

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 087**

51 Int. Cl.:

C07K 14/335	(2006.01)	A61K 31/708	(2006.01)
A61K 38/10	(2006.01)	A61K 35/747	(2015.01)
A61P 37/00	(2006.01)	A23L 33/135	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)	A23L 33/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)		
A61K 31/045	(2006.01)		
A61K 31/19	(2006.01)		
A61K 31/198	(2006.01)		
A61K 31/401	(2006.01)		
A61K 31/4172	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2013 PCT/US2013/046286**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2013 WO13192163**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2013 E 13807318 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2861242**

54 Título: **Trastornos relacionados con el gluten**

30 Prioridad:

18.06.2012 US 201261661105 P
13.11.2012 US 201261725693 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FASANO, FRANCESCA, ROMANA y
BUDELLI, ANDREA, LUIGI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 691 087 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

Trastornos relacionados con el gluten

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación de la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/661.105, que se presentó el 18 de junio de 2012, y la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/725.693, que se presentó el 13 de noviembre de 2012, con el fin de cualquier solicitud de EE.UU. que pueda reivindicar el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/661.105 y la solicitud provisional de EE.UU. N° 61/725.693.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a organismos y composiciones probióticos. Estas composiciones son útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con el gluten, por ejemplo, la celiacía.

Antecedentes de la invención

15 El gluten y los polipéptidos relacionados con el gluten se encuentran en muchos granos de cereal, que incluyen trigo, centeno y cebada. Para individuos con trastornos relacionados con el gluten tales como la celiacía y la sensibilidad al gluten, el consumo de alimentos que contienen gluten puede tener graves y duraderas consecuencias para la salud. La celiacía es un trastorno autoinmunitario del intestino delgado que es desencadenado por el consumo de gluten en personas genéticamente predispuestas. Ciertos fragmentos del gluten ("gliadinas") estimulan una respuesta inmunitaria que daña permanentemente el intestino delgado y previene la absorción de nutrientes. La celiacía puede presentar un amplio espectro de síntomas. Los más comunes incluyen diarrea crónica, distensión abdominal, pérdida de peso y retraso del crecimiento (en niños). La celiacía también se puede asociar a anemia por deficiencia de hierro, osteoporosis, talla baja, artritis, infertilidad, neuropatía periférica e insuficiencia hepática. Los pacientes con celiacía también están en riesgo elevado de ciertos tipos de cánceres, tales como carcinomas del intestino delgado y linfoma no Hodgkin. Se estima que la incidencia de la celiacía en poblaciones de descendientes europeos es de entre 0,5 y 1,5 %. La incidencia está aumentando tanto en EE.UU. como Europa, así como en Asia, en parte debido a la adopción de patrones dietéticos occidentalizados. La celiacía normalmente se diagnostica en la niñez o infancia, aunque el número de diagnósticos hechos en la adultez también está en aumento. Actualmente no hay cura para la celiacía y el tratamiento de referencia es una limitación durante toda la vida a una dieta sin gluten.

20 La sensibilidad al gluten está peor caracterizada que la celiacía. Presenta muchos de los mismos síntomas, pero no incluye el daño al intestino delgado. El diagnóstico se tiende a hacer basándose en criterios de exclusión y mejora de síntomas una vez el paciente se pone en una dieta sin gluten.

25 La adherencia a una dieta libre de gluten requiere la estricta evitación de productos de trigo, centeno y cebada. Esto puede ser exigente, dada la información de etiquetado frecuentemente insuficiente sobre el contenido de gluten de los alimentos; la oportunidad de contaminación durante el procesamiento y la preparación del alimento, especialmente para los alimentos preparados fuera de casa; el coste económico de los productos sin gluten y la fuerza de voluntad requerida para la estricta adherencia. El cumplimiento también se puede afectar por el acceso a la educación y el asesoramiento, ayuda familiar y social, y factores psicológicos. Además, la estricta adherencia a una dieta sin gluten puede dar como resultado deficiencias de micronutrientes. Dichas deficiencias, particularmente en las vitaminas 8 (vitamina 86, vitamina 812 y ácido fólico), y ciertos oligoelementos, por ejemplo, hierro, cinc y cobre, pueden dar como resultado problemas de salud posiblemente significativos, particularmente en niños. Existe una necesidad continua de agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos relacionados con el gluten.

Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona composiciones que comprenden *Lactobacillus paracasei* C8A L74, número de acceso del depósito internacional LMG P-24778, para su uso en reducir la toxicidad del péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten. *Lactobacillus paracasei* CBA L74, número de acceso del depósito internacional LMG P-24778, produce metabolitos, que son sustancialmente estables a temperaturas por encima de las temperaturas fisiológicas habituales, reduciendo la entrada celular de péptidos gliadina. El péptido gliadina puede variar y puede incluir péptidos que engloban uno o más epítomos reconocidos por los linfocitos T, por ejemplo, P57-68, y péptidos que son reconocidos por el sistema inmunitario innato, por ejemplo, P31-43. Los péptidos a modo de ejemplo incluyen péptidos de α -gliadina, por ejemplo, péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LGQQQFPFPQQPY (SEQ ID NO: 1); QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO: 2); LGQQQFPFPQQPYQPQPF (SEQ ID NO: 3); y LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 4). Las composiciones también pueden incluir un vehículo fisiológicamente aceptable, por ejemplo, un producto alimenticio o un vehículo farmacéutico.

35 Las composiciones son útiles para el tratamiento de cualquier trastorno relacionado con el gluten, que incluye celiacía, que incluye los diversos subtipos, por ejemplo, celiacía clásica, celiacía atípica, celiacía latente y

celiaquía silenciosa, dermatitis herpetiforme, ataxia por gluten y sensibilidad al gluten. Las composiciones se pueden administrar junto con terapias habituales para trastornos relacionados con el gluten, por ejemplo, terapias dietéticas.

Breve descripción de los dibujos

5 Estas y otras características y ventajas de la presente invención serán desveladas más completamente en, o se volverán obvias por, la siguiente descripción detallada de la realización preferida de la invención, que se va a considerar junto con los dibujos adjuntos en los que números similares se refieren a partes similares y además en las que:

La Fig. 1 es un análisis del efecto de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

10 La Fig. 2 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de diferentes concentraciones de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

La Fig. 3 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de diferentes concentraciones de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de 57-68^{liss} en células CaCo2.

15 La Fig. 4 es un análisis del efecto de ADN de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

La Fig. 5a es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2. La Fig. 5b es un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

20 La Fig. 6a es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P57-68^{liss} en células CaCo2. La Fig. 6b es un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P57-68^{liss} en células CaCo2.

25 La Fig. 7a es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del tratamiento térmico del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2. La Fig. 7b es un análisis del efecto del tratamiento térmico del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

La Fig. 8 es un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, de arroz fermentado sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

30 La Fig. 9 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, de arroz fermentado y avena fermentada sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

35 La Fig. 10 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, de arroz fermentado y avena fermentada sobre la entrada de Dextran-Texas Red en células CaCo2.

La Fig. 11 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de EGF conjugado con Alexa Fluor® en células CaCo2.

40 La Fig. 12 es un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de EGF conjugado con Alexa Fluor® en células CaCo2.

45 Las Figs. 13a, 13b, 13c y 13d son un análisis del efecto de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2. La Fig. 13a muestra células de control no tratadas. La Fig. 13b muestra células Caco2 tratadas con 10⁴ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 13c muestra células Caco2 tratadas con 10⁶ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 13d muestra células Caco2 tratadas con 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74.

La Fig. 14 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de diferentes concentraciones de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

50 Las Figs. 15a, 15b, 15c y 15d son un análisis del efecto de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P57-68^{liss} en células CaCo2. La Fig. 15a muestra células de control no tratadas. La Fig. 15b muestra células Caco2 tratadas con 10⁴ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 15c muestra células Caco2 tratadas con 10⁶ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 15d muestra células Caco2 tratadas con 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74.

La Fig. 16 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de diferentes concentraciones de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P57-68^{liss} en células CaCo2.

La Fig. 17 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de 10⁸ ufc/ml de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} y P57-68^{liss} en células CaCo2.

5 Las Figs. 18a, 18b y 18c son un análisis del efecto del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2. La Fig. 18a muestra células de control no tratadas. La Fig. 18b muestra células Caco2 tratadas con 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 18c muestra células Caco2 tratadas con sobrenadante recogido de 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74.

10 La Fig. 19 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de células de *L. paracasei*, cepa CBA L74 y sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

Las Figs. 20a, 20b y 20c son un análisis del efecto de sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P57-68^{liss} en células Caco2. La Fig. 20a muestra células de control no tratadas. La Fig. 20b muestra células Caco2 tratadas con 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 20c muestra células Caco2 tratadas con sobrenadante recogido de 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74.

15 La Fig. 21 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de células de *L. paracasei*, cepa CBA L74 y sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P57-68^{liss} en células Caco2.

20 Las Figs. 22a y 22b son un análisis del efecto de sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de EGF-Alexa 488 en células Caco2. La Fig. 20a muestra células de control no tratadas. La Fig. 20b muestra células Caco2 tratadas con sobrenadante recogido del equivalente de 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74.

La Fig. 23 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de EGF-Alexa 488 en células Caco2.

25 Las Figs. 24a, 24b y 24c son un análisis del efecto de retirada de sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células Caco2. La Fig. 20a muestra células de control no tratadas. La Fig. 20b muestra células Caco2 tratadas con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 20c muestra células Caco2 tratadas con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que se había eliminado.

La Fig. 25 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto de tratamiento y posterior retirada de sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

30 Las Figs. 26a, 26b, 26c y 26d son un análisis del efecto del tratamiento térmico del sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células Caco2. La Fig. 26a muestra células de control no tratadas. La Fig. 26b muestra células Caco2 tratadas con el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 26c muestra células Caco2 tratadas con el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que habían hervido. La Fig. 26d muestra células Caco2 tratadas con el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que se había calentado a 80 °C.

35 La Fig. 27 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del tratamiento térmico del sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células CaCo2.

Descripción detallada de la realización preferida

La presente descripción de realizaciones preferidas se pretende lea a propósito de los dibujos adjuntos, que se deben considerar parte de la descripción escrita completa de la presente invención. Las figuras del dibujo no están necesariamente a escala y ciertas características de la invención se pueden mostrar exageradas en escala o en forma algo esquemática en el interés de la claridad y brevedad. En la descripción, términos relativos tales como "horizontal", "vertical", "arriba", "abajo", "superior" e "inferior", así como sus derivados (por ejemplo, "horizontalmente", "hacia abajo", "hacia arriba", etc.), se deben interpretar para referirse a la orientación como entonces se describe o como se muestra en la figura del dibujo en discusión. Estos términos relativos son por comodidad de descripción y normalmente no pretenden requerir una orientación particular. Los términos que incluyen "hacia adentro" frente a "hacia afuera", "longitudinal" frente a "lateral" y similares se deben interpretar con respecto a entre ellos mismos o con respecto a un eje de alargamiento, o un eje o centro de rotación, según convenga. Los términos referentes a uniones, acoplamiento y similares, tales como "conectado" e "interconectado", se refieren a una relación en la que las estructuras se sujetan o unen entre sí ya sea directa o indirectamente mediante estructuras intermedias, así como tanto uniones como relaciones móviles o rígidas, a menos que se describa expresamente de otro modo. El término "operativamente conectado" es dicha unión, acoplamiento o conexión que permite que las estructuras pertinentes funcionen como era previsto en virtud de esa relación. Cuando solo se ilustra una única máquina, también se debe considerar que el término "máquina" incluye cualquier conjunto de máquinas que ejecutan individual o conjuntamente un conjunto (o múltiples conjuntos) de instrucciones para realizar una cualquiera o más de las metodologías tratadas en el presente documento. En las reivindicaciones, las

cláusulas de medios más función, si se usan, pretenden cubrir las estructuras descritas, sugeridas o que se han vuelto obvias por la descripción escrita o los dibujos para realizar la función citada, que incluye no solo equivalentes estructurales, sino también estructuras equivalentes.

5 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de los inventores de que los cultivos del organismo probiótico *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, pueden reducir la entrada de ciertos componentes de gluten en las células intestinales humanas. Más específicamente, los inventores han encontrado que *L. paracasei* CBA L74 aislado y sobrenadantes de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 redujeron la entrada de péptidos de a-gliadina en células epiteliales intestinales humanas cultivadas. Además, la reducción en la entrada de péptidos también se observó para alimentos que habían fermentado por *L. paracasei* CBA L74. Se observó el efecto sobre la entrada de péptidos incluso cuando los sobrenadantes de cultivo se trataron con calor. Por consiguiente, la invención caracteriza composiciones que pueden mitigar los efectos tóxicos de los péptidos de gliadina.

Las composiciones pueden incluir células de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, o una combinación de células de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, y metabolitos producidos por *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74.

15 Se aisló por los inventores *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, y se depositó en virtud del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patentes el 9 de septiembre de 2008 en el Laboratorium voor Microbiologie (LMG) de las Colecciones coordinadas belgas de microorganismos (BCCM), Gante, Bélgica. El número de acceso dado por la Autoridad de depósito internacional es LMG P-24778. Para facilitar la lectura, los presentes inventores no repetirán la expresión "número de acceso LMG P-24778" en cada ocasión. Se debe entender que donde los presentes inventores se refieren a *L. paracasei*, cepa CBA L74, los presentes inventores se refieren a la cepa depositada que tiene el número de acceso LMG P-24778.

Aunque los presentes inventores creen que entienden ciertos eventos que ocurren tras la administración de las composiciones que comprenden *L. paracasei* CBA L74, las composiciones de la presente invención no se limitan a las que funcionen afectando cualquier mecanismo celular particular. La hipótesis de trabajo de los presentes inventores es que las composiciones que comprenden *L. paracasei* CBA L74, sobrenadante de cultivos o fermentados de *L. paracasei* CBA L74, y metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, pueden proporcionar un aumento de la barrera a la translocación del gluten y los polipéptidos relacionados con el gluten a través de la mucosa intestinal y así moderar los efectos del gluten y los péptidos relacionados con el gluten en individuos que tienen un trastorno relacionado con el gluten, por ejemplo, celiacía o sensibilidad al gluten. Los inventores han encontrado que el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 redujo la captación celular de moléculas que entran en las células mediante diferentes vías endocitósicas, por ejemplo, fagocitosis, macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina (también denominada endocitosis mediada por receptor) y caveolas. Por ejemplo, el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 redujo la entrada celular de tanto dextrano, que se conoce que entra en las células mediante macropinocitosis, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que entra en las células mediante endocitosis mediada por receptor. Los efectos beneficiosos de las composiciones descritas en el presente documento pueden derivar, por ejemplo, de metabolitos producidos durante la fermentación, por ejemplo, ácidos orgánicos tales como ácido láctico, ácido butírico o ácido acético. Alternativamente o además, los fragmentos de la pared celular bacteriana y otros componentes bacterianos subcelulares, tales como proteínas, hidratos de carbono, fragmentos de ácido nucleico y lípidos, pueden ejercer efectos sobre la respuesta celular al gluten y polipéptidos relacionados con el gluten.

40 Por consiguiente, la invención caracteriza composiciones que se pueden usar para proteger las células de los efectos posiblemente tóxicos del gluten y péptidos relacionados con el gluten. Las composiciones pueden incluir medios en los que *L. paracasei* CBA L74 ha sido cultivado o productos alimenticios, por ejemplo, productos lácteos o productos de cereal, que se han fermentado por *L. paracasei* CBA L74.

45 En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir *L. paracasei* CBA L74 aislada y un vehículo fisiológico. El vehículo puede ser un producto alimenticio, pero la invención no se limita a éstos y en algunas realizaciones el vehículo puede ser un vehículo farmacológico.

Composiciones

L. paracasei CBA L74

50 Las composiciones de la invención incluyen el organismo probiótico, *L. paracasei* CBA L74. La Organización Mundial de la Salud ha definido los probióticos como: "Microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud sobre el hospedador". En algunas realizaciones, *L. paracasei* CBA L74 se puede someter a tratamientos que lo convierten en no replicantes, por ejemplo, exposición a calor, irradiación y o irradiación UV. Un *L. paracasei* CBA L74 no replicante puede ser una célula muerta o una célula viva que se ha vuelto incapaz de realizar la división celular. Un *L. paracasei* CBA L74 no replicante puede ser una célula intacta o una célula que ha experimentado lisis parcial o completa. En algunas realizaciones, las células no replicantes pueden incluir una mezcla de células intactas y lisadas.

En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir fermentados de *L. paracasei* CBA L74.

