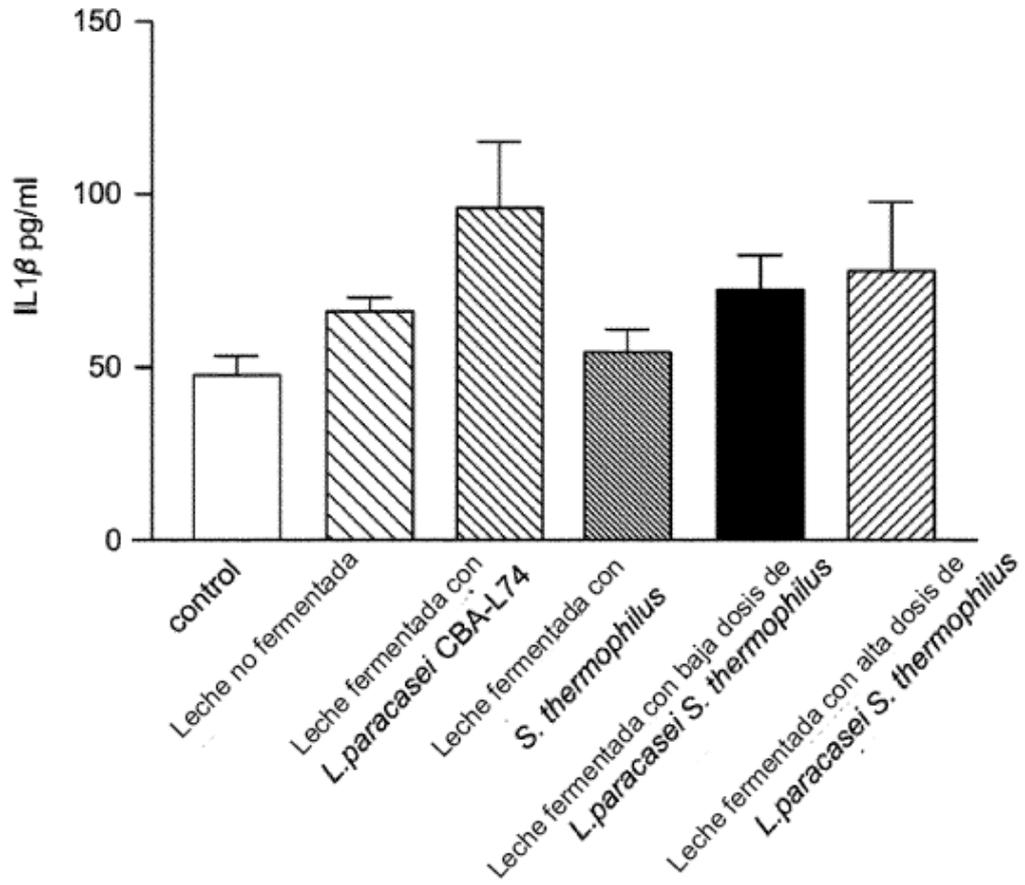


Figura 13

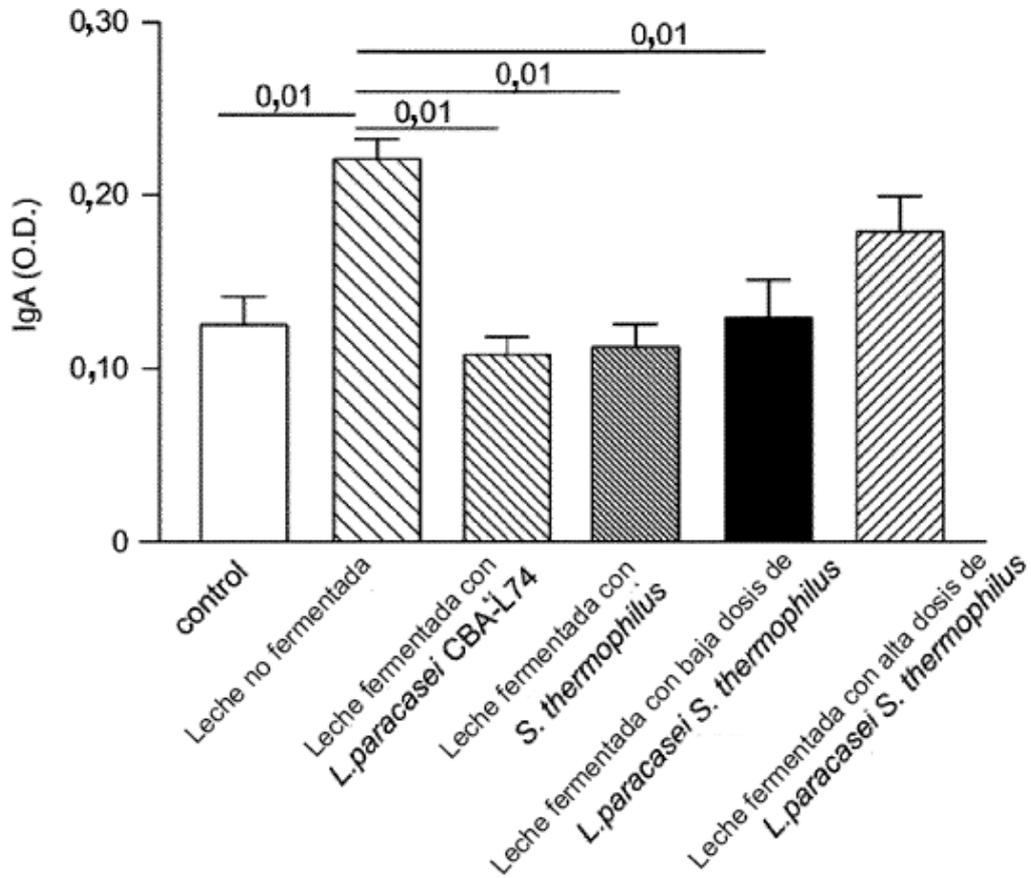


Figura 14

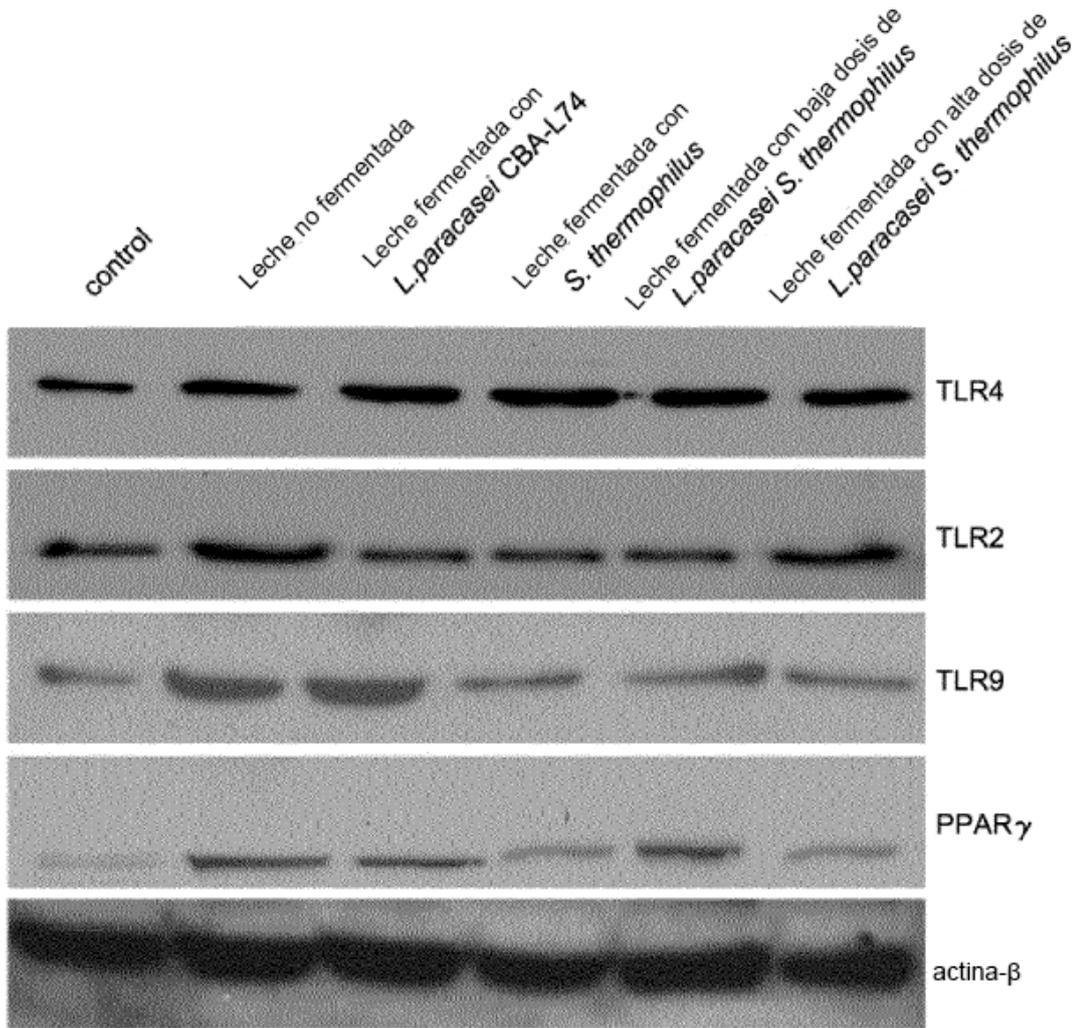


Figura 15a

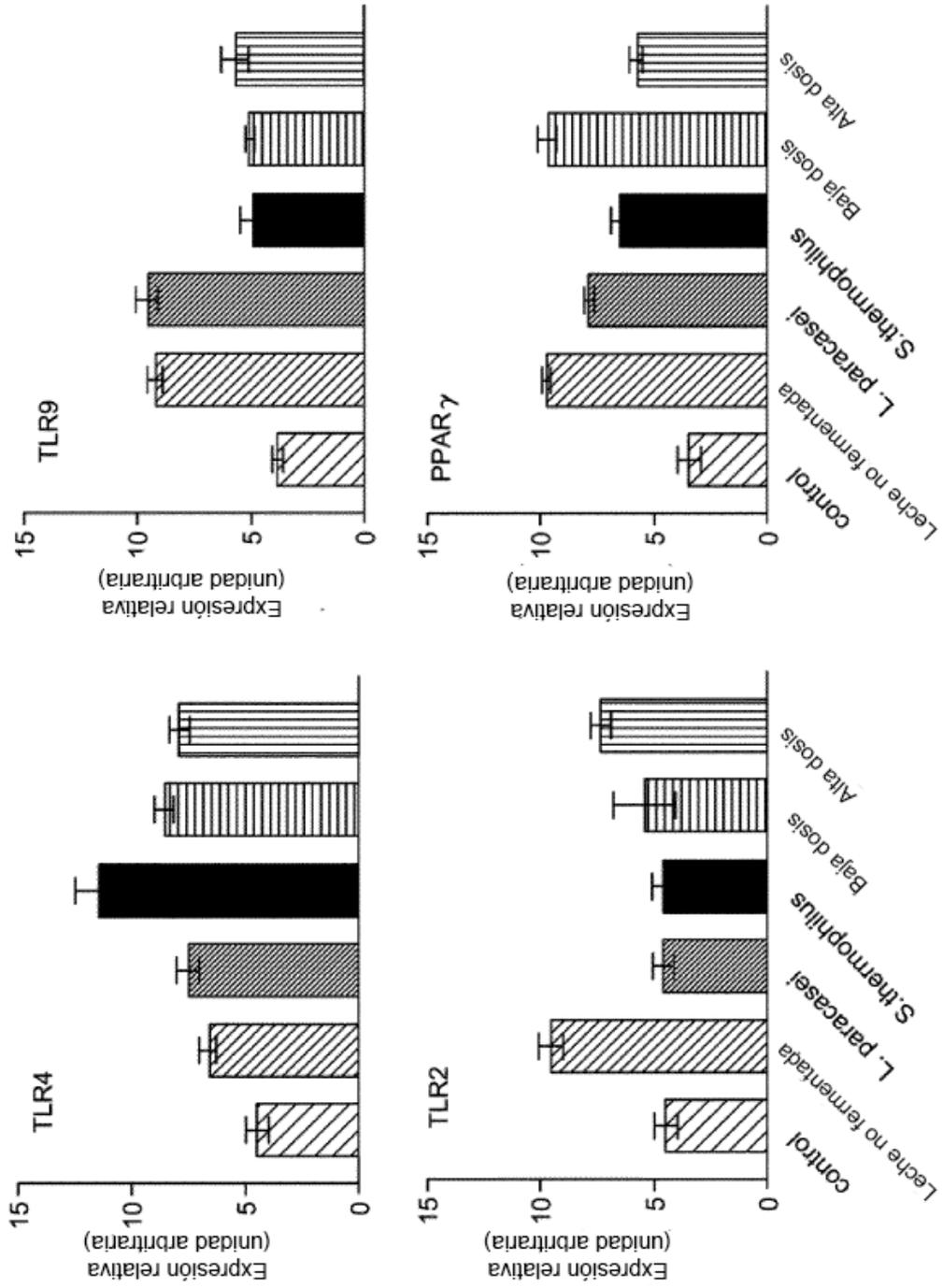


Figura 15b

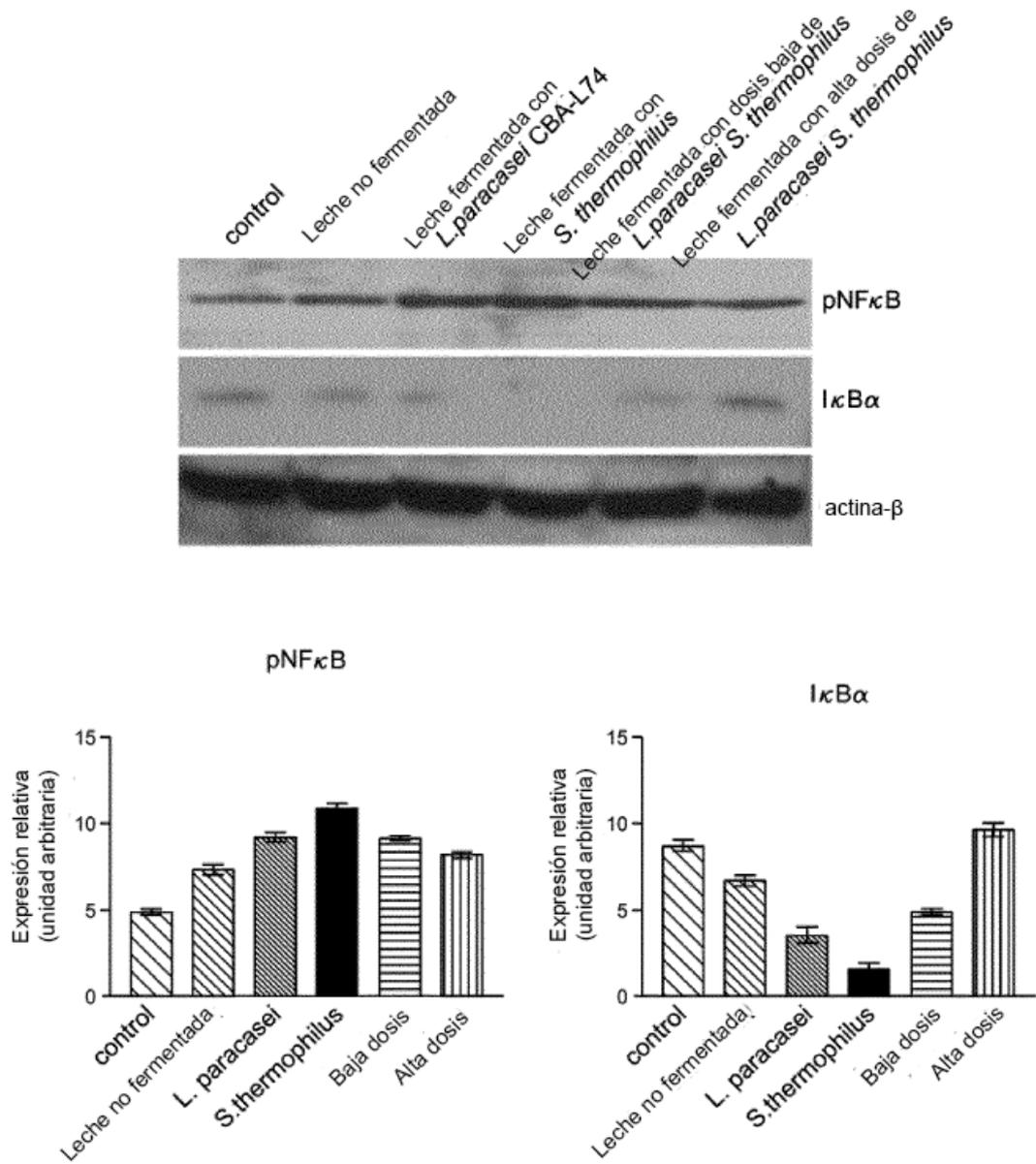


Figura 16