Las composiciones incluyen uno o más metabolitos de *L. paracasei* CBA L74, es decir, cualquier sustancia producida por *L. paracasei* CBA L74. El metabolito puede ser codificado por uno o más genes o se puede generar por la actividad enzimática de uno o más productos génicos. Los metabolitos incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas, por ejemplo, aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, así como estructuras poliméricas mayores tales como polipéptidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, proteoglicanos y lípidos. El metabolito puede ser un metabolito primario, por ejemplo, un metabolito directamente implicado en la función normal de células, o un metabolito secundario, por ejemplo, un metabolito normalmente no requerido para las funciones celulares fundamentales. Un metabolito también puede incluir cualquier producto intermedio metabólico generado durante la síntesis de un metabolito primario o secundario. Los productos intermedios pueden incluir, pero no se limitan a, productos intermedios de la vía de Embden-Meyerhof, la vía de pentosa-fosfato (pentosa-P), la vía de Entner-Doudoroff, el ciclo del citrato y la biosíntesis de aminoácidos.

Los metabolitos primarios a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, alcoholes, por ejemplo, etanol, metanol, butanol; aminoácidos, por ejemplo, lisina, arginina, ornitina, histidina, citrulina, isoleucina, alanina, valina, leucina, glicina, treonina, serina, prolina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, cistina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina y asparagina; nucleótidos, por ejemplo, ácido 5'-guanílico; antioxidantes, por ejemplo, ácido isoascórbico; ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico; vitaminas, por ejemplo, vitamina B12; azúcares, ácidos grasos, por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta; poliaminas; péptidos, por ejemplo, bacteriocinas tales como un antibiótico por ejemplo nisina, o un no antibiótico, por ejemplo, enterocina, plantaricina W, plantaricina S.

Un metabolito también puede ser un metabolito secundario. Los metabolitos secundarios normalmente son los que no son requeridos para las funciones celulares fundamentales. Los metabolitos secundarios pueden variar ampliamente; metabolitos secundarios a modo de ejemplo incluyen antibióticos, hormonas, flavonoides, terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides, derivados de fenilo, derivados de hexanol, cumarinas, estilbenos, cianohidrininas, glucosinolatos, esteroides y saponinas.

Los lactobacilos normalmente producen los siguientes metabolitos durante la fermentación de productos lácteos: ácido láctico/lactato, acetato, etanol, formiato, acetaldehído, α -acetolactato, acetoina, diacetilo y 2,3-butilenglicol (butanodiol) durante la fermentación de productos lácteos. La fermentación puede ser cualquier proceso en el que un microbio causa o contribuye a una rotura de una sustancia orgánica compleja en sustancias más simples.

El metabolito de *L. paracasei* CBA L74 puede estar contenido dentro de medios, fermentados o sobrenadantes de cultivo. En algunas realizaciones, el metabolito puede ser parcialmente o sustancialmente aislado de los medios, fermentados o sobrenadantes de cultivo. Así, el metabolito funcional, es decir, un metabolito que reduce la entrada de células de un péptido de gliadina, puede incluir o excluir cualquiera de los metabolitos descritos anteriormente. Los métodos de aislamiento de metabolitos variarán según la estructura y química del metabolito particular. Un metabolito parcialmente o sustancialmente aislado retendrá la actividad funcional, es decir, la capacidad para reducir la entrada de células de los péptidos de gliadina, de medios, fermentados o sobrenadantes de cultivo. Así, si un sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 puede reducir la entrada de péptidos de gliadina en células, se espera que un metabolito parcial o sustancialmente aislado de sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 también reduzca la entrada de péptidos de gliadina en las células. Se pueden usar métodos estándares conocidos en la técnica para el aislamiento y la caracterización de metabolitos de *L. paracasei* CBA L74. Los métodos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, análisis de estabilidad, por ejemplo, estabilidad al calor, pH y/o actividad enzimática; análisis cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases, cromatografía en capa fina, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa; espectrometría de masas. En algunas realizaciones, el metabolito es estable al calor, es decir, retiene su actividad funcional, es decir, la capacidad para prevenir la entrada de células de péptidos de gliadina, después de la exposición a temperaturas fuera del intervalo fisiológico normal, por ejemplo, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C o 100 °C.

Gluten y polipéptidos relacionados con el gluten

Independientemente de la forma particular, las composiciones descritas en el presente documento reducen la captación celular del gluten y los polipéptidos relacionados con el gluten. El gluten y los polipéptidos relacionados con el gluten son las principales proteínas de almacenamiento de los granos dietéticos de cereal. El gluten se encuentra en el trigo. Las proteínas estrechamente relacionadas, las hordeínas y las secalinas, se encuentran en la cebada y el centeno, respectivamente. Se han descrito varios cientos de genes que codifican el gluten y las proteínas relacionadas con el gluten. Además de sus propiedades nutricionales, el gluten desempeña una función clave en la determinación de la calidad única del horneado del trigo, confiriendo la capacidad de absorción de agua, cohesividad, viscosidad y elasticidad a la masa. El gluten en realidad es un complejo de dos fracciones de polipéptido que se han clasificado basándose en su solubilidad en alcoholes acuosos: las gliadinas solubles y las gluteninas insolubles. Ambas fracciones consisten en numerosos componentes de proteína relacionados caracterizados por un alto contenido de glutamina y prolina.

Las gliadinas son proteínas monoméricas con pesos moleculares (PM) alrededor de 28.000-55.000 y puntos isoeléctricos de aproximadamente pH 3,0-4,0. Existen cuatro clases de polipéptidos de gliadina: α -gliadina, β -

gliadina, γ -gliadina y ω -gliadina. Las secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo para la α -gliadina se pueden encontrar en GenBank en GI:7209265 (*Triticum aestivum* 290 aminoácidos, SEQ ID NO: 7); GI:7209263 (*Triticum aestivum* 269 aminoácidos, SEQ ID NO: 8); GI:376341626 (*Triticum aestivum* 210 aminoácidos, SEQ ID NO: 9); GI:282721198 *Triticum durum*, 313 aminoácidos, SEQ ID NO: 10).

5 La glutenina es una proteína multimérica grande que varía en PM desde aproximadamente 100,00 hasta más de 10.000.000 con un PM promedio de aproximadamente 3.000.000. Los puntos isoeléctricos para la glutenina varían aproximadamente 6,5-7,0. Después de la reducción de los enlaces disulfuro, las subunidades de glutenina resultantes muestran una solubilidad en alcoholes acuosos similar a las gliadinas. Basándose en la estructura primaria, las subunidades de glutenina se han dividido en las subunidades de alto peso molecular (APM) (PM=67.000-88.000) y las subunidades de bajo peso molecular (BPM) (PM=32.000-35.000). Las gliadinas, gluteninas, hordeínas y secalinas tienen un alto contenido de prolina y glutamina. El alto contenido de prolina convierte estas proteínas en resistentes a la digestión proteolítica completa por enzimas gástricas, pancreáticas y del borde en cepillo en el intestino humano, puesto que dichas enzimas son deficientes en actividad de proliendopeptidasa. Esto puede dar como resultado la acumulación de fragmentos relativamente grandes de péptido (tan grandes como 50 aminoácidos de longitud) con un alto contenido de prolina y glutamina en el intestino delgado.

Las secuencias de aminoácidos específicas para la gliadina pueden variar, pero todas contienen epítomos de linfocitos T que desencadenan las respuestas inmunitarias implicadas en la patogénesis de la celiaquía. Son estas respuestas de linfocitos T específicas del gluten en el intestino delgado las que desempeñan una función importante en producir la respuesta inflamatoria que en último lugar da como resultado la atrofia distintiva de vellosidades intestinales e hiperplasia de las criptas. Los péptidos de gluten nativos específicos pueden unirse a HLA-DQ2/8, los tipos de HLA más fuertemente asociados a la celiaquía. Esta unión de HLA induce respuestas de linfocitos T CD4 de la lámina propia, que a su vez dañan la mucosa del intestino delgado. El daño tisular inicia la secreción de la transglutaminasa tisular (tTG) de enzimas de curación de heridas. Sin embargo, la tTG también desamida los péptidos de gluten. La desamidación convierte los restos de glutamina neutros en restos de ácido glutámico negativamente cargados. Estos péptidos desamidados tienen afinidad de unión significativamente elevada por HLA-DQ2/8 con respecto a los péptidos que no se han desamidado. Este proceso conduce a una presentación antigénica potenciada de gliadina. La unión de péptidos desamidados activa además los linfocitos T colaboradores 1 CD4+ (Th1) específicos del gluten en la lámina propia, que a su vez aumenta la linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas, producción de citocinas que conducen a atrofia de las vellosidades y expansión de linfocitos B que producen anticuerpos contra gliadina y tTG.

Se han identificado múltiples motivos de epítomos de linfocitos T en α - y γ -gliadinas, así como en gluteninas. La mayoría de estos mostraron reconocimiento de linfocitos T potenciado después de la desamidación. Además, los pacientes con celiaquía generalmente son sensibles a más de un péptido del gluten. Aunque la interacción DQ2/8 representa la asociación más significativa con la celiaquía hasta la fecha definida, los péptidos del gluten no inmunogénicos también pueden tener un impacto sobre el sistema inmunitario innato.

Los péptidos de gliadina P31-43 y P31-49 generalmente no son reconocidos por linfocitos T. Estos péptidos inducen una respuesta inmunitaria innata en la mucosa celíaca. El péptido P31-43 retrasa la maduración de vesículas endocíticas y, por consiguiente, reduce la degradación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y prolonga la activación de EGFR. Se ha mostrado que la activación de EGFR prolongada induce la elevada proliferación celular y modificaciones de actina en tanto enterocitos de las criptas celíacas como en líneas de células cultivadas. Tras la entrada en los enterocitos intestinales o la línea celular intestinal humana, CaCo2, P31-43 interacciona con vesículas endocíticas tempranas, reduce su motilidad y retrasa su maduración en endosomas tardíos.

Los diferentes péptidos del gluten participan en el proceso de la celiaquía. Existen dos grupos de péptidos biológicamente activos que derivan de α -gliadina. El grupo de péptidos que contiene serina parece ser esencialmente citotóxico, mientras que el grupo que contiene tirosina tiene la capacidad de desencadenar reacciones inmunológicas en pacientes con celiaquía. La actividad de los péptidos que contienen serina se asocia a la presencia de motivos PSQQ y QQQP. Los péptidos que contienen tirosina, por ejemplo, QQPY y/o QPYP, están asociados con la actividad inmunológica.

Los péptidos de gliadina pueden variar ampliamente en secuencia. Un polipéptido que tiene una secuencia que es idéntica a una porción de una secuencia de gliadina y que funciona (por ejemplo, para uno o más de los fines descritos en el presente documento) es un péptido de gliadina. Una gliadina de longitud completa incluye una secuencia de péptidos de gliadina y uno o más de los péptidos descritos en el presente documento pueden encontrarse parcial o completamente dentro de la secuencia de gliadina. Un péptido que tiene una secuencia que se diferencia hasta un cierto grado limitado de una secuencia que se encuentra en una gliadina que existe de forma natural y que retiene la capacidad de funcionar (por ejemplo, retiene actividad suficiente para conferir toxicidad al péptido de gliadina) es una variante biológicamente activa de un péptido de gliadina. Los presentes inventores tienden a usar los términos "gliadina" para referirse a proteínas de gliadina de longitud completa que existen de forma natural, y los presentes inventores tienden a usar los términos "polipéptido" y "péptido" cuando se refieren a sus fragmentos (es decir, a fragmentos de gliadina) y sus variantes biológicamente activas. Debido a que los

polipéptidos o péptidos pueden tener una secuencia que es idéntica a una secuencia encontrada en gliadina, los polipéptidos o péptidos derivan de fragmentos de gliadina.

Aunque las secuencias de los presentes polipéptidos pueden variar, polipéptidos útiles pueden incluir fragmentos de SEQ ID NO: 7-10. Los polipéptidos pueden incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos de una gliadina que se expresa naturalmente en una célula de planta. Una variante biológicamente activa puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que se diferencia de un fragmento no mutante de una gliadina en virtud de que contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas realizaciones, al menos el 50 % de los restos de aminoácidos de la variante son idénticos a restos en el fragmento no mutante correspondiente de una gliadina. Las variantes biológicamente activas también pueden incluir secuencias de aminoácidos que se diferencian de un fragmento no mutante de una gliadina en virtud de sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos no conservativas.

Los presentes inventores se refieren a ciertas secuencias de aminoácidos como "polipéptidos" para expresar que son polímeros lineales de restos de aminoácidos, y para ayudar a distinguirlos de proteínas de longitud completa. Se entenderá que los polipéptidos pueden, por tanto, incluir solo un fragmento de una gliadina (o una variante biológicamente activa de la misma), pero también pueden incluir restos adicionales. Los polipéptidos de la invención pueden variar en longitud. Por ejemplo, los polipéptidos pueden tener 8-40 (por ejemplo, 12, 14, 16, 18 o 20) aminoácidos de longitud o más (por ejemplo, hasta aproximadamente 40 restos).

Los polipéptidos que son variantes biológicamente activas de una gliadina se pueden caracterizar en términos del grado al que su secuencia es similar o idéntica al fragmento correspondiente de la gliadina. Por ejemplo, la secuencia de una variante biológicamente activa puede ser al menos o aproximadamente 60 % idéntica a restos correspondientes en una gliadina no mutante. Por ejemplo, una variante biológicamente activa de un polipéptido de gliadina pueden tener una secuencia de aminoácidos con al menos o aproximadamente 60 % de identidad de secuencia (por ejemplo, al menos o aproximadamente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia) con una gliadina (por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7-10 o con otro polipéptido como se describe en el presente documento (por ejemplo, un polipéptido representado por, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-6) o con un homólogo u ortólogo del mismo).

Una variante biológicamente activa de un polipéptido de gliadina retendrá suficiente actividad biológica para conferir toxicidad en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten. La actividad biológica se puede evaluar en formas conocidas para un experto habitual en la materia e incluyen, sin limitación, ensayos de captación celular, ensayos de expresión génica, o modelos animales *in vivo*. Se pueden identificar variantes biológicamente activas, por ejemplo, comparando las actividades relativas del polipéptido de variante con las de un fragmento activo de un péptido de gliadina. Los ensayos pueden incluir un polipéptido de control no relacionado (por ejemplo, podría incluirse en cualquier ensayo dado un péptido que tiene el mismo contenido de aminoácidos dispuesto al azar, así como un control de solo vehículo). Algunas variantes biológicamente activas pueden incluso tener mayor actividad biológica que el fragmento relacionado que existe de forma natural o una gliadina de longitud completa. Más específicamente, una variante biológicamente activa puede tener al menos o aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, o más de la actividad biológica del polipéptido de forma nativa.

Los péptidos de a-gliadina a modo de ejemplo que desempeñan una función en celiaquía incluyen P31-43, LGQQQFPPQPY, (SEQ ID NO.: 1); P31-49 LGQQQFPPQYPQPQPF (SEQ ID NO: 3); P44-55; PQQPFPSQLP (SEQ ID NO.: 5); P57-68 QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO.: 2); P56-88, LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF (SEQ ID NO: 4) y P63-76 QPQLPYPQPQLPYP (SEQ ID NO.: 6).

Productos alimenticios

Las composiciones de la invención pueden incluir un vehículo fisiológicamente aceptable. El vehículo fisiológico puede ser un producto alimenticio o un vehículo farmacéutico. Los presentes inventores usan los términos "fisiológicamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") para referirse a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra no deseada cuando se administran a un animal o un ser humano, según convenga. Así, las composiciones de la invención incluyen productos alimenticios fermentados por el organismo probiótico, *L. paracasei* CBA L74. El producto alimenticio incluye células de *L. paracasei* CBA L74, ya sean vivas o no replicantes. Se puede usar cualquier producto alimenticio susceptible a la fermentación por *L. paracasei* CBA L74. El producto alimenticio puede ser un producto lácteo, por ejemplo, leche o un producto basado en leche. Las fuentes lácteas a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, ganado vacuno, ovejas, cabras, yaks, búfalo de agua, caballos, burros, renos y camellos. Independientemente de la fuente, la leche o productos lácteos pueden ser de cualquier forma adecuados para la fermentación por *L. paracasei* CBA L74. Por ejemplo, la leche puede ser leche entera o leche que se ha procesado para retirar algo o toda la materia grasa, por ejemplo, 2 % de leche, 1 % lácteo leche desnatada. Alternativamente o además, la leche puede ser previamente pasteurizada y/u homogeneizada, secada y reconstituida, condensada o evaporada. También se pueden usar fracciones de productos lácteos que incluyen caseína, proteína del suero de la leche o lactosa. En algunas realizaciones, el producto lácteo puede ser desde aproximadamente 1 % hasta aproximadamente 30 % lácteo en polvo desnatada reconstituida, por ejemplo aproximadamente 2 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 15 %,

aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 % lácteo en polvo desnatada reconstituida. Antes de la fermentación, el producto lácteo se puede combinar con uno o más de los siguientes: a) un hidrato de carbono (por ejemplo, un disacárido tal como dextrosa o un almidón; b) un lípido; c) una vitamina y d) un mineral. Por ejemplo, la leche en polvo desnatada se puede combinar con dextrosa a aproximadamente 2 %, por ejemplo, aproximadamente 0,25 %, aproximadamente 0,50 %, aproximadamente 0,75 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,5 % o aproximadamente 2,0 %.

El producto alimenticio puede ser un producto de cereal, por ejemplo, arroz, avena, trigo, sorgo o mijo. En algunas realizaciones, el producto de cereal puede ser trigo, cebada, centeno o triticale. El producto de cereal puede ser un grano entero o molido en una harina. El producto alimenticio puede ser un único tipo de cereal o una mezcla de dos o más tipos de cereales, por ejemplo, harina de avena más harina de arroz. Los productos de cereal pueden ser de una calidad y tipo adecuados para consumo humano o pueden ser productos adecuados para consumo por animales domésticos. Generalmente, el producto de cereal se hidrata antes de la fermentación. La concentración de cereal puede variar, pero intervalos útiles incluyen desde aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 50 % p/v, por ejemplo, aproximadamente 8 % p/v, aproximadamente 10 % p/v, aproximadamente 12 % p/v, aproximadamente 15 % p/v, aproximadamente 18 % p/v, aproximadamente 20 % p/v, aproximadamente 22 % p/v, aproximadamente 25 % p/v, aproximadamente 30 % p/v, aproximadamente 35 % p/v, aproximadamente 40 % p/v, aproximadamente 45 % p/v o aproximadamente 50 % p/v. Las concentraciones a modo de ejemplo incluyen 15 % p/v de arroz o una mezcla de 18,5 % p/v de harina de avena más 5 % p/v de harina de cebada malteada. El pH de los cereales hidratados se puede ajustar usando cualquier ácido adecuado para consumo. El ácido puede ser, por ejemplo, un ácido orgánico. Los ácidos orgánicos útiles incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido adipico, ácido málico y ácido tartárico. Se puede usar cualquier combinación de dos o más ácidos. En algunas realizaciones, el pH se puede ajustar a aproximadamente 4,0 usando ácido cítrico.

El producto alimenticio también puede ser un producto de verdura o fruta, por ejemplo, un zumo, un puré, un concentrado, una pasta, una salsa, un encurtido o un ketchup. Las verduras y frutas a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, calabazas alargadas, por ejemplo, calabacín, calabaza amarilla, calabaza de invierno, calabaza; patatas, espárrago, brócoli, coles de Bruselas, judías, por ejemplo, judías verdes, judías de cera, judías de lima, habas, soja, coles, zanahorias, coliflor, pepinos, colirrábano, puerros, cebolletas, cebollas, guisantes dulces, guisantes ingleses, pimientos, nabos, nabicoles, tomates, manzanas, peras, melocotones, ciruelas, fresas, frambuesas, moras, arándanos azules, arándanos rojos, bayas de Boysen, grosellas espinosas, uvas, pasas de Corinto, naranjas, limones, pomelo, bananas, mangos, kiwi y carambola.

El producto alimenticio también puede ser una "leche" hecha de frutos secos o legumbres, por ejemplo, leche de soja o leche de almendras.

También se contemplan productos alimenticios que comprenden proteínas animales, por ejemplo, carne, por ejemplo, salchichas, carnes secadas, pescado y productos de pescado seco.

Independientemente del tipo de producto alimenticio 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 usar cualquier método estándar de fermentación conocido en la técnica. Las condiciones de fermentación específicas variarán según muchos factores que incluyen, por ejemplo, el tipo de producto alimenticio, la concentración del producto alimenticio, la instrumentación que se usa, el volumen de muestra, la concentración inicial del inóculo de *L. paracasei* CBA L74, la presencia, si la hay, de un co-inóculo, las propiedades organolépticas del alimento fermentado, y el uso previsto del alimento fermentado.

Tanto la instrumentación como el sustrato (es decir, el producto alimenticio a fermentar) se esterilizan antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74 con el fin de reducir el nivel de, o eliminar, bacteria y/u hongos y/o virus infecciosos viables. La instrumentación se puede esterilizar usando métodos convencionales 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 por vapor de agua y presión, por ejemplo por esterilización en autoclave, ciclos repetidos de exposición a calentamiento y enfriamiento (por ejemplo, tindalización) a altas presiones (por ejemplo, pascalización), ultrafiltración, o radiación (por ejemplo, exposición a haces gamma, x, haz de electrones y/o ultravioleta (longitud de onda de 10 nm a 320 nm, por ejemplo, 50 nm a 320 nm, 100 nm a 320 nm, 150 nm a 320 nm, 180 nm a 320 nm, o 200 nm a 300 nm). Las alícuotas del sustrato se pueden retirar tras el tratamiento y la siembra en medios adecuados para confirmar la ausencia de contaminantes bacterianos y/o fúngicos. Si el sustrato se ha esterilizado por exposición a altas temperaturas, se debe enfriar hasta al menos 37 °C antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74.

El sustrato se puede inocular con *L. paracasei* CBA L74 según métodos convencionales, por ejemplo, de cultivo líquido fresco o un cultivo liofilizado que se ha resuspendido en medio acuoso durante un corto tiempo antes de la inoculación. En general, se añade *L. paracasei* CBA L74 a concentraciones de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a aproximadamente 1×10^6 ufc/ml de sustrato, por ejemplo, aproximadamente 1×10^6 ufc/ml, aproximadamente 2×10^6 ufc/ml, aproximadamente 5×10^6 ufc/ml, 7×10^6 ufc/ml, 8×10^6 ufc/ml. El cultivo debe ser agitado suficientemente para producir una distribución relativamente uniforme de bacterias y sustrato, pero no excesivamente puesto que *L. paracasei* CBA L74 es una bacteria anaeróbica. Por ejemplo, se puede agitar un

cultivo de cinco litros a aproximadamente 150 rpm. La temperatura de fermentación generalmente es a 37 °C. Se pueden monitorizar diversos parámetros, por ejemplo, el pH, la presión parcial de O₂, velocidad del agitador, temperatura, mezcla de gases, nivel de espumas y concentración de sustrato durante la fermentación y ajustar en consecuencia. Se puede monitorizar el crecimiento de *L. paracasei* CBA L74 usando métodos estándares microbiológicos. La fermentación se lleva a cabo hasta que la concentración de *L. paracasei* CBA L74 esté aproximadamente entre aproximadamente 10⁸/ml y aproximadamente 10⁹/ml. Dependiendo del sustrato y 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 antes, durante y después de la fermentación para garantizar la calidad usando métodos estándares microbiológicos. Los métodos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, crecimiento sobre agar de Rogosa para *L. paracasei* CBA L74, crecimiento sobre agar para recuento en placa (PCA) para aerobios totales, crecimiento sobre agar de McConkay para coliformes, crecimiento sobre agar de clostridio reforzado (RCM) para Clostridia. Además de los recuentos de colonias, se pueden observar las morfologías de colonias y comparar con muestras de referencia.

En algunas realizaciones, se puede añadir un co-inóculo junto con *L. paracasei* CBA L74 con el fin de ayudar a iniciar la fermentación. Los 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 más baja de *L. paracasei* CBA L74, por ejemplo, aproximadamente 1 x 10⁴/ml x 10⁵/ml. La concentración final de *S. thermophilus* puede variar de aproximadamente 0,5 x 10⁸/ml a aproximadamente 2,5 x 10⁸/ml.

Una vez se han alcanzado 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, desde aproximadamente 3,0 hasta cerca de neutralidad, por ejemplo, 6,5, con la adición de NaOH o KOH. En algunas realizaciones, el alimento fermentado se puede secar. El producto alimenticio fermentado se puede secar por cualquier método conocido en la técnica que dará como resultado la retención de propiedades inmunomoduladoras del alimento fermentado. Los métodos de secado a modo de ejemplo incluyen secado por pulverización, secado por congelación, por ejemplo, liofilización, o secado en tambor. El contenido final de agua del producto alimenticio fermentado puede variar, pero puede estar entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 10 % o más. En algunas realizaciones, el proceso de secado puede convertir *L. paracasei* CBA L74 en no replicante.

Los alimentos fermentados secados se pueden hidratar antes de usarse. Dependiendo de la cantidad de líquido usada en la hidratación, los productos alimenticios fermentados pueden contener el equivalente de aproximadamente 10², aproximadamente 10³, aproximadamente 10⁴, aproximadamente 10⁵, aproximadamente 10⁶, aproximadamente 10⁷, aproximadamente 10⁸, aproximadamente 10⁹, aproximadamente 10¹⁰, aproximadamente 10¹¹ y aproximadamente 10¹² ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. *L. paracasei* CBA L74 secado no forma colonias, de manera que se entiende que esta cantidad se calcula basándose en el número de bacterias vivas que estaban presentes en los alimentos fermentados antes de la etapa de secado. En algunas realizaciones, los productos alimenticios fermentados pueden incluir el equivalente de aproximadamente 10⁷ a aproximadamente 10¹² ufc/g, por ejemplo, aproximadamente 5 x 10⁷ ufc/g, aproximadamente 1 x 10⁸ ufc/g, aproximadamente 5 x 10⁸ ufc/g, aproximadamente 1 x 10⁹ ufc/g, aproximadamente 5 x 10⁹ ufc/g, aproximadamente 1 x 10¹⁰ ufc/g, aproximadamente 5 x 10¹⁰ ufc/g, aproximadamente 1 x 10¹¹ ufc/g, aproximadamente 5 x 10¹¹ ufc/g de peso seco.

Se pueden combinar dos o más productos alimenticios fermentados preparados por los métodos de la invención antes de la administración. Por ejemplo, se pueden combinar productos lácteos fermentados con productos de cereal fermentados. Alternativamente, el producto alimenticio fermentado se puede combinar con otros productos alimenticios, por ejemplo, productos alimenticios no fermentados o productos alimenticios fermentados usando otras cepas bacterianas. Se puede usar cualquier combinación, a condición de que se retengan los efectos sobre los péptidos de gliadina del alimento fermentado. Los productos alimenticios a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, productos lácteos, por ejemplo, leche, yogurt, cuajo, queso y productos basados en queso, leches fermentadas, productos fermentados basado en leche, polvos basados en leche, leches de inicio, alimentos para lactantes colados basados en leche, helado, gelato, budines, sopas, salsas, purés o aderezos, fórmulas nutricionales para los ancianos; productos de cereal, por ejemplo, papilla, alimentos para lactantes colados basados en cereales, harina de avena, sémola, semolina, polenta, pasta, galletas, galletas saladas, barras energéticas; productos vegetales, por ejemplo, purés, alimentos para lactantes colados basados en verduras, verduras encurtidas que incluyen pepinos, col, zanahorias, judías, pimientos o salsas de pepinillos; productos de frutas, por ejemplo, alimentos para lactantes colados basados en frutas, productos de tomate, purés, salsas, pastas, ketchup, purés de frutas; o un producto basado en proteína, por ejemplo, legumbres, salchichas, fiambres, perritos calientes o carnes en puré. En algunas realizaciones, el alimento fermentado se puede combinar con alimentos para mascotas o piensos para animales.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, incluye todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, antibacterianos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, tampones, excipientes, aglutinantes, lubricantes, geles, tensioactivos y similares, que se pueden usar como medios para una sustancia farmacéuticamente aceptable.

Así, la invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, *L. paracasei* CBA L74, en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, *L. paracasei* CBA L74 se puede esterilizar usando técnicas de esterilización convencionales antes o después de combinarse con el vehículo farmacéuticamente aceptable. En la preparación de las composiciones de la invención, *L. paracasei* CBA L74 normalmente se mezcla con un excipiente, se diluye con un excipiente o se encierra dentro de dicho vehículo en forma de, por ejemplo, una cápsula, comprimido, sobre, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve de diluyente, puede ser un sólido, semisólido o material líquido (por ejemplo, solución salina normal), que actúa de vehículo, excipiente o medio para el principio activo. Así, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, sellos, 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 vía de administración prevista. Las composiciones resultantes pueden incluir agentes adicionales, tales como conservantes. El excipiente o vehículo se selecciona basándose en el modo y la vía de administración. Los vehículos farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para su 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 de los Estados Unidos y el Formulario Nacional). Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir además: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos; edulcorantes; y aromatizantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera que se proporcione liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables para su uso según la presente invención, que incluyen aquellas en las que *L. paracasei* CBA L74 se atrapa en un coloide para administración oral, se pueden preparar según técnicas convencionales. *L. paracasei* CBA L74 se puede secar y compactar por trituración o pulverización e insertar en una cápsula para administración por vía oral. En algunas realizaciones, *L. paracasei* CBA L74 se puede combinar con uno o más excipientes, por ejemplo, un disgregante, una carga, un deslizante, o un conservante. Las cápsulas adecuadas incluyen tanto cápsulas de cubierta dura como cápsulas de cubierta blanda. Se puede usar cualquier coloide basado en lípidos o basado en polímeros para formar la cápsula. Los polímeros a modo de ejemplo útiles para las preparaciones de coloides incluyen gelatina, polisacáridos vegetales o sus derivados tales como carrageninas y formas modificadas de almidón y celulosa, por ejemplo, hipromelosa. Opcionalmente, se pueden añadir otros componentes a la disolución gelificante, por ejemplo plastificantes tales como glicerina y/o sorbitol para reducir la dureza de la cápsula, agentes colorantes, conservantes, disgregantes, lubricantes y tratamiento superficial. En algunas realizaciones, la cápsula no incluye gelatina. En otras realizaciones, la cápsula no incluye polisacáridos vegetales o sus derivados.

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

Las composiciones se pueden formular en una forma farmacéutica unitaria, conteniendo cada dosificación, por ejemplo, desde aproximadamente 0,005 mg hasta aproximadamente 2000 mg de *L. paracasei* CBA L74, por dosis diaria. En algunas realizaciones, las composiciones pueden contener el equivalente de aproximadamente 10^2 , aproximadamente 10^3 , aproximadamente 10^4 , aproximadamente 10^5 , aproximadamente 10^6 , aproximadamente 10^7 ,

aproximadamente 10^8 , aproximadamente 10^9 , aproximadamente 10^{10} , aproximadamente 10^{11} y aproximadamente 10^{12} ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. El término "formas farmacéuticas unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado. Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio 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 principio activo normalmente se dispersa uniformemente a través de la composición de manera que la composición puede ser fácilmente subdividida en formas farmacéuticas unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide entonces en formas farmacéuticas unitarias del tipo descrito anteriormente que contienen desde, por ejemplo, 0,005 mg hasta aproximadamente 1000 mg de *L. paracasei* CBA L74.

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

En algunas realizaciones, los comprimidos o píldoras de la presente invención se pueden recubrir o combinar de otro modo para proporcionar una forma farmacéutica que proporciona la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y uno de dosificación externa, estando el último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes se pueden separar por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en la liberación. Se puede usar una variedad de materiales para dichas capas entéricas o recubrimientos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como Shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que las composiciones de la presente invención se pueden incorporar para administración por vía oral o por inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas o de aceite, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

La proporción o concentración de las composiciones de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores que incluyen dosificación, características químicas (por ejemplo, hidrofobia) y la vía de administración. Por ejemplo, se puede proporcionar *L. paracasei* CBA L74 para su uso según la invención en una cápsula que contiene desde aproximadamente 0,005 mg gramos hasta aproximadamente 1000 mg para administración por vía oral.

Métodos de uso

Trastornos relacionados con el gluten

Las composiciones desveladas en el presente documento son generalmente y diversamente útiles en el tratamiento de trastornos relacionados con el gluten. Los sujetos para los que dicho tratamiento es beneficioso incluyen los que experimentan o que están en riesgo de efectos tóxicos tras la ingestión de gluten y polipéptidos relacionados con el gluten. Dichos efectos tóxicos pueden englobar un amplio espectro de síntomas que incluyen, pero no se limitan a, inflamación, reacciones autoinmunitarias, síntomas gastrointestinales tales como diarrea, esteatorrea, distensión abdominal, pérdida de peso, anemia, osteoporosis, artritis, infertilidad, neuropatía periférica, insuficiencia hepática y depresión. La toxicidad al péptido de gliadina puede proceder de mecanismos citotóxicos o inmunológicos o una combinación de mecanismos citotóxicos e inmunológicos. Un síntoma de la toxicidad al péptido de gliadina puede incluir inflamación, reacciones autoinmunitarias, síntomas gastrointestinales tales como diarrea, esteatorrea, distensión abdominal, pérdida de peso, anemia, osteoporosis, artritis, infertilidad, neuropatía periférica, insuficiencia hepática y depresión. Los trastornos relacionados con el gluten incluyen celiaquía, que incluye los diversos subtipos,

por ejemplo, celiaquía clásica, celiaquía atípica, celiaquía latente y celiaquía silenciosa, dermatitis herpetiforme, ataxia por gluten y sensibilidad al gluten.