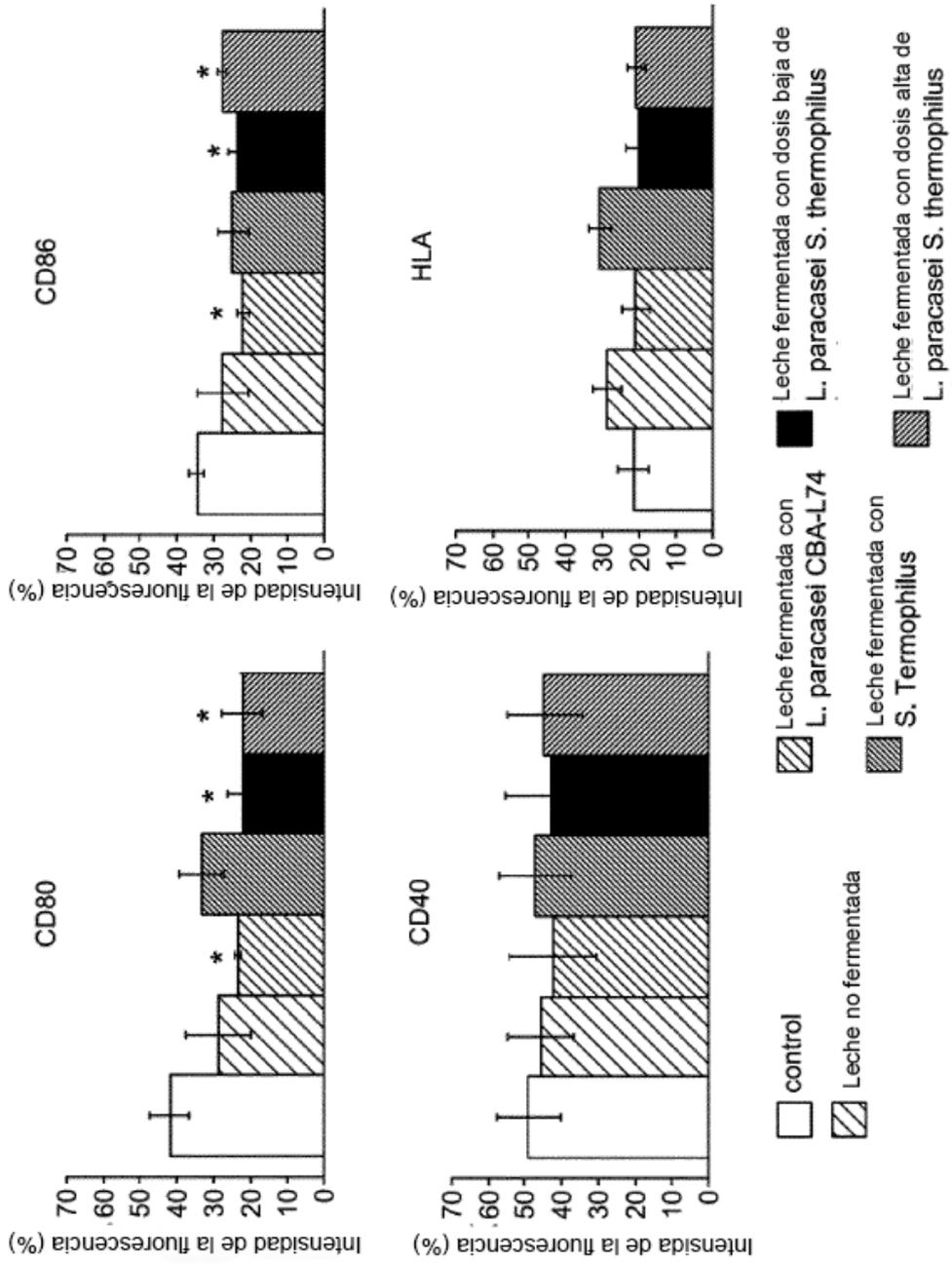


Figura 17

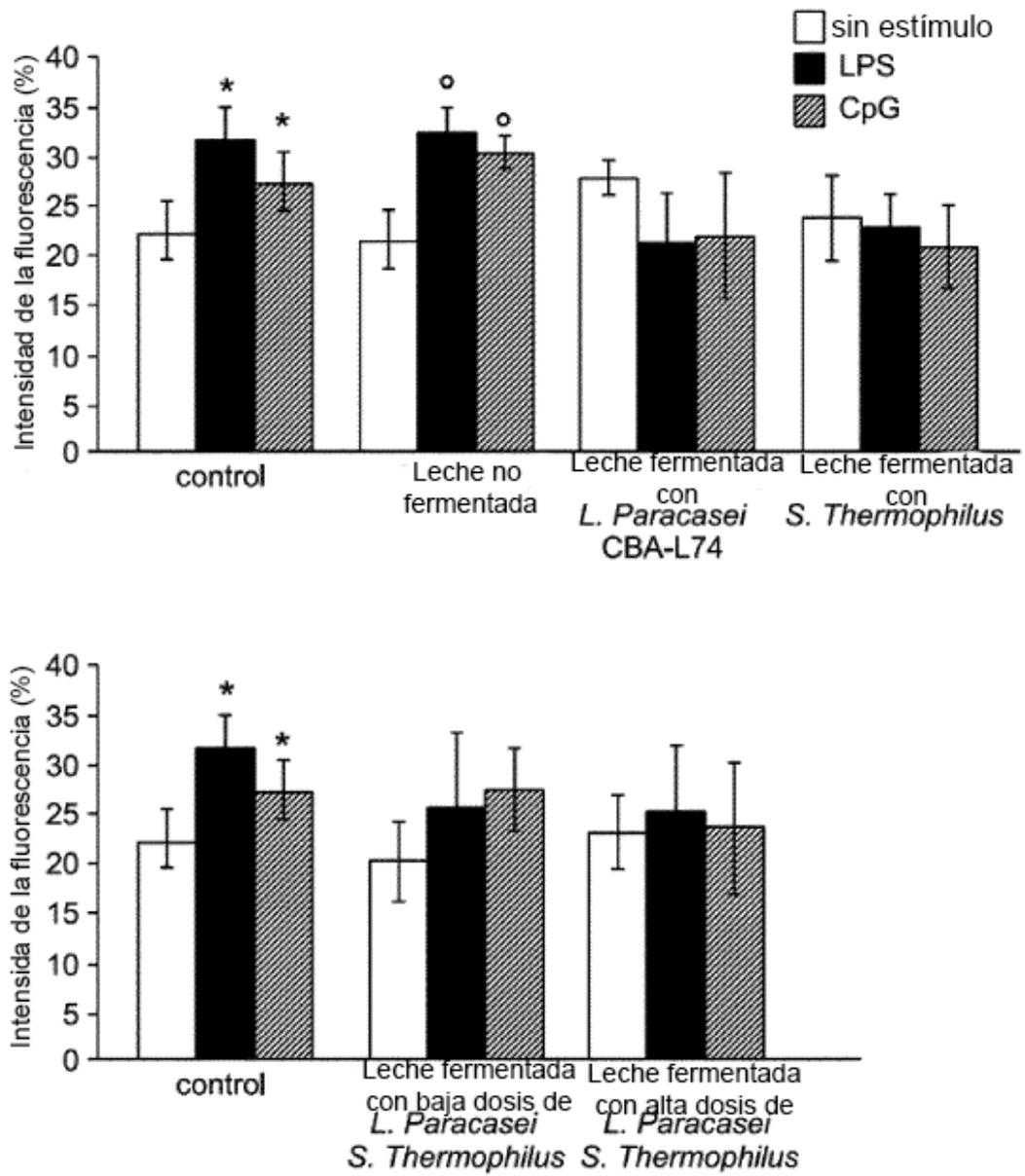


Figura 18

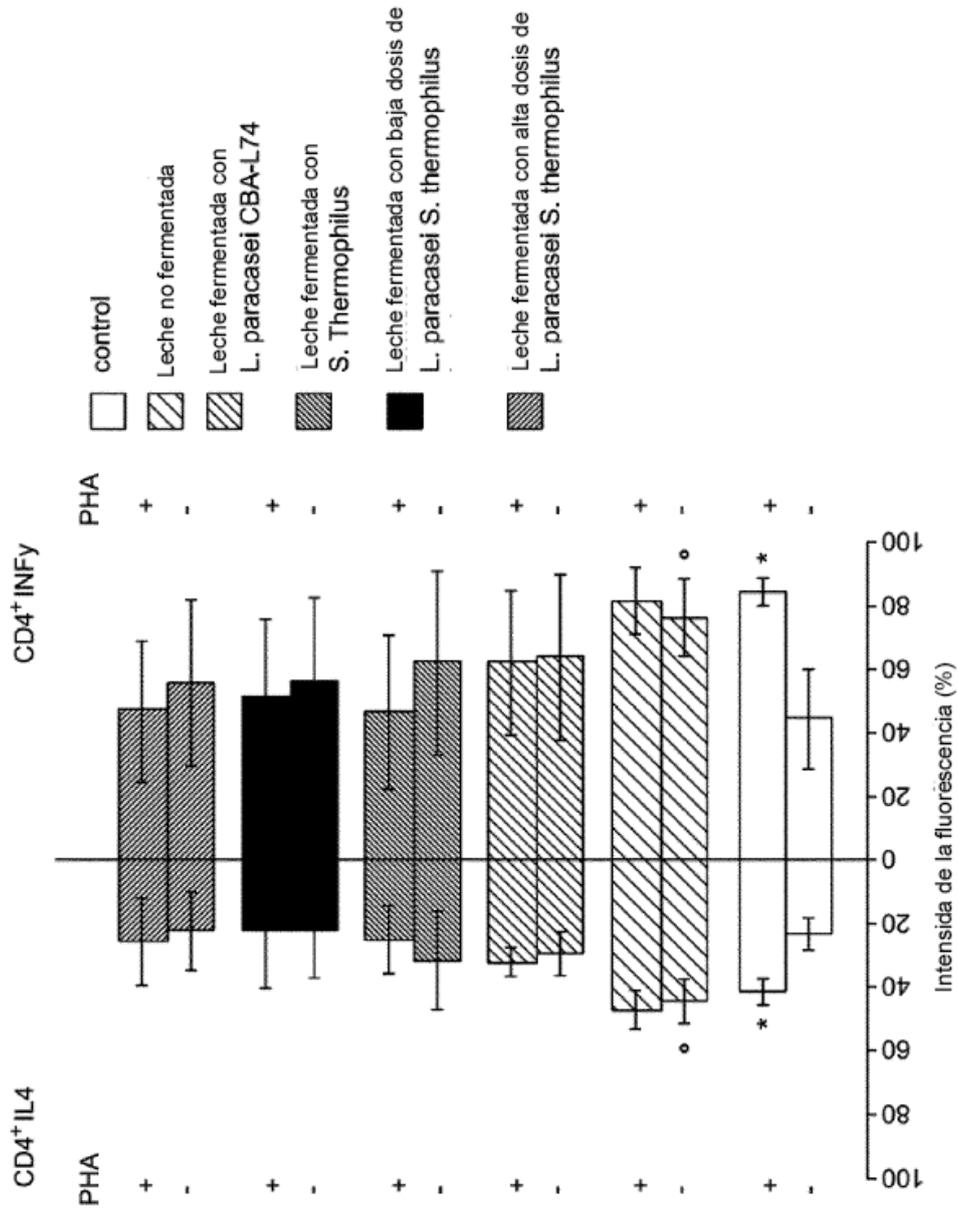


Figura 19



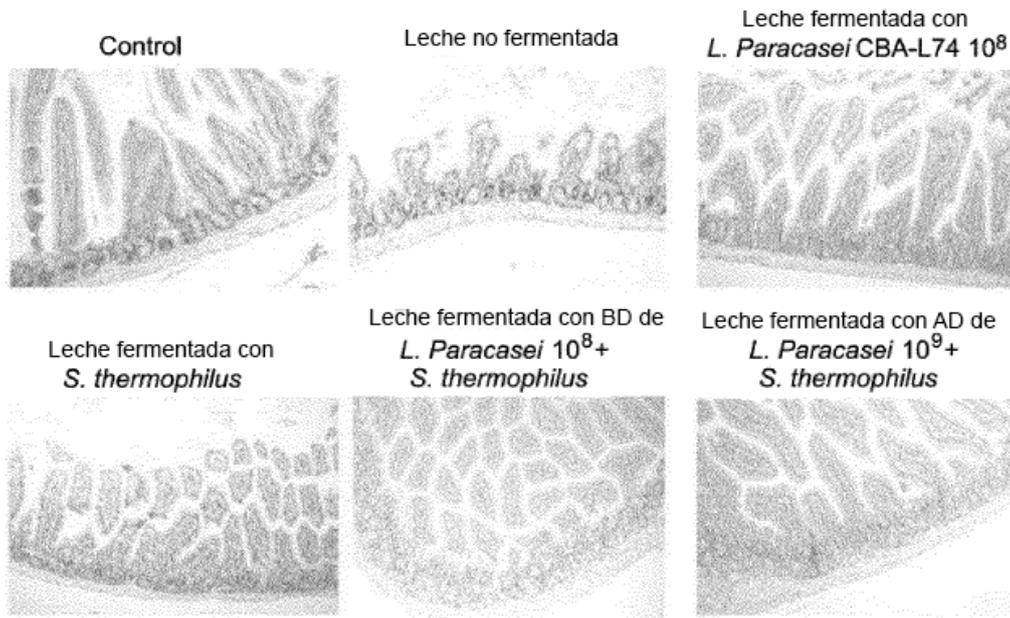


Figura 21

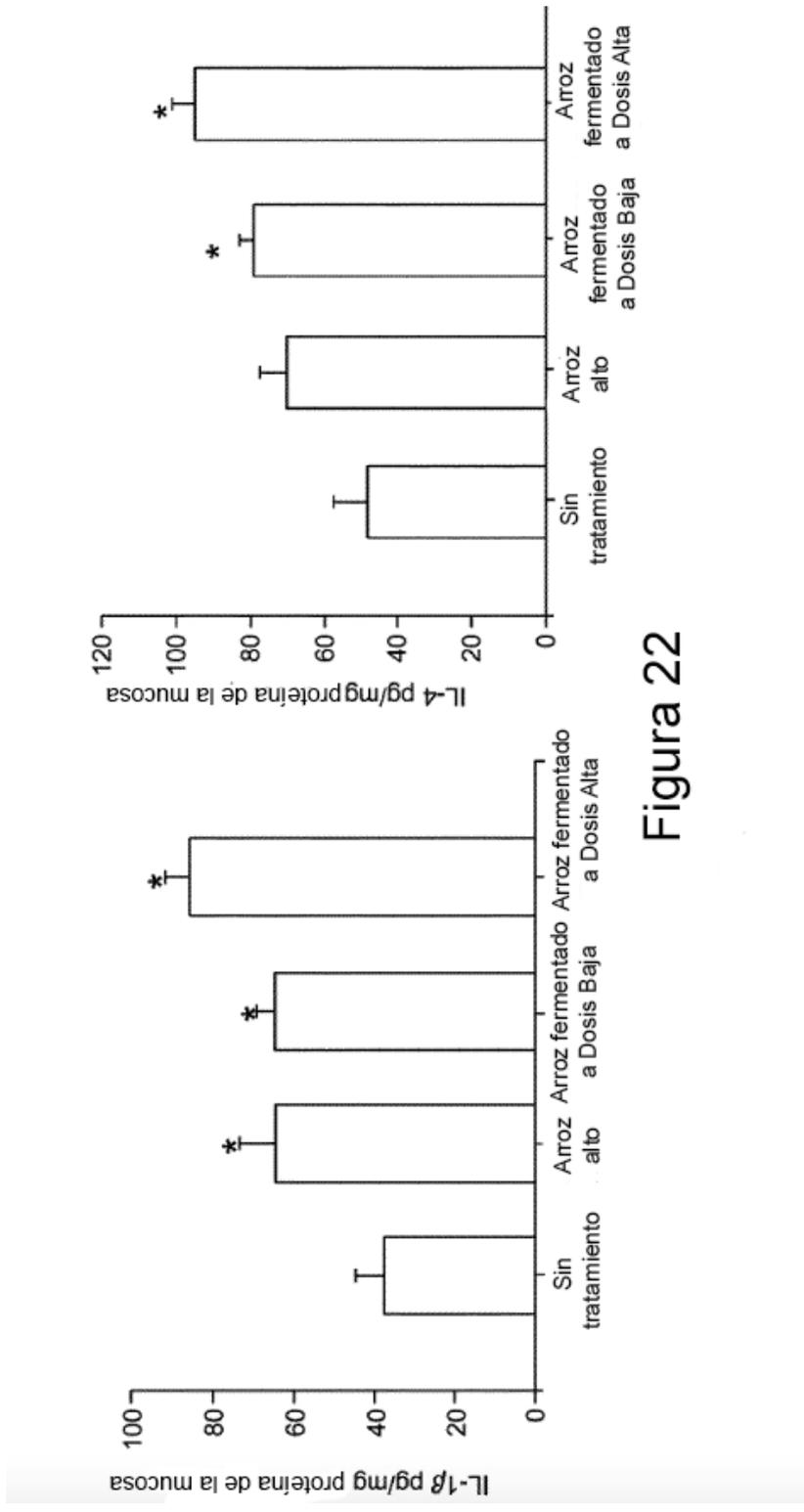


Figura 22

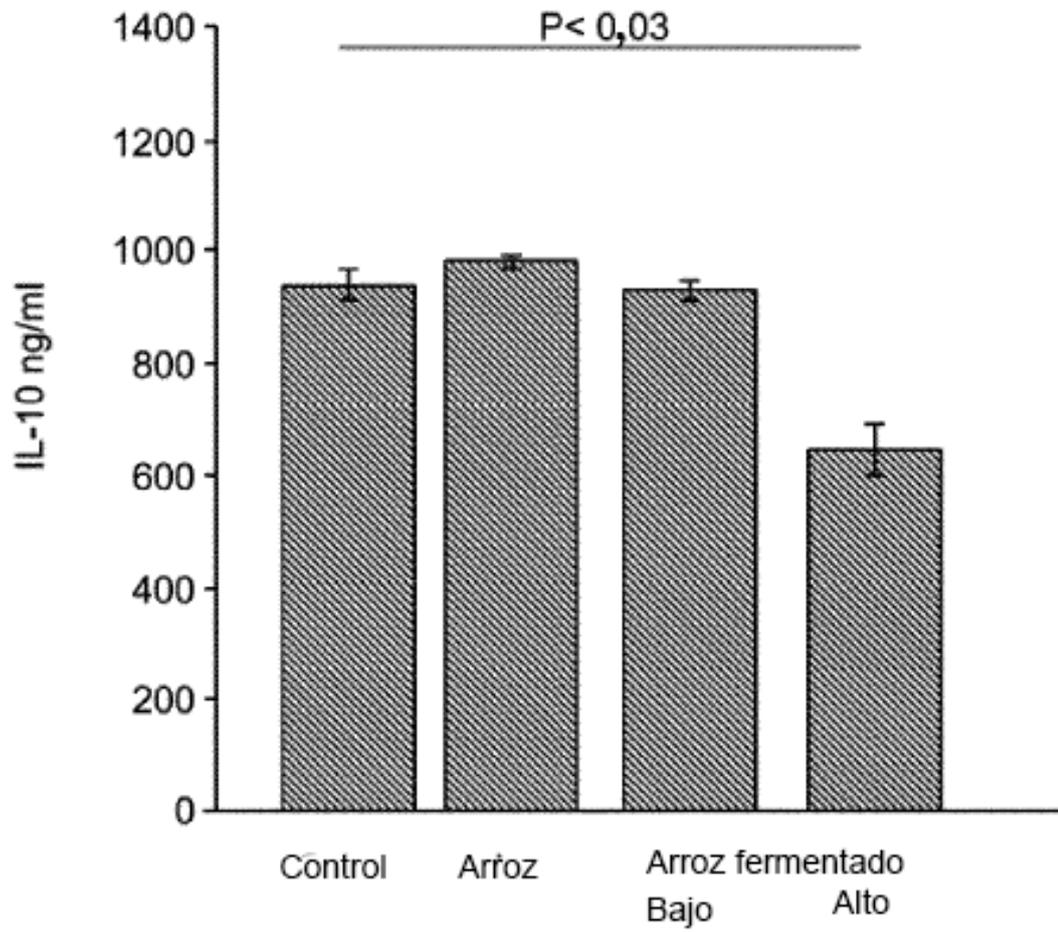