Los subtipos de celiaquía incluyen celiaquía clásica, celiaquía atípica, celiaquía latente y celiaquía silenciosa. Los síntomas clásicos asociados a la celiaquía son diarrea, distensión abdominal y retraso del crecimiento. Estos síntomas se observan más comúnmente en niños entre 6 y 24 meses de edad. La celiaquía atípica se caracteriza por síntomas gastrointestinales más suaves. Está asociada con manifestaciones extraintestinales, tales como anemia por deficiencia de hierro, osteoporosis, talla baja, artritis, infertilidad, neuropatía periférica, hipertransaminasemia y, en algunos casos, insuficiencia hepática en el momento del diagnóstico. La celiaquía latente se aplica a pacientes que llevan HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8, con o sin serología positiva, y que todavía no han desarrollado atrofia de las vellosidades, pero pueden tener inflamación suave o activación inmunitaria. Los pacientes en este subconjunto pueden ser asintomáticos o pueden tener manifestaciones extraintestinales. La celiaquía silenciosa se caracteriza por serología positiva y atrofia de las vellosidades en un paciente por lo demás asintomático. Después de realizar una dieta sin gluten, algunos pacientes asintomáticos observarán una mejora en los diferentes aspectos físicos y psicológicos de su vida, tales como apetito mejorado, fatiga reducida, o menos anomalías del comportamiento. Independientemente del subtipo, muchos casos de celiaquía pasan sin diagnosticar, que expone a los pacientes al riesgo de complicaciones a largo plazo, por ejemplo, infertilidad y tumores malignos, por ejemplo, linfoma y carcinoma intestinal.

La presentación de la celiaquía puede variar ampliamente. La celiaquía normalmente se presenta en niños como una enfermedad de retraso del crecimiento asociado con los síntomas clásicos de malabsorción: predominantemente pérdida de peso, esteatorrea y múltiples deficiencias, aunque pueden estar presentes otros síntomas extraintestinales, por ejemplo, retraso del desarrollo de la altura axial y menarquía retrasada en las chicas.

La prevalencia de la celiaquía es elevada en condiciones en riesgo, tales como antecedentes familiares de celiaquía, enfermedades autoinmunitarias, deficiencia de IgA, algunos síndromes genéticos (síndrome de Down, síndrome de Turner y síndromes de William) y especialmente diabetes de tipo 1 y tiroiditis.

La predisposición genética desempeña una función significativa en la celiaquía. La celiaquía está fuertemente asociada a los genes de clase II del antígeno leucocitario humano (HLA) específico, HLA-DQ2 y HLA-DQ8, localizados en el cromosoma 6p21. La mayoría de los pacientes celíacos (aproximadamente 95 %) expresan genes que codifican la proteína de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) HLA-DQ2. Los pacientes restantes son normalmente HLA-DQ8 positivos. El haplotipo de HLA-DQ2 es común y es llevado por aproximadamente 30 % de los individuos caucásicos, que implica que la presencia de HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 es necesaria para el desarrollo de enfermedad, pero no suficiente por sí mismo, ya que su efecto de riesgo estimado es solo del 36 % al 53 %. Los genes no de HLA también contribuyen a la predisposición a la celiaquía.

El diagnóstico de la celiaquía normalmente se basa en múltiples criterios que incluyen: 1) presentación de síntomas de celiaquía típicos; 2) positividad de pruebas serológicas, que incluyen, por ejemplo, anticuerpos IgA de alto título contra tTG (anti-tTG), anticuerpos de alto título contra péptidos de α -gliadina desamidado; 3) genotipos HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8; 4) enteropatía celíaca encontrada en biopsia de intestino delgado; y 5) respuesta a una dieta sin gluten. La amplia variabilidad de la presentación de celiaquía ha provocado que algunos profesionales clínicos adopten un enfoque cuantitativo definido como la 'regla de cuatro de cinco'. Es decir, el diagnóstico de celiaquía se confirma si se cumplen al menos cuatro de los cinco criterios.

La dermatitis herpetiforme es una manifestación de la celiaquía de la piel que presenta erupción vesicante y depósitos cutáneos de IgA patognomónicos. Los síntomas predominantes son intenso picor y quemazón. La erupción tiene una distribución simétrica característica. Los codos y los antebrazos superiores se afectan en más del 90 % de los pacientes. Otros sitios comúnmente implicados son las nalgas, rodillas, hombros, sacro, cara, cuero cabelludo, cuello y tronco. La atrofia de las vellosidades de tipo celíaco en la mucosa del intestino delgado superior se encuentra en del 65 % al 75 % de los pacientes con dermatitis herpetiforme. Incluso en pacientes con biopsias aparentemente normales, cambios sutiles en la mucosa, tales como un elevado número de linfocitos intraepiteliales, indican sensibilización al gluten. Los pacientes con dermatitis herpetiforme pueden mostrar la misma matriz de manifestaciones, trastornos y complicaciones asociados que los pacientes con celiaquía (enfermedades autoinmunitarias, anemia con deficiencia de hierro, osteoporosis y tumor maligno). Los pacientes con dermatitis herpetiforme generalmente se ponen en una dieta sin gluten debido a que la erupción de la dermatitis herpetiforme es sensible al gluten.

La ataxia por gluten se ha definido como ataxia esporádica por lo demás idiopática con marcadores serológicos positivos para la sensibilización al gluten. Al igual que la celiaquía, es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por daño al cerebelo, dando como resultado ataxia. Los pacientes con ataxia por gluten normalmente tienen anticuerpos anti-gliadina de alto título. Se ha encontrado la deposición generalizada de anticuerpos contra transglutaminasa alrededor de los vasos cerebrales en pacientes con ataxia por gluten. La ataxia por gluten normalmente presenta ataxia cerebelosa pura o, raramente, ataxia en combinación con mioclonos, temblor palatino u opsoclonos mioclonos. La ataxia por gluten es normalmente de aparición gradual con una edad media en la aparición de 53 años. Muchos pacientes tendrán evidencia de enteropatía en la biopsia intestinal. Los pacientes positivos para

anticuerpos anti-gliadina o anticuerpos anti-tTG sin causa alternativa para su ataxia normalmente se ponen en una dieta sin gluten estricta con seguimiento regular.

5 La sensibilidad al gluten, también denominada sensibilidad al gluten no celíaca o intolerancia al gluten, generalmente se caracteriza como un trastorno funcional, morfológico e inmunológico que carece de todas las características de celiaquía, pero sin embargo responde a exclusión al gluten. La sensibilidad al gluten es distinta de la celiaquía y no va acompañada por autoanticuerpos anti-tTG u otras comorbilidades autoinmunitarias. El intestino delgado de los pacientes con sensibilidad al gluten normalmente es normal. Los síntomas de la sensibilidad al gluten pueden parecerse a los asociados a celiaquía, pero con una prevalencia de síntomas extraintestinales, tales como cambios de comportamiento, dolor óseo o articular, calambres musculares, entumecimiento de las piernas, pérdida de peso y fatiga crónica. No existen biomarcadores de laboratorio específicos para la sensibilidad al gluten. Normalmente, el diagnóstico se basa en criterios de exclusión; se usa casi siempre una dieta de eliminación de alimentos que contienen gluten seguido por una exposición abierta para evaluar si la salud mejora o no con la eliminación o reducción del gluten de la dieta del paciente.

Métodos de tratamiento

15 Un sujeto se trata eficazmente siempre que se asegure un resultado clínicamente beneficioso. Esto puede significar, por ejemplo, una resolución completa de los síntomas asociados a un trastorno relacionado con el gluten, una disminución en la gravedad de los síntomas asociados a un trastorno relacionado con el gluten, o un ralentizamiento de la progresión de los síntomas asociados a un trastorno relacionado con el gluten. Estos métodos pueden incluir además las etapas de a) identificar un sujeto (por ejemplo, un paciente y, más específicamente, un paciente humano) que tiene un trastorno relacionado con el gluten; y b) proporcionar al sujeto una composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 descrita en el presente documento, tal como cualquier producto alimenticio fermentado o composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 en un vehículo fisiológicamente aceptable. Una cantidad de dicha composición proporcionada al sujeto que da como resultado una resolución completa de los síntomas asociados a un trastorno relacionado con el gluten, una disminución en la gravedad de los síntomas asociados a un trastorno relacionado con el gluten, o un ralentizamiento de la progresión de síntomas asociados a un trastorno relacionado con el gluten se considera una cantidad terapéuticamente eficaz. Los presentes métodos también pueden incluir una etapa de monitorización para ayudar a optimizar la dosis y la programación, así como predecir el resultado.

30 Los métodos desvelados en el presente documento se pueden aplicar a un amplio intervalo de especies, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos), caballos, cerdos, vacas u otro ganado, perros, gatos u otros mamíferos criados como mascotas, ratas, ratones, u otros animales de laboratorio. Las composiciones descritas en el presente documento son útiles en composiciones y pautas terapéuticas o para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de condiciones como se describen en el presente documento (por ejemplo, un trastorno relacionado con el gluten).

35 Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar por vía oral como parte de la dieta diaria habitual de un sujeto. Las composiciones alimenticias se pueden administrar como soporte nutricional a tanto niños como a adultos. Cuando se formulan como productos farmacéuticos, las composiciones se pueden administrar a cualquier parte del cuerpo del hospedador para la posterior administración a una célula diana. Se puede administrar una composición a, sin limitación, el cerebro, el líquido cefalorraquídeo, articulaciones, mucosa nasal, sangre, pulmones, intestinos, tejidos musculares, piel, o la cavidad peritoneal de un mamífero. En términos de las vías de administración, 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 con el tiempo. En un ejemplo adicional, una preparación de aerosol de una composición se puede administrar a un hospedador por inhalación.

45 Independientemente de si las composiciones se formulan como productos alimenticios o como productos farmacéuticos, la dosificación requerida dependerá de la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la afección del sujeto, por ejemplo, inmadurez del sistema inmunitario o un trastorno gastrointestinal, el tamaño del sujeto, peso, área superficial, edad y sexo, otros fármacos que se administran, y el criterio de los profesionales clínicos especialistas. Las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-1.000 mg/kg. Algunos intervalos de dosis típicas son desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es desde aproximadamente 0,01 mg/kg hasta 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. Es probable que la dosificación dependa de variables tales como el tipo y el grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración.

60 Las dosis eficaces se pueden extrapolar de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o de modelo animal. Por ejemplo, puede ser útil el análisis de efectos sobre la entrada celular de péptidos de gliadina en ensayos basados en células. Las composiciones también se pueden ensayar para efectos sobre respuestas de anticuerpos, producciones de citocinas y respuestas de linfocitos T.

Se esperan amplias variaciones en la dosificación necesarias en vista del espectro de síntomas asociados a los trastornos relacionados con el gluten, la variedad de dianas celulares y las diferentes eficiencias de diversas vías de administración. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas estándar para la optimización, como es bien entendido en la técnica. Las administraciones pueden ser individuales 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 administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de la administración.

La duración del tratamiento con cualquier composición proporcionada en el presente documento puede ser de cualquier longitud de tiempo desde tan corta como un día hasta tan larga como la vida del hospedador (por ejemplo, muchos años). Por ejemplo, se puede administrar una composición una vez a la semana (durante, por ejemplo, 4 semanas hasta muchos meses o años); una vez al mes (por ejemplo, tres a doce meses o durante muchos años); o una vez al año durante un periodo de 5 años, diez años, o más. También se indica que la frecuencia de tratamiento puede ser variable. Por ejemplo, las presentes composiciones se pueden administrar una vez (o dos veces, tres veces, etc.) diariamente, semanalmente, mensualmente, o anualmente.

Se puede usar cualquier método conocido para los expertos en la técnica para determinar si se induce una respuesta particular. Se pueden usar los métodos clínicos que pueden evaluar el grado de un estado de enfermedad particular para determinar si se induce una respuesta. Por ejemplo, se puede monitorizar un sujeto para alivio sintomático, por ejemplo, alivio de diarrea, dolor abdominal, calambres, distensión abdominal y capacidad para tolerar una exposición al gluten. Alternativamente o además, se pueden usar marcadores de suero, técnicas de obtención de imágenes, por ejemplo, ultrasonidos, rayos X y métodos endoscópicos.

Las composiciones también se pueden administrar conjuntamente con otras modalidades terapéuticas. Estas modalidades terapéuticas variarán según el trastorno particular, pero pueden incluir, por ejemplo, remedios dietéticos, tales como una dieta sin gluten. En algunas realizaciones, los remedios dietéticos pueden incluir la introducción de productos de trigo de cepas que se han manipulado por cultivo selectivo o tecnologías recombinantes para expresar formas de gliadina que tienen números reducidos de epítomos de linfocitos T tóxicos. En algunas realizaciones, un remedio dietético puede incluir la administración de un prebiótico, es decir, un agente que estimula el crecimiento o la actividad de una o más especies de la flora intestinal que confieren beneficios de salud al hospedador. Los prebióticos a modo de ejemplo incluyen trans-galactooligosacárido, inulina, fructooligosacárido y lactulosa.

Otras modalidades terapéuticas incluyen la administración de un agente terapéutico. Un agente terapéutico puede ser una enzima, por ejemplo una endopeptidasa (también denominada glutenasa) que degrada el gluten dirigiendo los péptidos ricos en prolina que resisten por lo demás a las proteasas naturales del cuerpo y contienen péptidos altamente inmunogénicos. Las endopeptidasas a modo de ejemplo incluyen prolilendopeptidasas y ALV003, una combinación de una cisteína endoproteasa derivada de semillas de cebada en germinación y una prolilendopeptidasa de *Sphingomonas capsulata*.

Otros agentes terapéuticos incluyen inhibidores de la elevada permeabilidad intestinal típica de celiaquía, por ejemplo, AT-1001 (larazotida) un inhibidor de octapéptido de permeabilidad paracelular que inhibe la reordenación del citoesqueleto inducida por gliadina de células epiteliales intestinales, desensamblaje de la zona de oclusión e incremento máximo de F-actina. Otros agentes terapéuticos incluyen inhibidores de tTG, moduladores del sistema inmunitario y terapia de desensibilización con vacunas basadas en péptidos (Nevvax2).

La administración simultánea de dos o más agentes terapéuticos no requiere que los agentes se administren al mismo tiempo o por la misma vía, en tanto que exista un solapamiento en el periodo de tiempo durante el que los agentes están ejerciendo su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, ya que es administración en días o semanas diferentes.

Artículos de fabricación

Las composiciones descritas en el presente documento también se pueden ensamblar en kits, junto con instrucciones para su uso. Por ejemplo, los kits pueden incluir cantidades medidas de una composición que incluye uno o más productos alimenticios fermentados con *L. paracasei* CBA L74. Las instrucciones para su uso pueden ser transmitidas por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, pueden estar impresas sobre un prospecto en uno o más idiomas o suministradas audible o visualmente (por ejemplo, en un disco compacto). Los materiales de embalaje pueden incluir materiales de embalaje, por ejemplo, viales, cajas, recipientes. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir cantidades medidas de una composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 en un vehículo fisiológicamente aceptable junto con materiales de embalaje e instrucciones para su uso en cualquiera de los formatos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir cantidades medidas de una composición que comprende uno o más metabolitos de *L. paracasei* CBA L74. Los componentes del kit pueden ser adecuados para uso inmediato. La invención engloba kits, sin embargo, que incluyen formulaciones concentradas y/o materiales que pueden requerir dilución antes de usarse.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Péptidos: Se sintetizaron *in vitro* α -gliadina P31-P43 (SEQ ID NO.: 1) y P57-68 (SEQ ID NO.: 2) y se unieron al fluorocromo, lissamina, por Inbios, Nápoles, Italia. Los análisis cromatográficos indicaron que los péptidos fueron 99 % puros.

Ensayo de entrada de péptidos en Caco2: Se incubaron con los péptidos marcados durante 15 minutos cultivos de células Caco2, una línea celular de carcinoma de colon epitelial humano. Los péptidos marcados se retiraron por lavado repetido y las células se examinaron bajo un microscopio confocal. El análisis morfológico mostró que después de 15 minutos de incubación, los péptidos marcados habían entrado en las células y localizado en las vesículas endocitósicas, que aparecieron como manchas coloreadas pequeñas. El análisis cuantitativo se realizó usando un paquete de software especializado que evaluó la intensidad de la fluorescencia de múltiples campos microscópicos.

Cultivo de células Caco2: Se cultivaron células CaCo-2 en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO, San Giuliano Milanese, Italia), 10 % de suero bovino fetal (FBS) (GIBCO, San Giuliano Milanese, Italia) y glutamina 1 mM (GIBCO, San Giuliano Milanese, Italia), en una estufa de incubación a una temperatura de 37 °C a una concentración de CO₂ de 5 %.

Cultivo de *L. paracasei* CBA L74: Se aisló *L. Paracasei* CBA L74 (número de acceso de depósito internacional LMG P-24778) como se describe en el documento WO 2012/177556. Las células se cultivaron en 50 ml de DMEM complementado con FBS y Glu durante la noche a 37 °C a 160 oscilaciones por minuto. Se midió espectrofotométricamente la concentración bacteriana en un espectrofotómetro Beckman DU-7, a una longitud de onda de 600 nm. Se usó la lectura de la densidad óptica (DO) para calcular la concentración bacteriana del siguiente modo: $DO\ 2 = 1,5 \times 10^9$ ufc/ml. Las diferentes concentraciones bacterianas usadas para los experimentos se obtuvieron diluyendo cultivo bacteriano en medio fresco sin antibiótico. Para los experimentos usando sobrenadante solo, el cultivo bacteriano se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros de tamaño de poro.