Figura 23

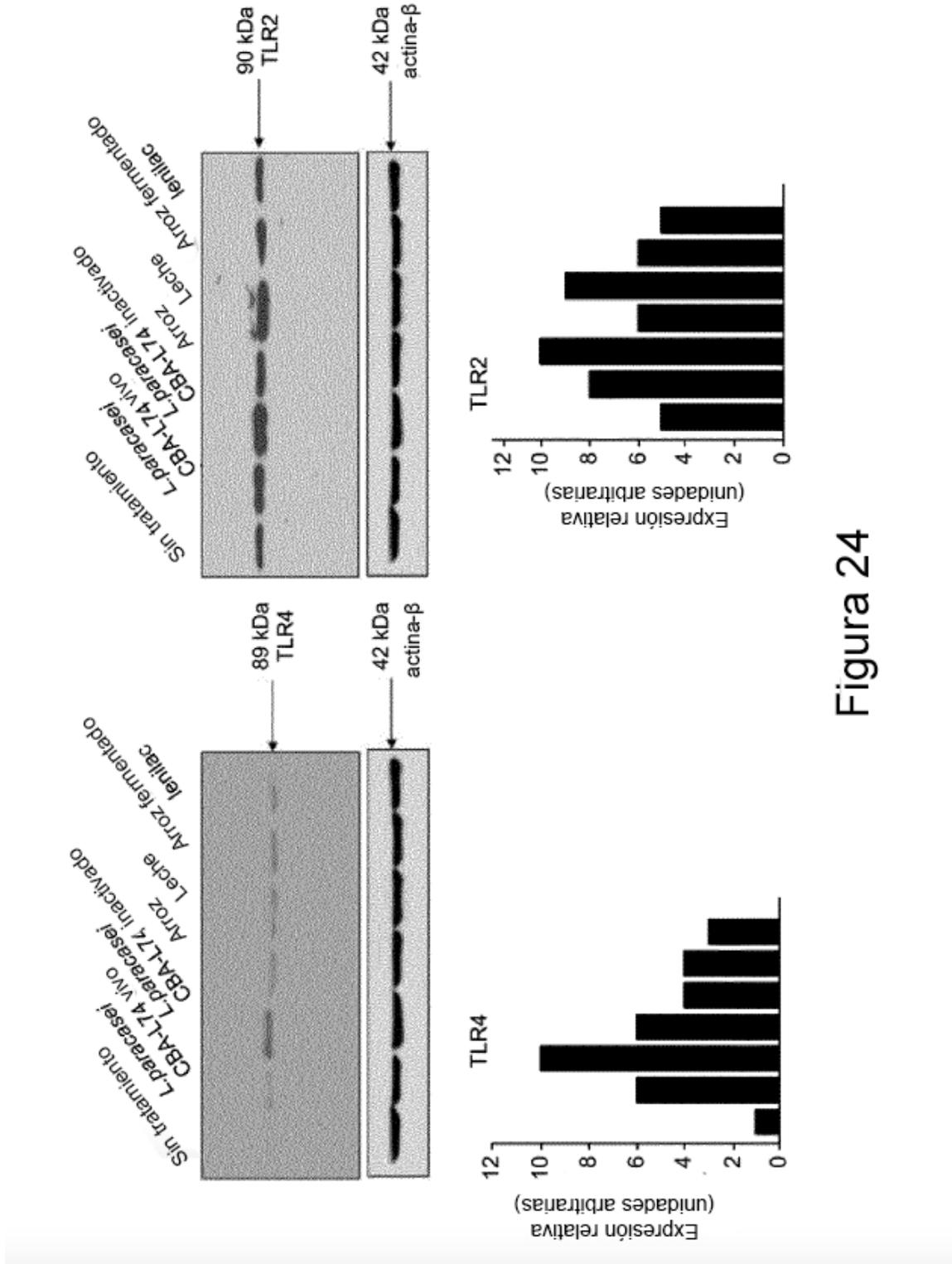


Figura 24

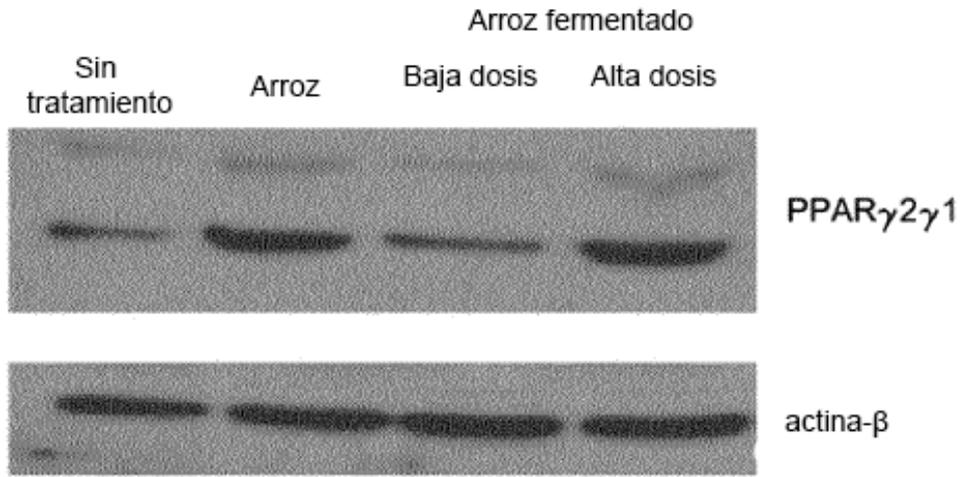


Figura 25a

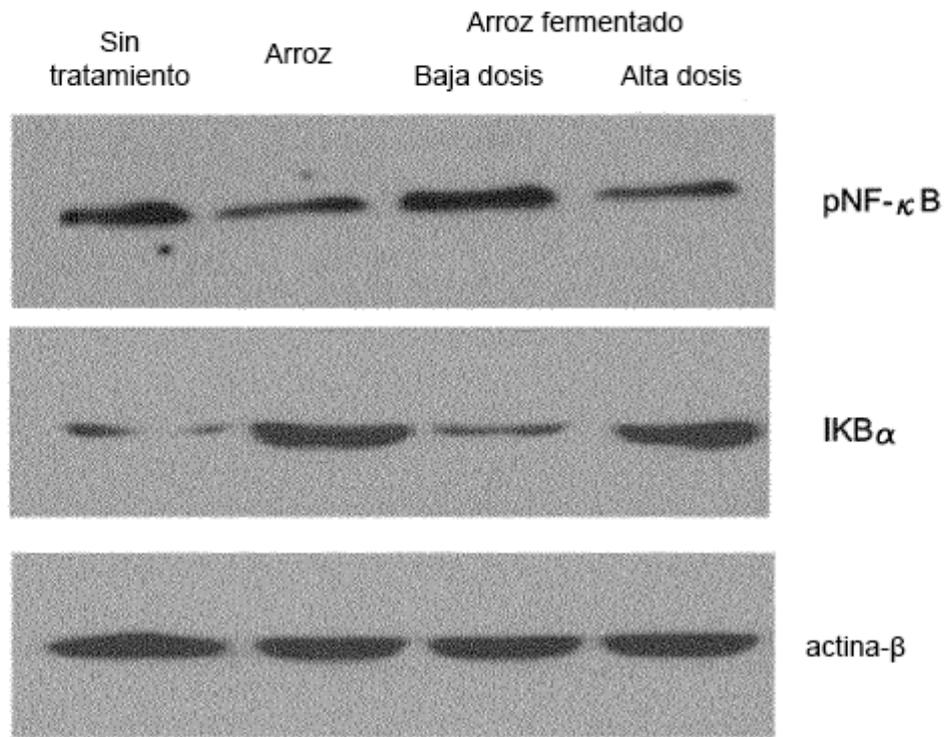


Figura 25b

	% CD1+ / CD80+	% CD1+ / CD86+	% CD1+ / CD40+	% CD1+ / MHC-II
RATONES CONTROL	8,27±0,13	8,15±1,03	9,66±0,76	11,05±0,40
Ratones + Arroz (100 mg)	8,16±0,13	7,80±1,03	19,19±0,76	12,31±0,40
Ratones + ARROZ FERMENTADO (100 mg)	9,03±0,51	2,24±1,07	14,32±0,84	18,46±0,85
Ratones + ARROZ (500 mg)	8,32±0,51	8,94±0,73	9,01±0,34	13,05±0,82
Ratones + ARROZ FERMENTADO (500 mg)	15,95±0,43	7,18±0,95	13,84±0,89	32,83±0,93

Figura 26

	Control	LPS	CpG
RATONES CONTROL	20,86±0,43	25,01±0,83	23,56±0,74
Ratones + Arroz	19,3 ±0,21	24,2 ±0,97	22,03±0,88
Ratones + ARROZ FERMENTADO (100 mg)	27,4 ±0,51	21,7 ±0,97	23,71±1,40
Ratones + ARROZ FERMENTADO (500 mg)	22,01±0,74	23,21±0,54	20,67±0,92

Figura 27

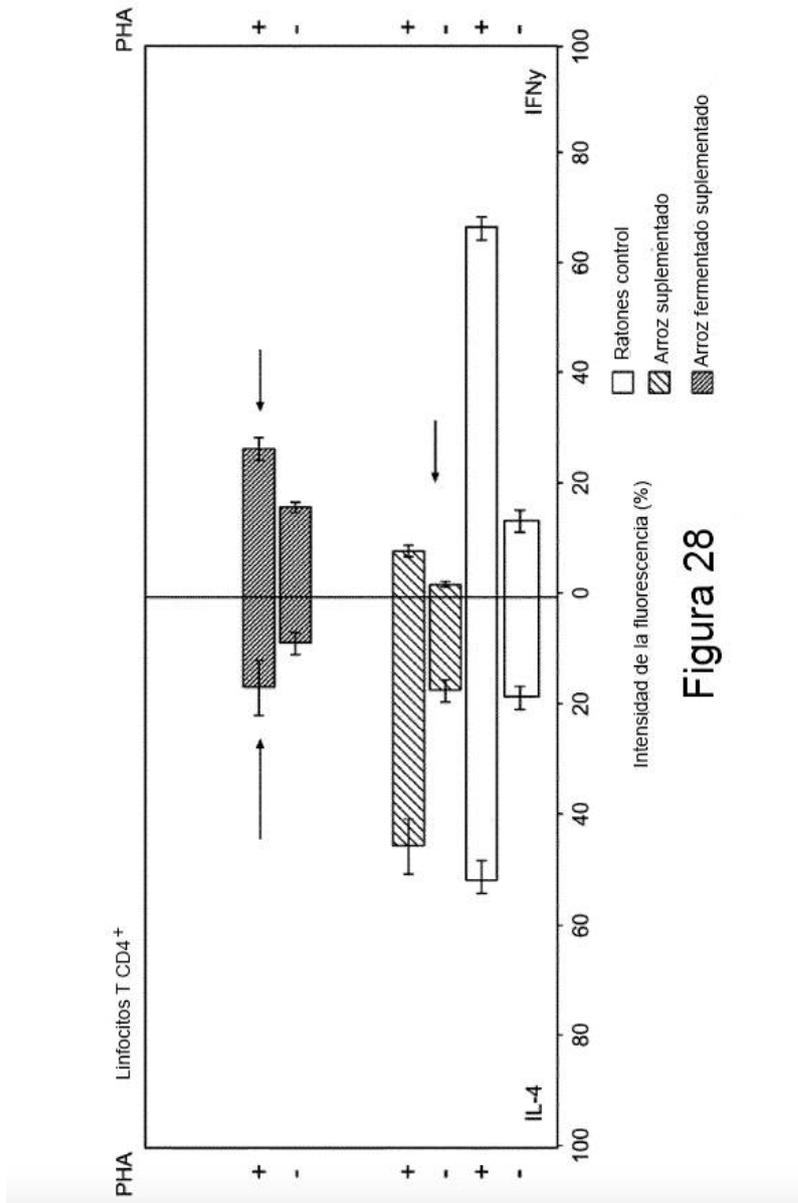


Figura 28

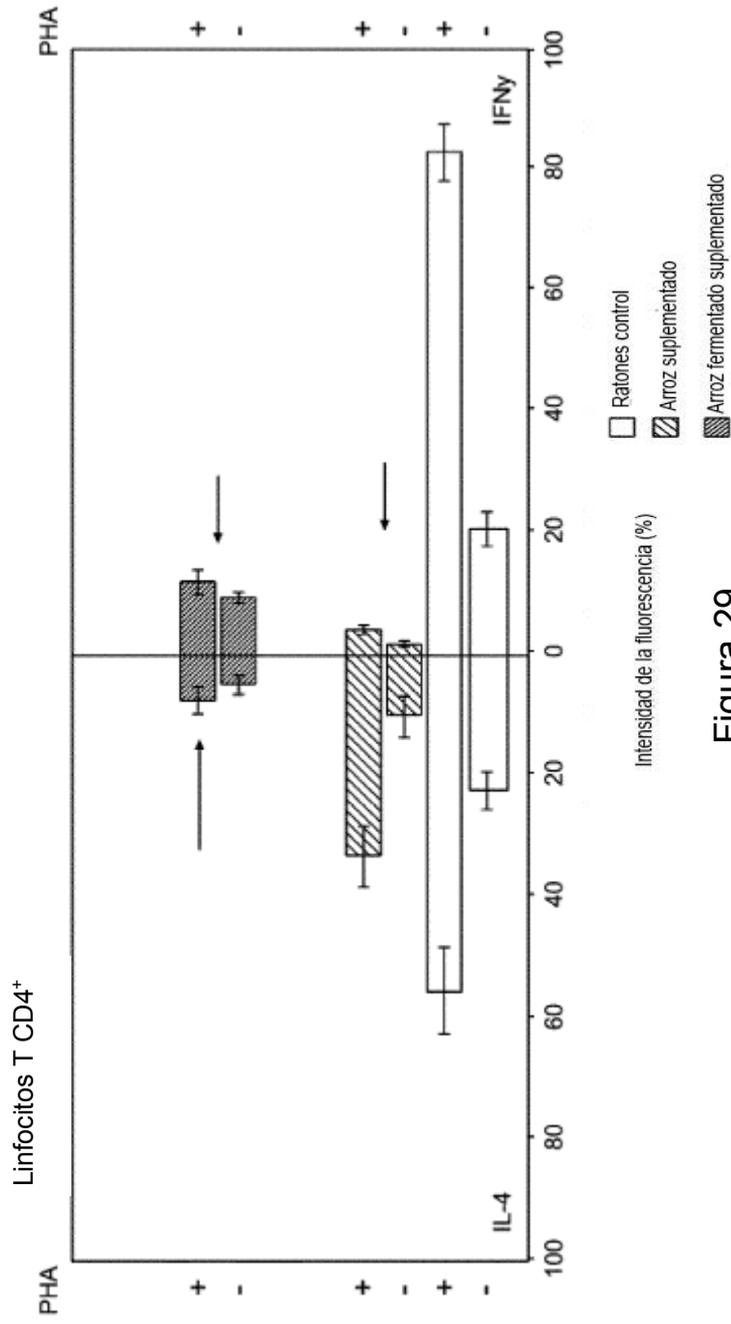


Figura 29

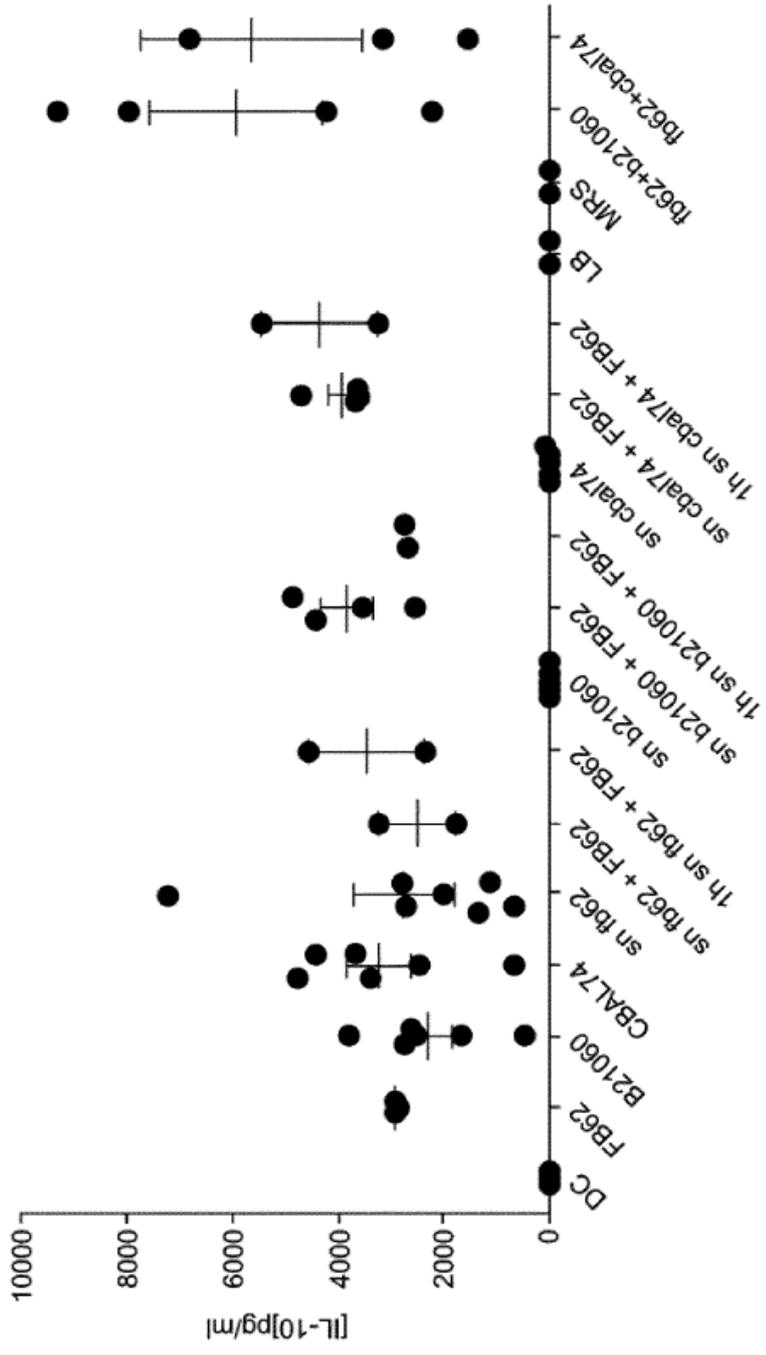