Péptidos de gliadina y EGF-Alexa-488: Se obtuvieron péptidos sintéticos (Inbios, 95 % de pureza, análisis de MALDI-TOFF como era de esperar) por filtración con Ultrasart-D20 (Sartorius AG, Goettingen, Alemania). El péptido P31-43 tuvo la secuencia de aminoácidos: LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO.: 1). El péptido P57-68 tuvo la secuencia de aminoácidos: QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO.: 1). Los péptidos se conjugaron con lissamina, un fluorocromo rojo excitado por láser de HeNe1 (543 nm) con emisión de banda de 610 nm de longitud. Se obtuvo EGF-Alexa-488 de Molecular Probes, San Giuliano Milanese, Italia.

Ensayo de fluorescencia: Los presentes inventores probaron el efecto de *L. paracasei* CBA L74 en péptidos de gliadina o la entrada de EGF-Alexa en células Caco-2. Se cultivaron células Caco2 en cubreobjetos de vidrio estéril, se transfirieron a una placas de 24 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de *L. paracasei* CBA L74, en un intervalo desde 10⁴ hasta 10⁸ ufc/ml. Para experimentos usando sobrenadante sin células, se trataron células Caco2 con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, recogido de cultivos de *L. paracasei* CBA L74 que habían alcanzado una densidad de 10⁸ ufc/ml. El sobrenadante se usó nuevo o después de la exposición a calor. En algunos experimentos, el sobrenadante se calentó a 80 °C durante 15 minutos. En otros experimentos, el sobrenadante se hirvió durante 5 minutos. Se trataron células Caco2 con las diferentes preparaciones bacterianas en una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C durante 30 minutos y entonces se incubaron con péptidos de gliadina P31-43-lissamina (liss) o P57-68^{liss} o con EGF-Alexa-488. Las concentraciones de péptidos fueron las siguientes: P31-43^{liss} y P57-68^{liss} a 20 microgramos/ml; se usaron péptidos no marcados a 50 microgramos/ml; EGF-Alexa-488 a 10 microgramos/ml. Después de la adición de los péptidos, las células se incubaron en atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C durante 30 minutos. Entonces se retiró el medio por tres lavados con PBS 1X (Gibco). Se fijaron brevemente (5 minutos) los cubreobjetos con paraformaldehído 3 % (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente, luego se montaron y se observaron por microscopio confocal (LSM 510 Zeiss). Las imágenes se generaron y se analizaron con el software AIS Zeiss para evaluar la intensidad de fluorescencia del campo microscópico en consideración. El aumento de las micrografías fue el mismo para todas las figuras mostradas (objetivo 63x). Los péptidos marcados y EGF-Alexa aparecieron en las vesículas de endocitosis que aparecen como pequeños puntos coloreados en rojo (péptidos) o verde (EGF).

Análisis estadístico: Se obtuvieron análisis estadísticos y gráficos de GraphPad Prism. Se calcularon la media y desviaciones estándar. Éstas se evaluaron por la prueba de la t de Student. Los resultados que tienen valores de p <0,05 se consideraron significativos.

Ejemplo 2: Efecto de *L. paracasei* CBA L74 vivo sobre la entrada de péptidos de α -gliadina

L. paracasei CBA L74 vivo redujo la entrada de tanto P31-43 como P57-68 en células CaCo2. Se muestran imágenes de fluorescencia confocal en la Figura 1. Las células de control (paneles izquierdos) que se incubaron con P31-43 marcado con lissamina en ausencia de *L. paracasei* CBA L74 mostraron distintos patrones de fluorescencia que se correspondieron con vesículas endocíticas que contienen P31-43 (flechas blancas). A diferencia, la

fluorescencia se redujo en células que se incubaron con P31-43 marcado con lissamina en presencia de *L. paracasei* CBA L74 (paneles derechos).

5 El análisis cuantitativo indicó que el efecto de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de P31-43 fue dependiente de la dosis y estadísticamente significativo. La Figura 2 muestra los resultados de cinco experimentos independientes en muestras duplicadas. La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos al azar en cada muestra. Como se muestra en la Figura 2, el tratamiento de células CaCo2 con 10^4 , 10^6 y 10^8 *L. paracasei* CBA L74 produjo una disminución estadísticamente significativa, dependiente de la dosis, en la entrada de P31-43.

10 Se observó un efecto similar para el péptido P57-68. El experimento mostrado en la Figura 3 se realizó exactamente como el experimento de la Figura 2, excepto que se usó P57-68 en lugar de P31-43. Como se muestra en la Figura 3, el tratamiento de células CaCo2 con 10^4 , 10^6 y 10^8 *L. paracasei* CBA L74 produjo una disminución estadísticamente significativa, dependiente de la dosis, en la entrada de P57-68.

Ejemplo 3: Efecto de ADN aislado de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de péptidos de α -gliadina

15 Se extrajo y purificó por métodos convencionales ADN de *L. paracasei* CBA L74. Como se muestra en la Figura 4, el tratamiento de células CaCo2 con P31-43 en presencia de una cantidad de ADN de *L. paracasei* CBA L74 equivalente al de 10^8 células no bloqueó la entrada de péptidos.

Ejemplo 4: Efecto del sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de péptidos de α -gliadina (ejemplo de referencia)

20 Se recogió por centrifugación sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 y el sobrenadante de cultivo se filtró para retirar bacterias vivas y residuos celulares. Se aplicó el sobrenadante del equivalente de 10^8 células a células CaCo2 en presencia de péptido P31-43. Se trataron células CaCo2 de control con 10^8 células vivas de *L. paracasei* CBA L74. La Figura 5 muestra los resultados de cuatro experimentos independientes en muestras duplicadas. La intensidad de fluorescencia se calculó durante 30 campos aleatorios en cada muestra.

25 Como se representa en el gráfico de barras en la Figura 5a, el tratamiento de células CaCo2 con células vivas de *L. paracasei* CBA L74 produjo nuevamente una disminución estadísticamente significativa en la entrada del péptido P31-43. El tratamiento de células CaCo2 con el sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 produjo una disminución de una magnitud similar. Imágenes confocales para este experimento se muestran en la Figura 5b. Estas imágenes muestran claramente que el sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 redujo la entrada del péptido P31-43.

30 Los resultados de un experimento similar en el que P57-68 se sustituyó por P31-43 se muestran en la Figura 6. El tratamiento de células CaCo2 con células vivas de *L. paracasei* CBA L74 produjo nuevamente una disminución estadísticamente significativa en la entrada del péptido P57-68 (Figura 6a). El tratamiento de células CaCo2 con un sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 produjo una disminución de una magnitud similar. Las imágenes confocales para este experimento se muestran en la Figura 6b. Estas imágenes muestran claramente que el sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 redujo la entrada del péptido P57-68.

Ejemplo 5: Efecto del sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 tratado con calor sobre la entrada de péptidos de α -gliadina (ejemplo de referencia)

35 Se recogió sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 según el método del Ejemplo 4 y luego se calentó durante 3a minutos a ya fuera 37° u 80° C durante 3a minutos. Entonces se enfriaron los sobrenadantes calentados y se aplicaron a células Caco2 en presencia de P31-43. La Figura 7 muestra los resultados de cinco experimentos independientes en muestras duplicadas para células de control que no fueron sobrenadante tratado, cinco experimentos independientes en muestras duplicadas para células de control tratadas con sobrenadante no calentado (" 37° C") y dos experimentos independientes en muestras duplicadas para células que se habían tratado con sobrenadante calentado (" 80° C"). La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos al azar en cada muestra. Como se muestra en la Figura 7, el sobrenadante calentado a 80° C retuvo la capacidad del sobrenadante no calentado para bloquear la entrada del péptido P31-43 en células CaCo2. Las imágenes confocales para este experimento se muestran en el panel derecho de la Figura 7. Estas imágenes muestran claramente que el sobrenadante de cultivo *L. paracasei* CBA L74 tratado con calor redujo la entrada del péptido P31-43 al mismo grado que lo hizo el sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 no tratado con calor. Tomados conjuntamente, estos datos sugirieron que el efecto del sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 no resultó de la actividad enzimática.

Ejemplo 6: Efecto de arroz fermentado y avena fermentada de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de péptido de α -gliadina

55 Se preparó arroz fermentado de *L. paracasei* CBA L74. El arroz fermentado, sobrenadante del arroz fermentado o sobrenadante tratado con calor del arroz fermentado se aplicó a células CaCo2 en presencia del péptido P31-43 y se monitorizó la entrada del péptido según el método del Ejemplo 2. Como se muestra en la Figura 8, los tres tratamientos, arroz fermentado, sobrenadante de arroz fermentado o sobrenadante tratado con calor del arroz

fermentado, redujeron la entrada de péptidos con respecto a las células CaCo2 no tratadas. Como se muestra en la Figura 9, la reducción en la entrada del péptido P31-43 en presencia de arroz fermentado fue estadísticamente significativa (barras a mano derecha). Se observó un efecto estadísticamente significativo similar en presencia de avena fermentada (barras a mano izquierda).

5 **Ejemplo 7: Efecto de arroz fermentado y avena fermentada de *L. paracasei* CBA L74 en la entrada de Dextran-Texas Red en células Caco2**

Se prepararon arroz fermentado y avena fermentada de *L. paracasei* CBA L74. Como se muestra en la Figura 10, la incubación de células CaCo2 con ya fuera arroz fermentado o avena fermentada produjo una reducción estadísticamente significativa en la entrada en células de Dextran-Texas Red con respecto a células que se habían tratado con arroz o avena no fermentado, respectivamente. Puesto que Dextran se recoge generalmente por células mediante macropinocitosis, estos datos sugirieron que los metabolitos de *L. paracasei* CBA L74 pueden bloquear la vía macropinocitótica.

15 **Ejemplo 8: Efecto de sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en células Caco2 (ejemplo de referencia)**

Se recogió el sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 según el método del Ejemplo 4 y se aplicó a células Caco2 en presencia de EGF conjugado con Alexa Fluor® (Invitrogen). Como se representa en el gráfico de barras en la Figura 11, el tratamiento de células CaCo2 con sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 produjo una disminución estadísticamente significativa en la entrada en células de EGF. Las imágenes confocales para este experimento se muestran en la Figura 12. Puesto que la captación de EGF requiere la unión específica del receptor, por ejemplo, a un receptor de EGF, estos datos sugirieron que los metabolitos de *L. paracasei* CBA L74 pueden bloquear la vía endocitótica mediada por clatrina.

20 **Ejemplo 9: Efecto dependiente de la concentración de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de P31-43 y P57-68 en células Caco2**

Se trataron células Caco2 con concentraciones crecientes de *L. Paracasei* CBA L74 y luego se incubaron con péptidos de gliadina P31-43^{liss} o P57-68^{liss} como se describe en el Ejemplo 1. Las vesículas de endocitosis que contuvieron P31-43 marcado o P57-68 marcado aparecieron como manchas rojas con una distribución citosólica después de 30 minutos de exposición. El tratamiento con *L. paracasei* CBA L74 produjo una reducción dependiente de la dosis en tanto la entrada de P31-43 como P57-68 en células Caco-2. Como se muestra en las Figuras 13b, 13c y 13d, para el tratamiento de P31-43, con 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, se produjo una reducción de la intensidad de fluorescencia con respecto a la observada en células de control no tratadas (Figura 13a). Las flechas blancas indican vesículas que contienen P31-43^{liss}. Estos resultados se presentan cuantitativamente en la Figura 14. La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos aleatorios para cada muestra. Los datos en la Figura 14 fueron representativos de cinco experimentos independientes. El gráfico de barras en la Figura 14 compara la intensidad de fluorescencia para células de control no tratadas ("UN") con la de células que se expusieron a P31-43^{liss} en presencia de 10^4 , 10^6 o 10^8 ufc/ml de células de *L. paracasei* CBA L74. El tratamiento con *L. paracasei* CBA L74 produjo una disminución estadísticamente significativa en la intensidad de fluorescencia de 50 %, 70 % y 75 %, respectivamente para 10^4 , 10^6 o 10^8 ufc/ml de células de *L. paracasei* CBA L74 (**=p<0,001).

Como se muestra en las Figuras 15b, 15c y 15d, para P57-68^{liss}, el tratamiento con 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, produjo una reducción de la intensidad de fluorescencia con respecto a la observada en células de control no tratadas (Figura 15a). Las flechas blancas indican vesículas que contienen P57-68^{liss}. Estos resultados se presentan cuantitativamente en la Figura 16. La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos aleatorios para cada muestra. Los datos en la Figura 16 fueron representativos de cinco experimentos independientes. El gráfico de barras en la Figura 16 compara la intensidad de fluorescencia para células de control no tratadas ("UN") con la de células que se expusieron a P57-68^{liss} en presencia de 10^4 , 10^6 o 10^8 ufc/ml de células de *L. paracasei* CBA L74. El tratamiento con *L. paracasei* CBA L74 produjo una disminución estadísticamente significativa en la intensidad de fluorescencia de 25 %, 25 % y 50 %, respectivamente, para 10^4 , 10^6 o 10^8 ufc/ml de células de *L. paracasei* CBA L74. Como se muestra en las Figuras 15B, 15C y 15D, para P57-68, el tratamiento con 10^4 , 10^6 y 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 produjo una reducción de la intensidad de fluorescencia de 25 %, 25 % y 50 %, respectivamente, con respecto a las células de control no tratadas (**=p<0,001).

Como se muestra en la Figura 17, el tratamiento con 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 redujo la intensidad de fluorescencia en 75 % para P31-43 y en 50 % para P57-68. Estos datos sugirieron que *L. paracasei* CBA L74 puede ser más eficiente en reducir la entrada de P41-43 que en reducir la entrada de P57-68, posiblemente reflejando las diferentes vías endocitóticas.

55 **Ejemplo 10: Efecto dependiente de la concentración de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de P31-43 y P57-68 en células Caco2**

Se trataron células Caco2 con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 o ADN de *L. paracasei* CBA L74 como se describe en el Ejemplo 1. Se incubaron las células Caco2 durante 30 minutos en sobrenadante o ADN del equivalente de 10^8 ufc/ml. Como se muestra en las Figuras 18b y 18c, el tratamiento con cualquiera de células de *L. paracasei* CBA L74 o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, produjeron una reducción en la intensidad de fluorescencia en células expuestas a P31-43-liss, con respecto a la observada en células de control no tratadas (Figura 18a). Estos resultados se presentan cuantitativamente en la Figura 19. La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos aleatorios para cada muestra. Los datos en la Figura 19 fueron representativos de cinco experimentos independientes. El gráfico de barras en la Figura 19 compara la intensidad de fluorescencia para células de control no tratadas ("UN") con la de células que se expusieron a P31-43-liss en presencia de 10^8 ufc/ml de células de *L. paracasei* CBA L74 ("LP 10^8 ") o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 de un cultivo de 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 ("Sob LP 10^8 "). Como se muestra en la Figura 19, el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 redujo significativamente la entrada de P31-43 en células Caco2, calculado como la reducción de la intensidad de fluorescencia, en aproximadamente un 25 % con respecto a las células de control no tratadas (**= $p < 0,001$).

Como se muestra en las Figuras 20b y 20c, el tratamiento con cualquiera de células de *L. paracasei* CBA L74 o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, produjo una reducción en la intensidad de fluorescencia en células expuestas a P57-68-liss, con respecto al observado en células de control no tratadas (Figura 20a). Estos resultados se presentan cuantitativamente en la Figura 21. El gráfico de barras en la Figura 21 compara la intensidad de fluorescencia para las células de control no tratadas ("UN") con la de las células que se expusieron a P57-68-liss en presencia de 10^8 ufc/ml de células de *L. paracasei* CBA L74 ("LP 10^8 ") o sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sob LP 10^8 ") de un cultivo de 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74. Como se muestra en la Figura 21, el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 redujo significativamente la entrada de P31-43 en células Caco2, calculada como la reducción de la intensidad de fluorescencia, en aproximadamente un 40 % con respecto a las células de control no tratadas (**= $p < 0,001$).

A diferencia, el tratamiento con ADN purificado de *L. paracasei* CBA L74 no tuvo efecto sobre la entrada de P31-43 o P57-68 en células Caco2. Tomados conjuntamente, estos datos sugirieron que el metabolito responsable para reducir la entrada de péptidos se puede secretar en el sobrenadante de cultivo bacteriano.

Ejemplo 11: Efecto del sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de EGF-Alexa 488 en células Caco2 (ejemplo de referencia)

Se trataron células Caco2 con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 de un cultivo de 1as ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 seguido por incubación con EGF-Alexa 488 durante 30 minutos como se describe en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 22b, el tratamiento con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 produjo una reducción en la intensidad de fluorescencia en células expuestas a EGF-Alexa 488, con respecto a la observada en células de control no tratadas (Figura 22a). Estos resultados se presentan cuantitativamente en la Figura 23. La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos aleatorios para cada muestra. Los datos en la Figura 23 fueron representativos de cinco experimentos independientes. El gráfico de barras en la Figura 23 compara la intensidad de fluorescencia para células de control no tratadas ("UN") con la de células que se expusieron a EGF-Alexa 488 en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sob LP 10^8 "). Como se muestra en la Figura 23, el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 redujo significativamente la entrada de EGF-Alexa 488 en células Caco2, calculada como la reducción de la intensidad de fluorescencia, en aproximadamente un 50 % con respecto a las células de control no tratadas. Pareció que la entrada de EGF-Alexa 488 se bloqueaba en la membrana celular (**= $p < 0,001$).