Figura 30

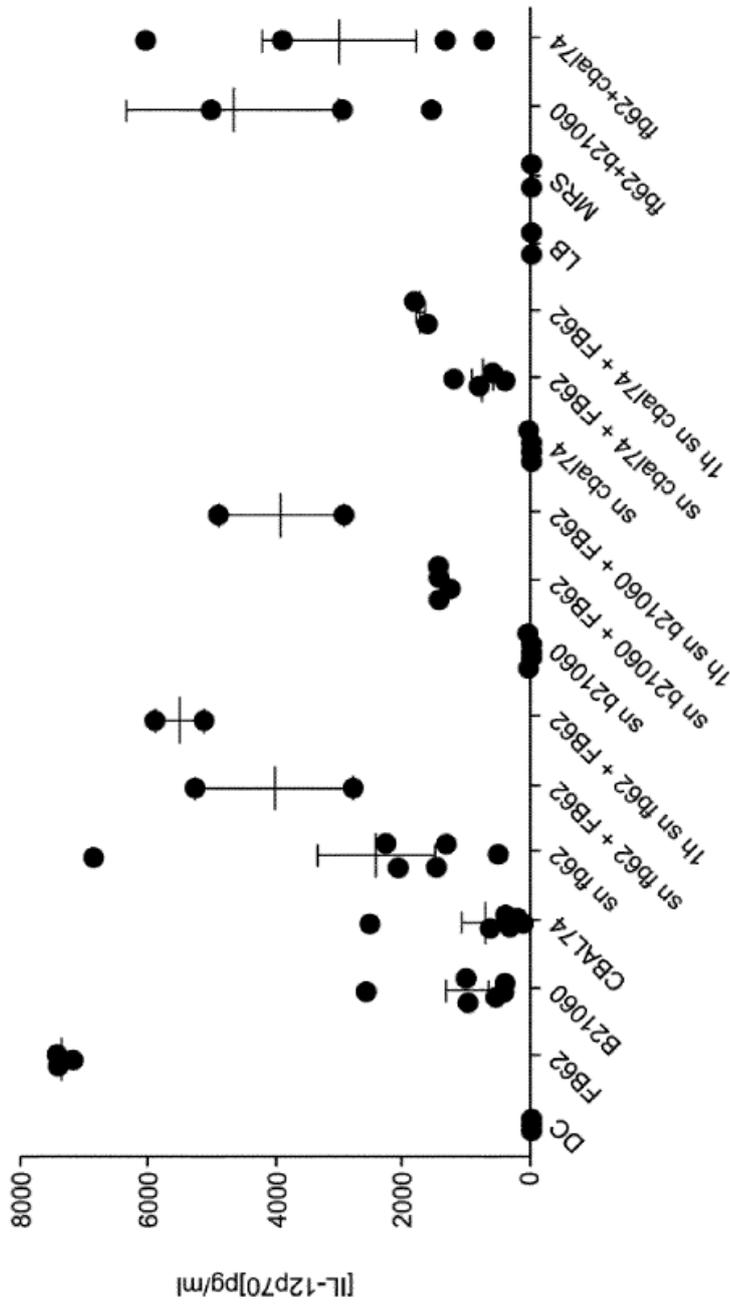


Figura 31

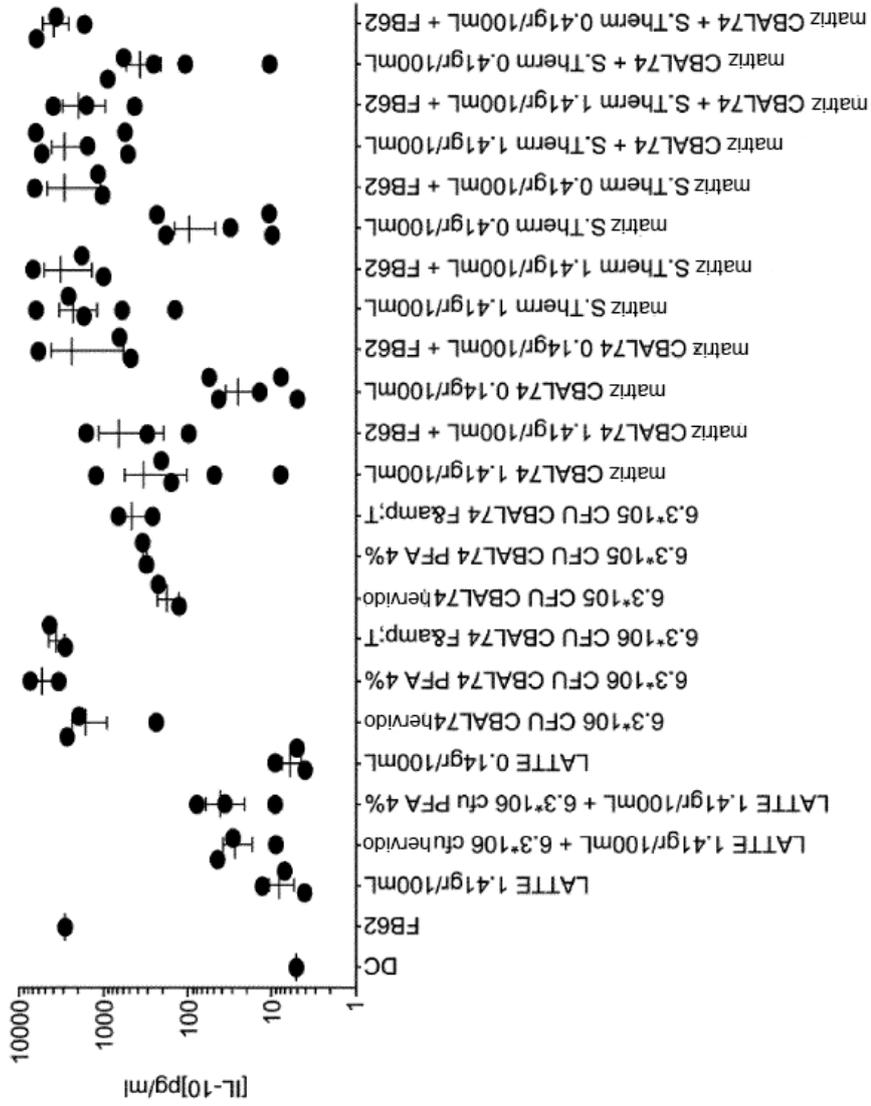


Figura 32

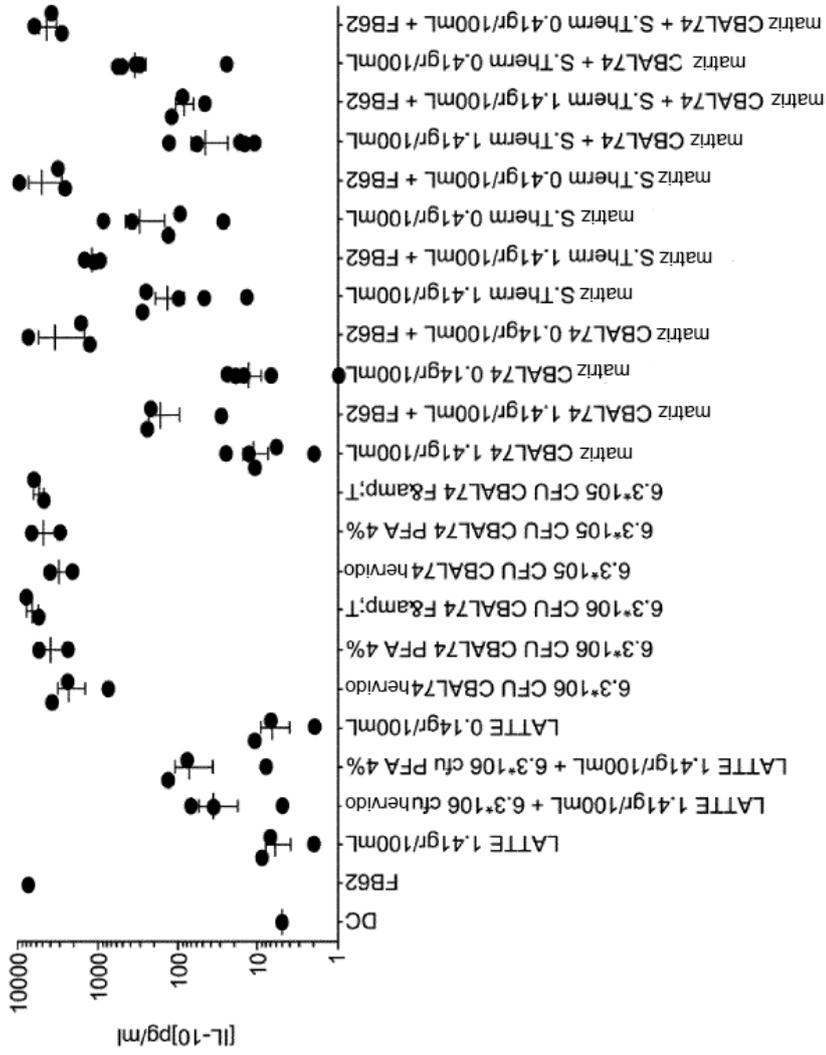