Ejemplo 12: Efecto de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de P31-43 en células Caco2 tras la retirada del sobrenadante (ejemplo de referencia)

Se incubaron células Caco2 con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 de un cultivo de 1as ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 durante 30 minutos como se describe en el Ejemplo 1. Entonces se retiró el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 y se sustituyó con DMEM. Se añadió P31-43-liss y la entrada de péptidos se monitorizó como se describe en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 24c, la entrada de P31-43-liss se redujo significativamente, con respecto a las células de control no tratadas (Figura 24a) incluso después de que el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 se hubiera retirado y sustituido con DMEM. La Figura 24b muestra que la célula Caco2 se había tratado con el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que no se había retirado. El gráfico de barras en la Figura 25 compara la intensidad de fluorescencia para las células de control no tratadas ("UN"); células que se expusieron a P31-43-liss en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sob LP 10^8 ") y células que se expusieron a P31-43-liss tras la retirada del sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("MEM") (**= $p < 0,001$).

Ejemplo 13: Efecto de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 tratado con calor sobre la entrada de P31-43 en células Caco2 (ejemplo de referencia)

Se incubaron células Caco2 con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 (de un cultivo de 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74) que se habían tratado con calor hirviendo durante 5 minutos o por incubación a 80 °C durante 15 minutos. Se ensayó la entrada de P31-43-liss como se describe en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 26d, se redujo

la entrada de P31-43-^{liss}, con respecto a las células de control no tratadas (Figura 24a) incluso después de que el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 se calentara a 80 °C. A diferencia, la entrada de P31-43-liss no se redujo significativamente (Figura 26c), con respecto a las células de control no tratadas (Figura 24a) cuando el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 se había calentado a 95 °C - 100 °C. La Figura 26b muestra células Caco2 que se habían tratado con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que no se había tratado con calor. El gráfico de barras en la Figura 27 compara la intensidad de fluorescencia para las células de control no tratadas ("UN"); células que se expusieron a P31-43-liss en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sob LP 10⁸") que no se habían tratado con calor; células que se expusieron a P31-43-^{liss} en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que se había hervido ("95 °-100 °"); y células que se expusieron a P31-43-^{liss} en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que se habían calentado a 80 °C ("70 °- 80 °"). Tomados conjuntamente, estos datos sugirieron que el efector biológico en el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 puede no ser una enzima, puesto que la actividad enzimática normalmente se destruye por temperaturas de 80 °C (**=p<0,001).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende *Lactobacillus paracasei* CBA L74, número de acceso de depósito internacional LMG P-24778, para su uso en reducir un síntoma de la toxicidad al péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten proporcionando un aumento de la barrera a la translocación de dicho péptido de gliadina a través de la mucosa intestinal de dicho sujeto.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición es un cultivo de *Lactobacillus paracasei* CBA L74, número de acceso de depósito internacional LMG P- 24778.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición es un cultivo de células vivas o no replicantes de *Lactobacillus paracasei* CBA L74, número de acceso de depósito internacional LMG P-24778.
- 10 4. La composición para su uso según la reivindicación 3, en la que las células del cultivo no replicante de *Lactobacillus paracasei* CBA L74, número de acceso de depósito internacional LMG P-24778, están muertas.
5. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha composición reduce la entrada celular de un péptido de gliadina.
- 15 6. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el péptido de gliadina es un péptido de alfa-gliadina.
7. La composición para su uso según la reivindicación 6, en la que el péptido de alfa-gliadina tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 1); QLQPFQPQLPY (SEQ ID NO: 2); LGQQQPFPPQQPYQPQPF (SEQ ID NO: 3); y LQLQPFQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4).
- 20 8. La composición para su uso según la reivindicación 1, que comprende además un vehículo fisiológicamente aceptable.
9. La composición para su uso según la reivindicación 8, en la que el vehículo fisiológicamente aceptable es un producto alimenticio o un vehículo farmacéutico.
- 25 10. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el trastorno relacionado con el gluten es celiaquía o sensibilidad al gluten.
11. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la composición comprende un producto alimenticio o un vehículo farmacéutico.
- 30 12. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el síntoma de la toxicidad al péptido de gliadina comprende inflamación, una reacción autoinmunitaria, un síntoma gastrointestinal, pérdida de peso, anemia, osteoporosis, artritis, infertilidad, neuropatía periférica o insuficiencia hepática.
- 35 13. Un kit que comprende una cantidad medida de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en reducir un síntoma de toxicidad al péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten y en el que dicho kit comprende uno o más artículos seleccionados del grupo que consiste en material de embalaje, un prospecto que comprende instrucciones para su uso, un líquido estéril, una jeringa y un recipiente estéril.
14. El kit de la reivindicación 13, en el que la composición comprende además un producto alimenticio o un vehículo farmacéutico.

Fig. 1

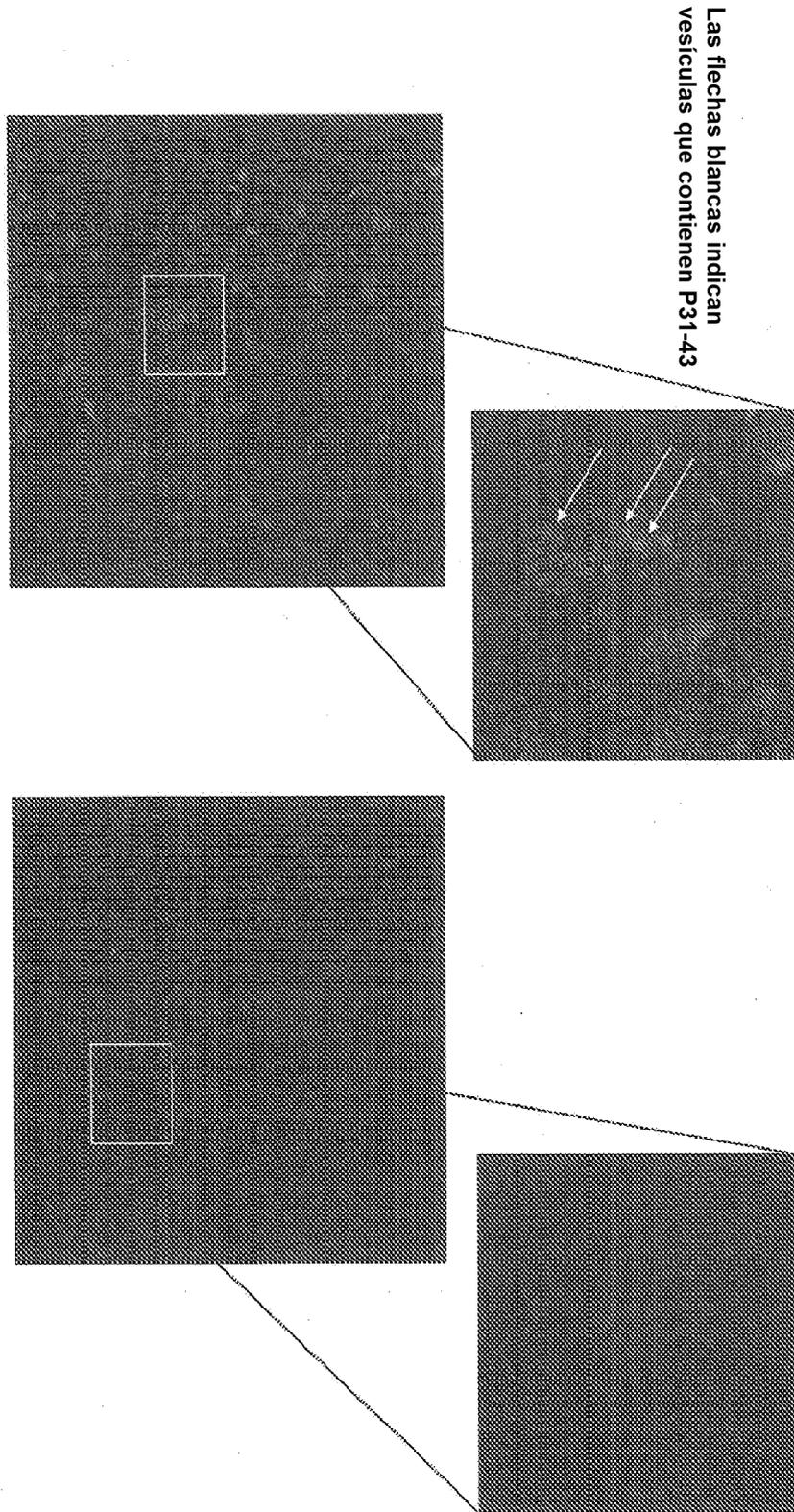


Fig. 2

Intensidad de fluorescencia / 30 campos aleatorios

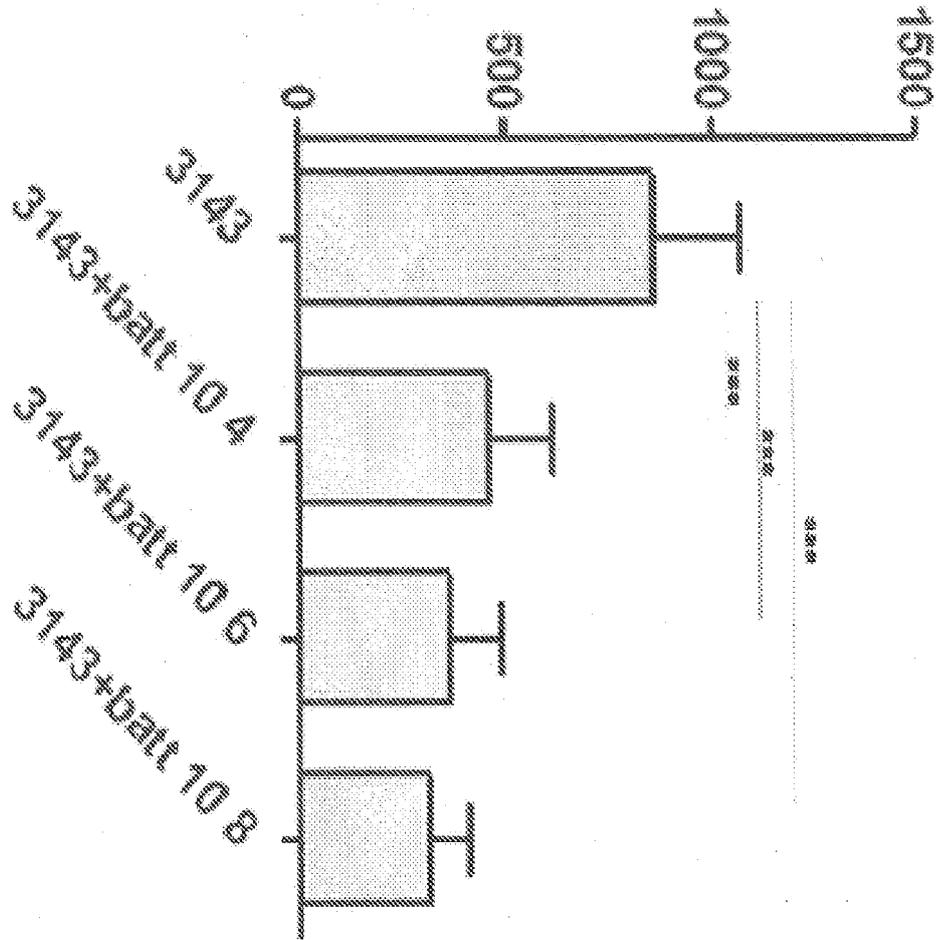


Fig. 3

Intensidad de fluorescencia / 30 campos aleatorios

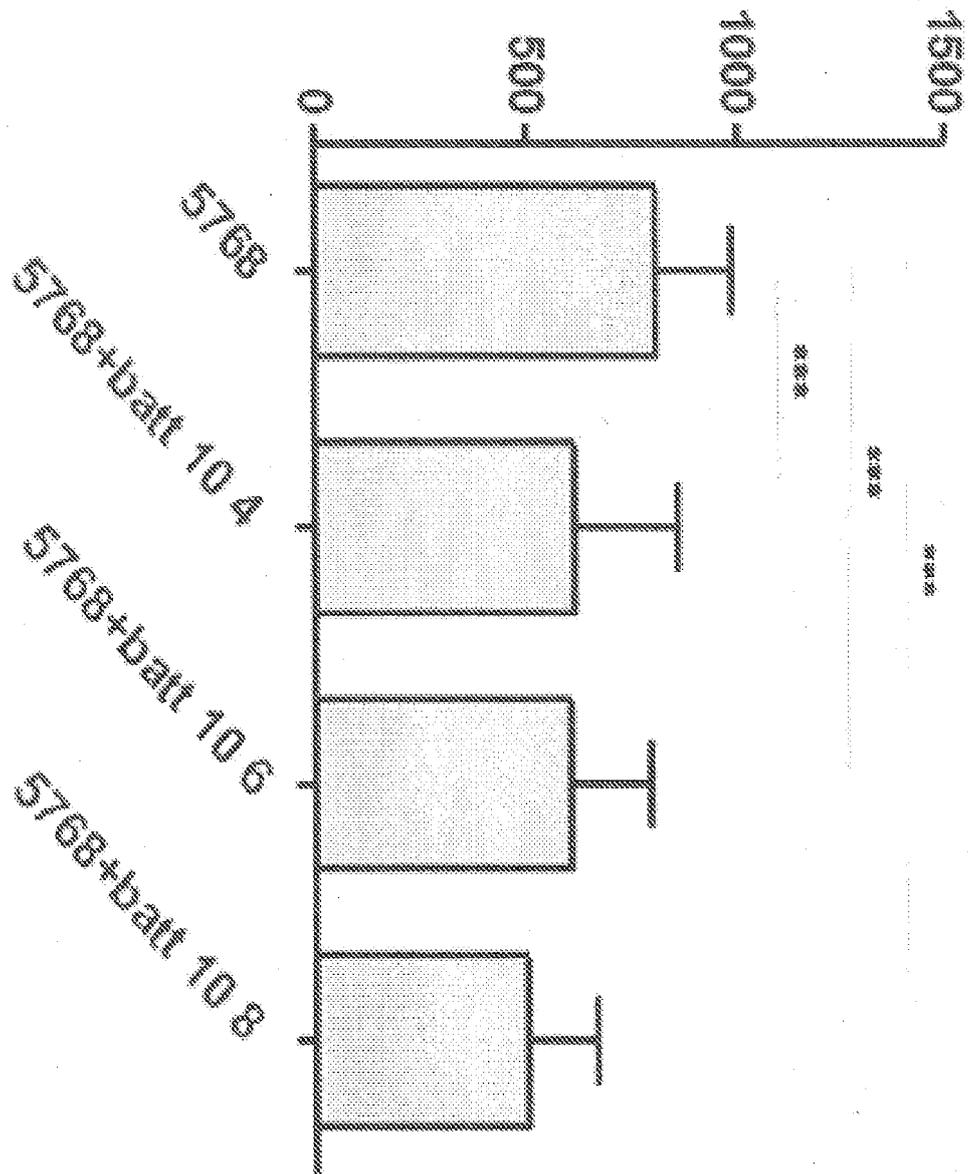
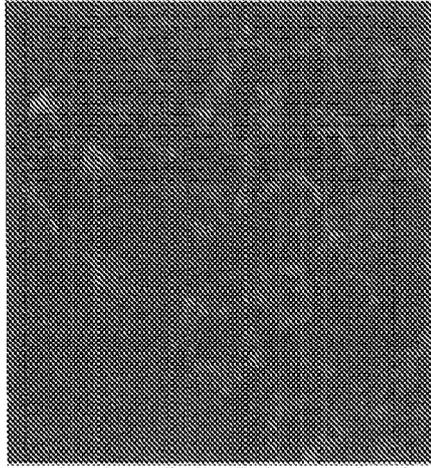


Fig. 4

No tratado



ADN de bacterias 10^8

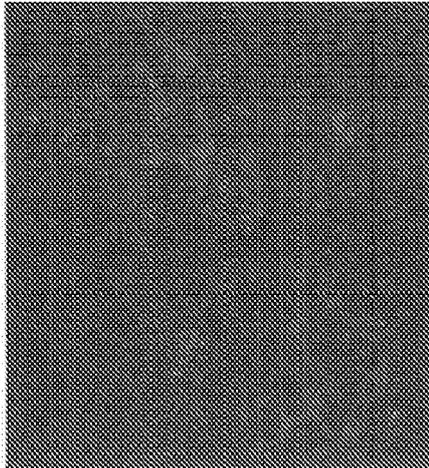


Fig. 5a

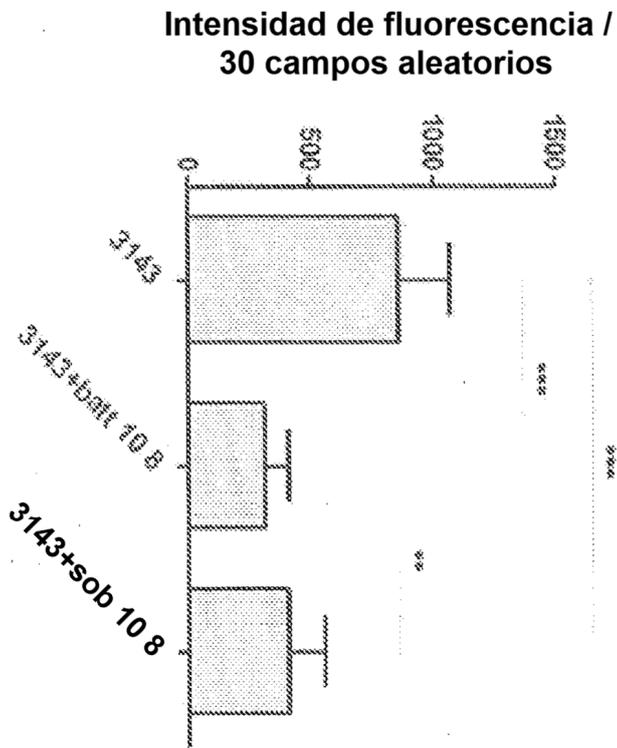


Fig. 5b

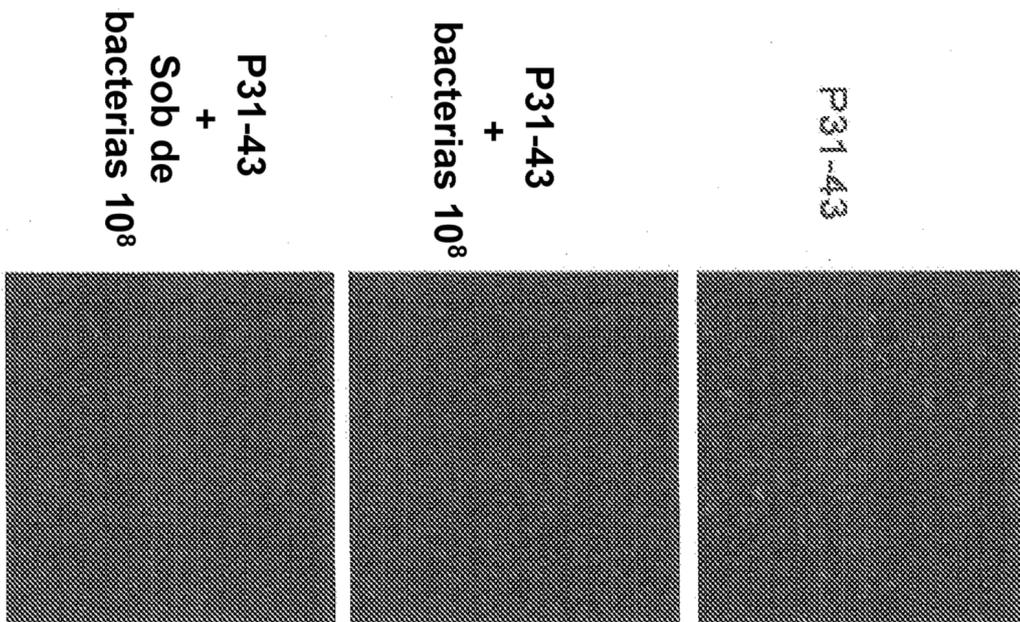


Fig. 6a

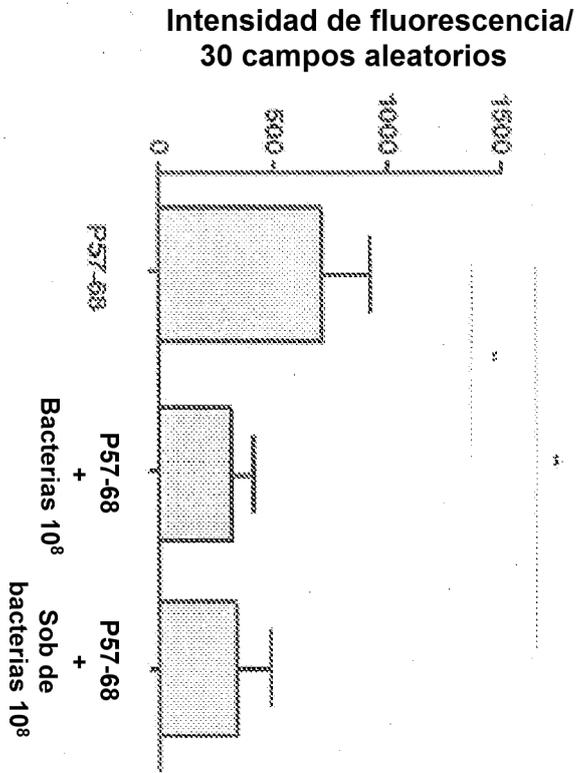


Fig. 6b

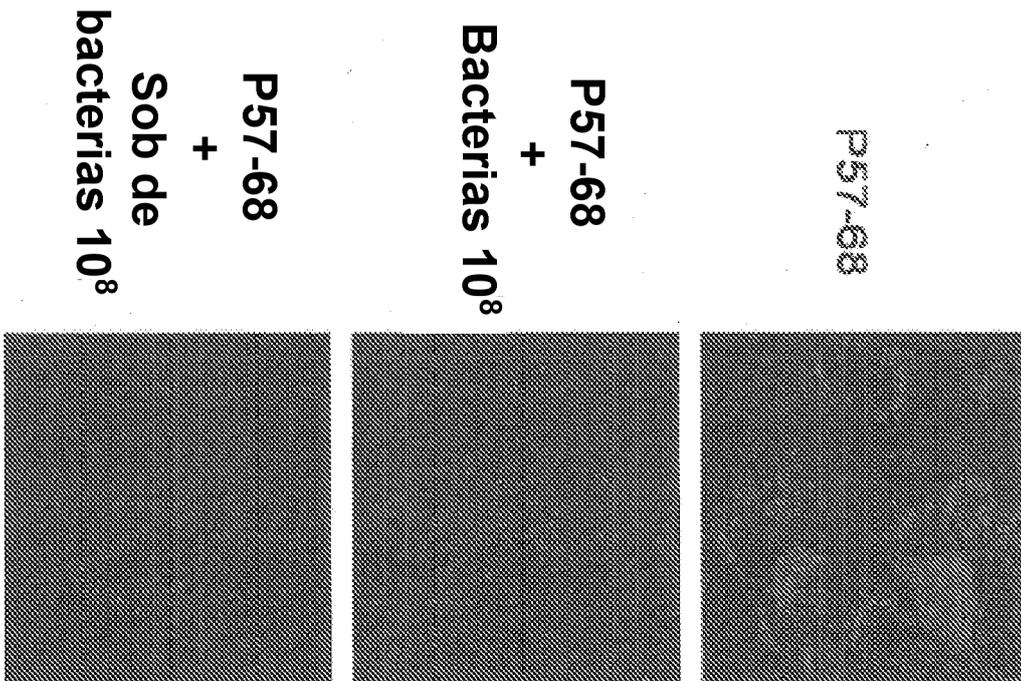


Fig. 7a

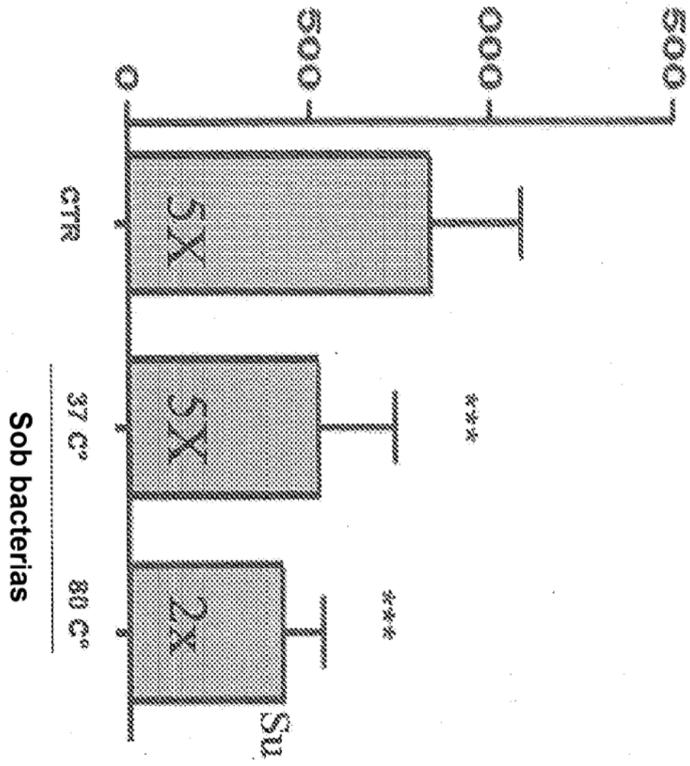


Fig. 7b

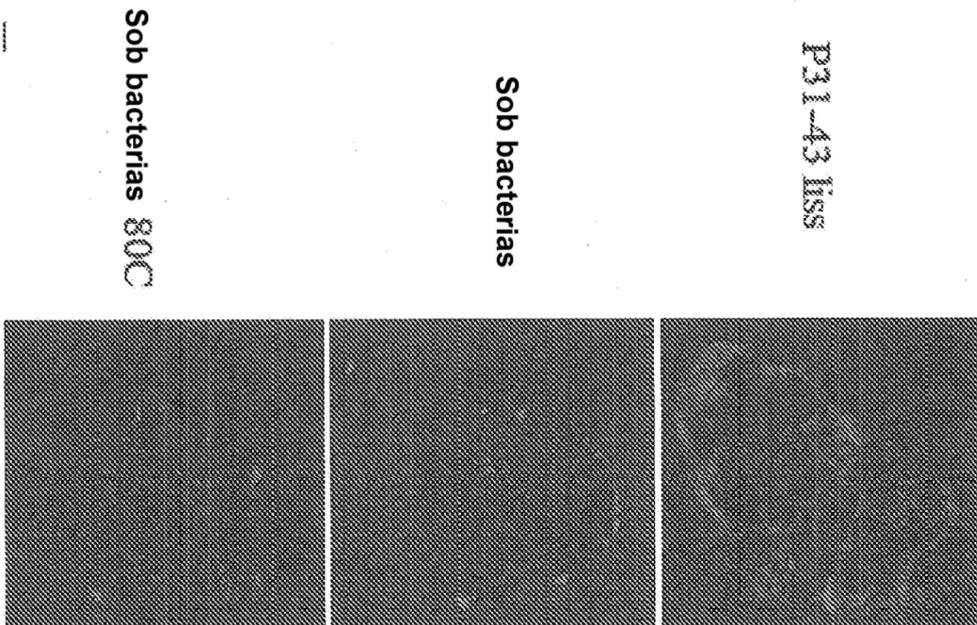
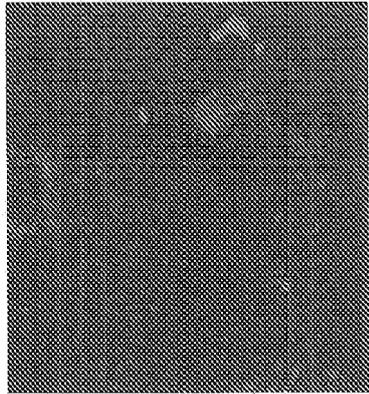
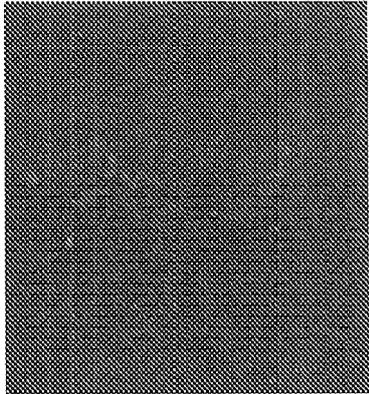