Figura 33

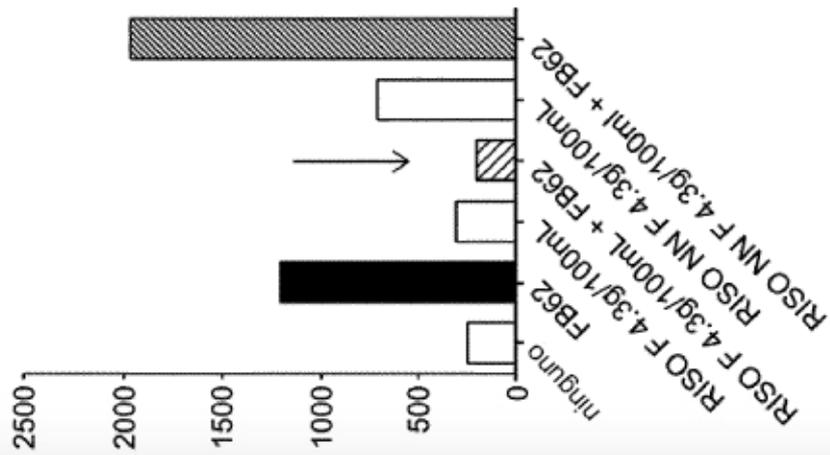
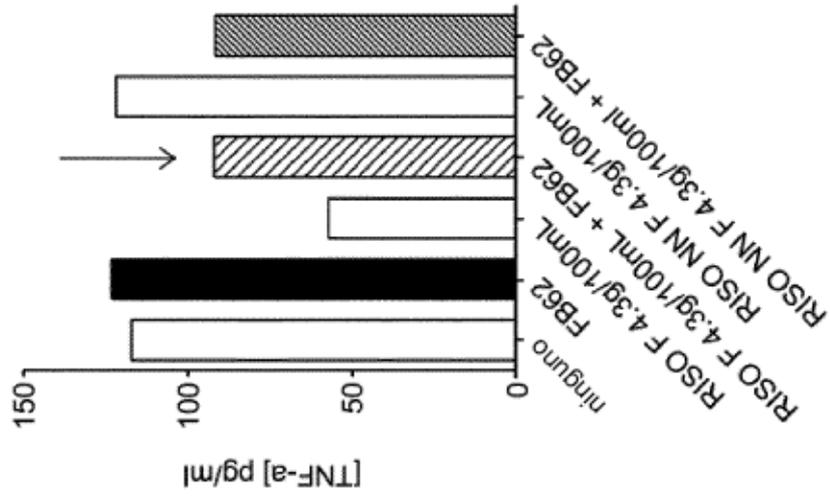
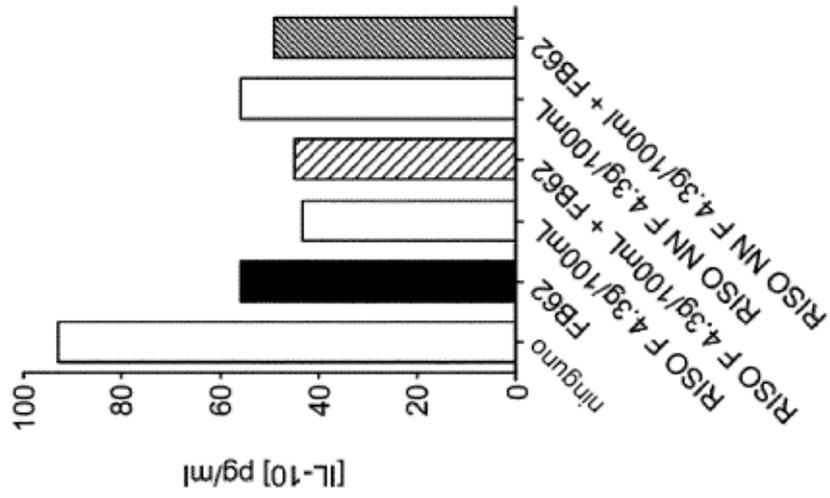


Figura 34