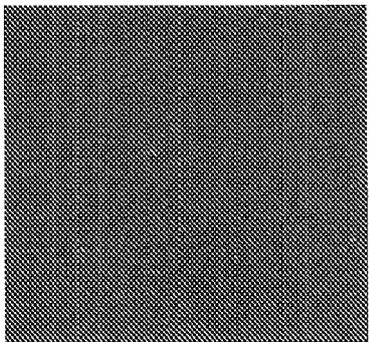
Fig. 8



Fermento



Sob de fermento



**Sob de fermento
80C**

P31-43 Iiss

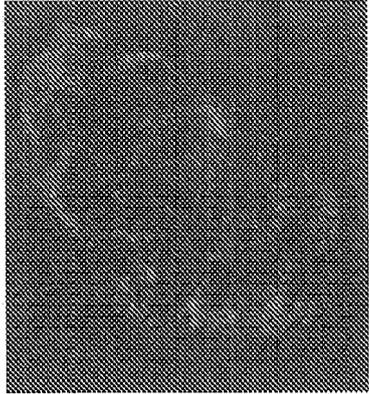


Fig. 9

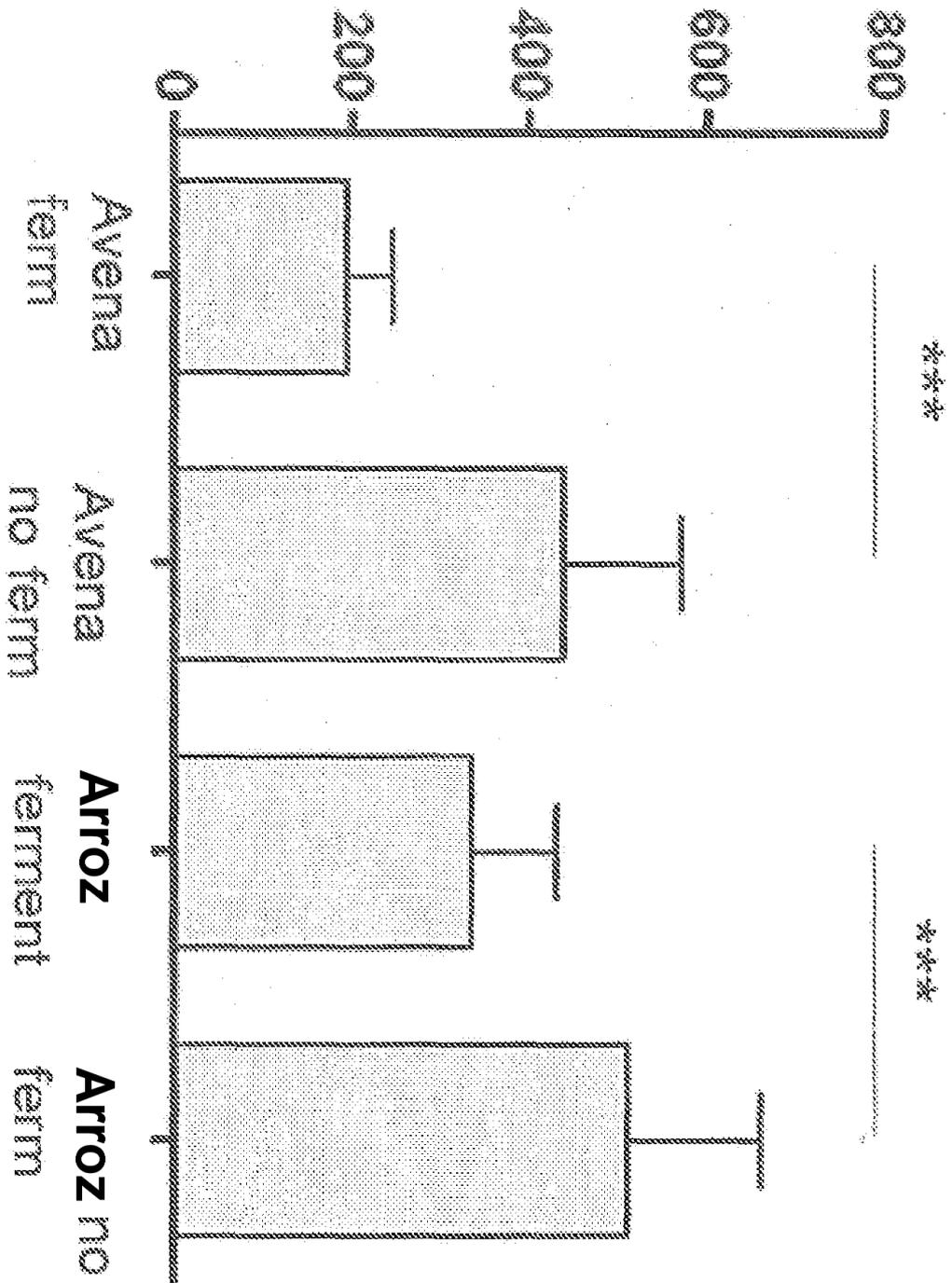


Fig. 10

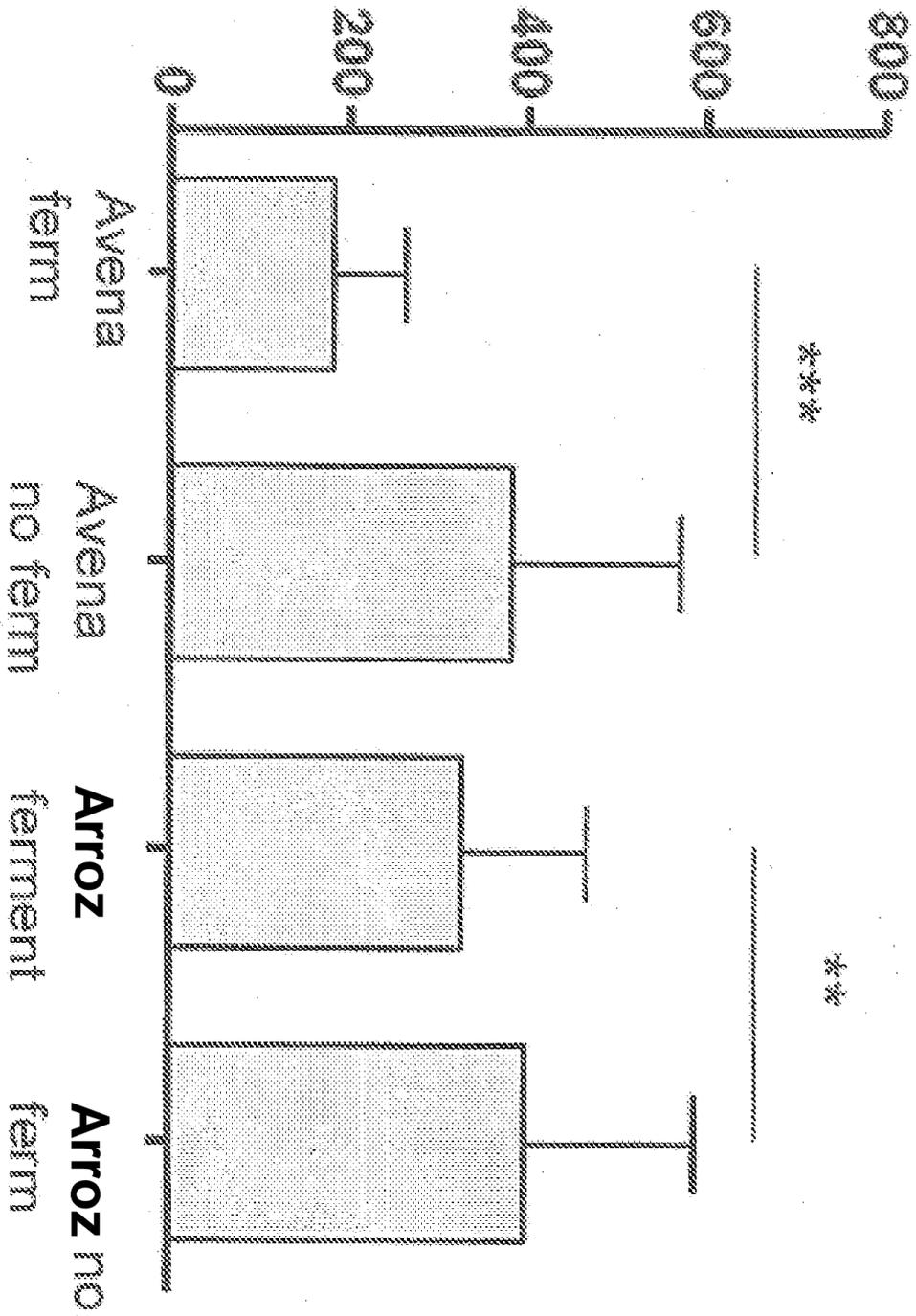


Fig. 11

Intensidad de fluorescencia / 30 campos aleatorios

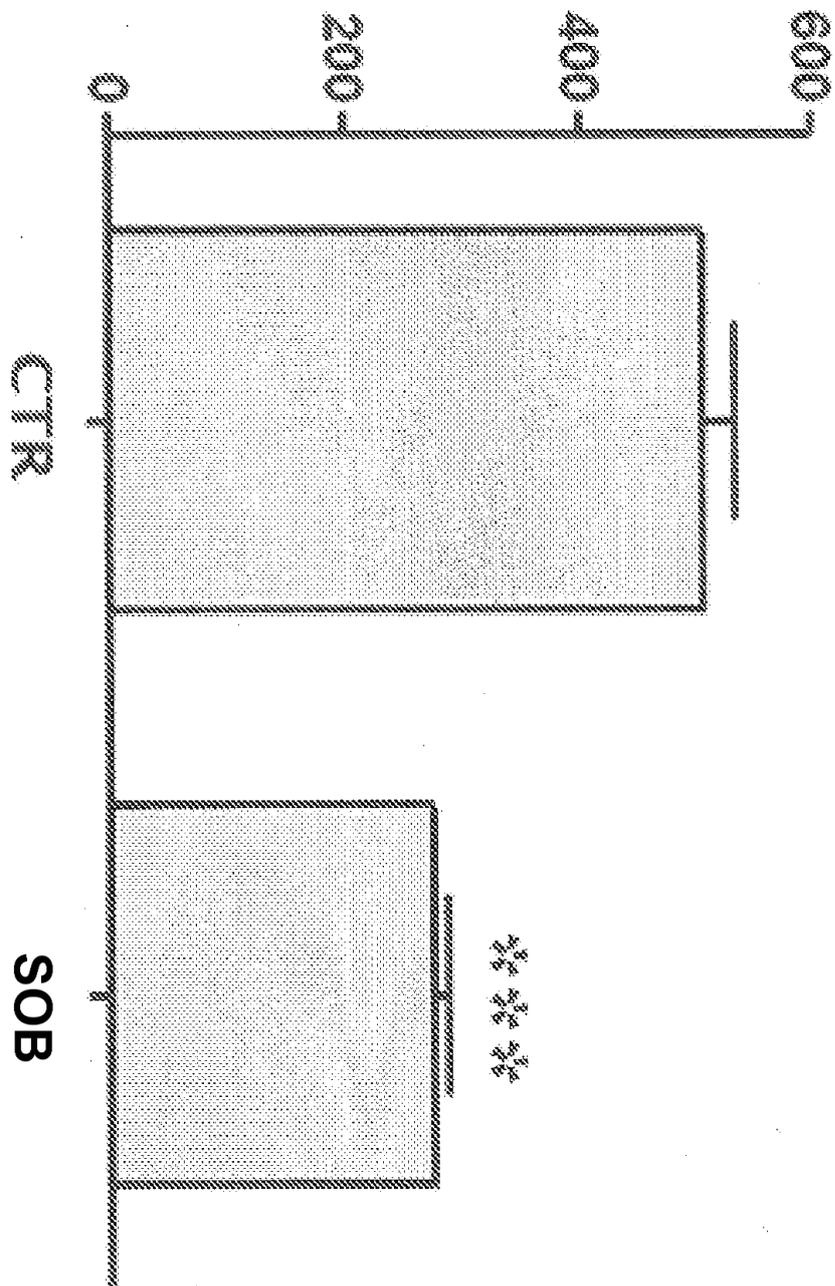
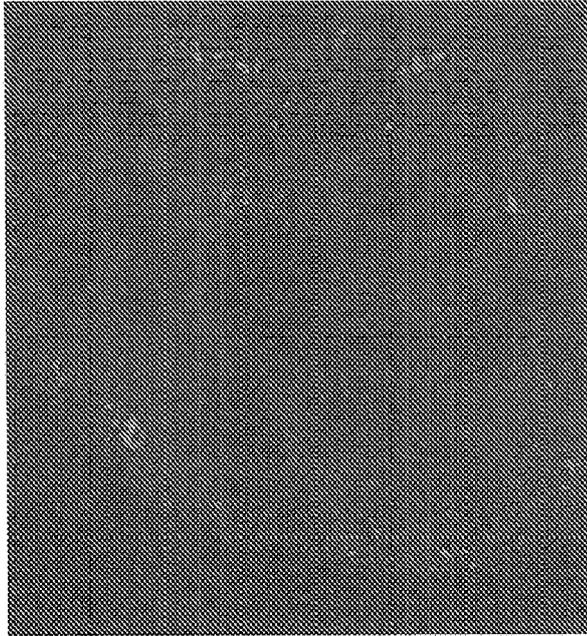


Fig. 12

CTR



SOB

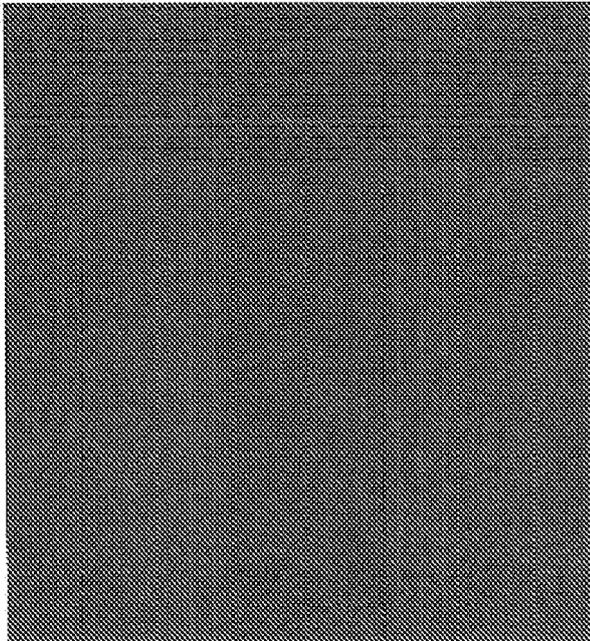


Fig. 13

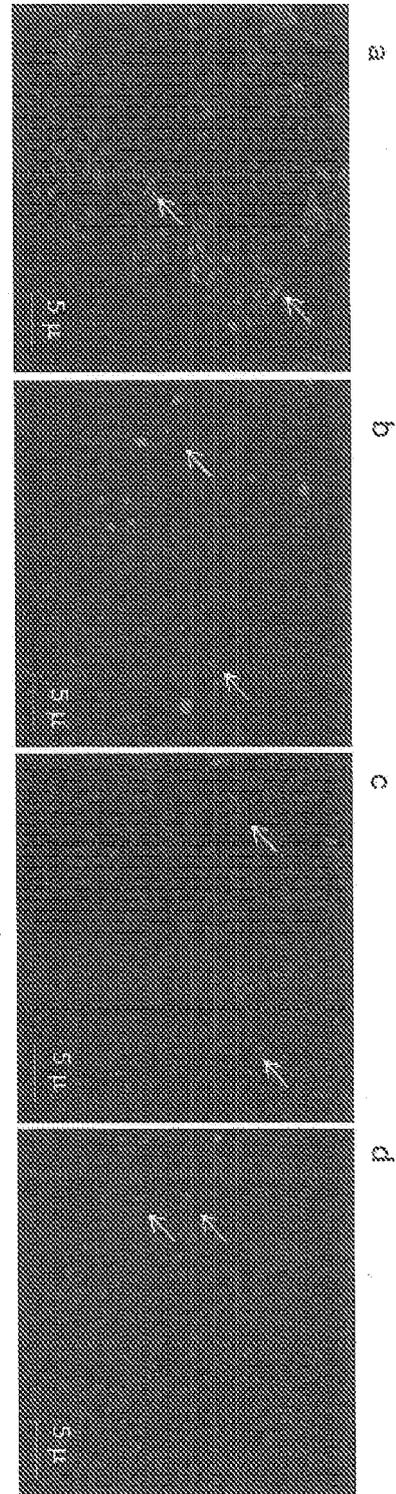


Fig. 14

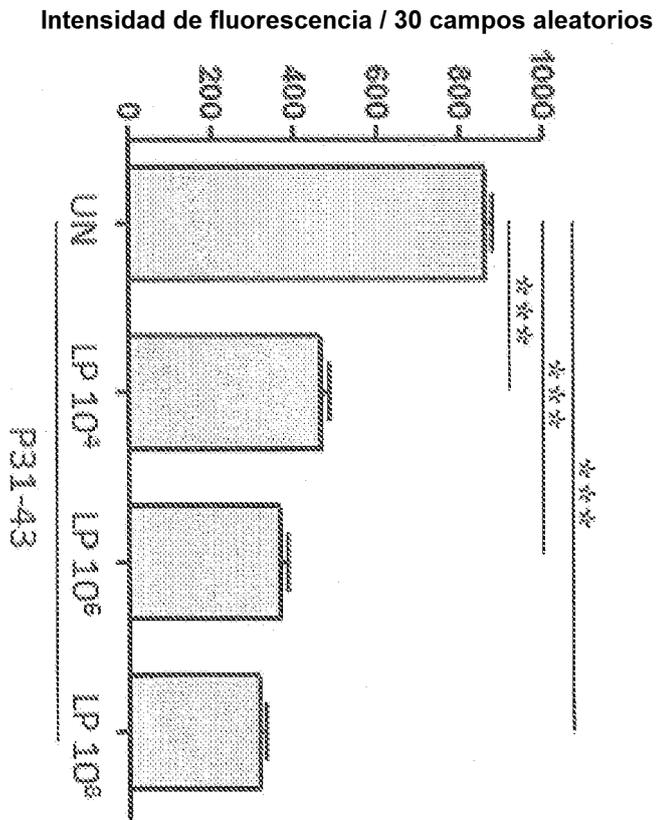


Fig. 15

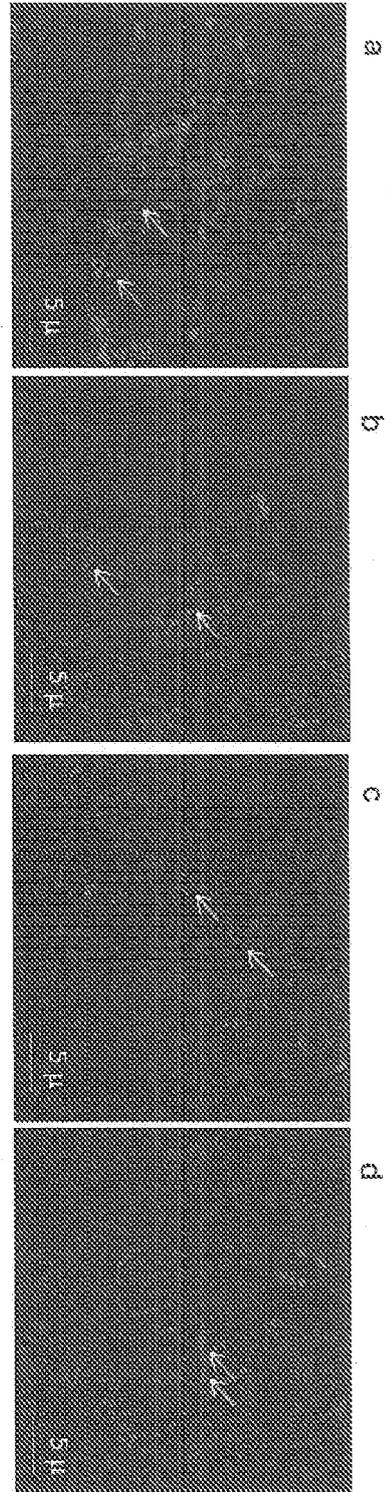


Fig. 16

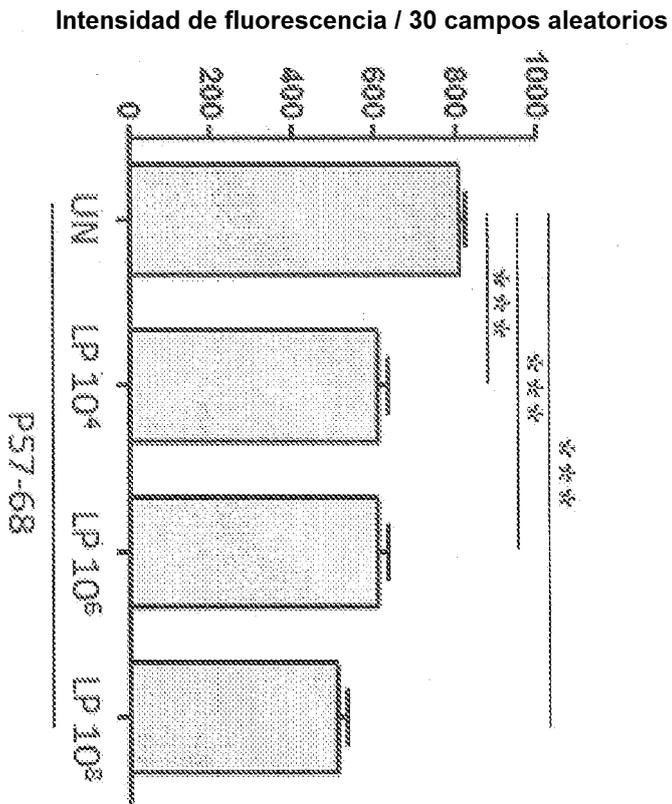


Fig. 17

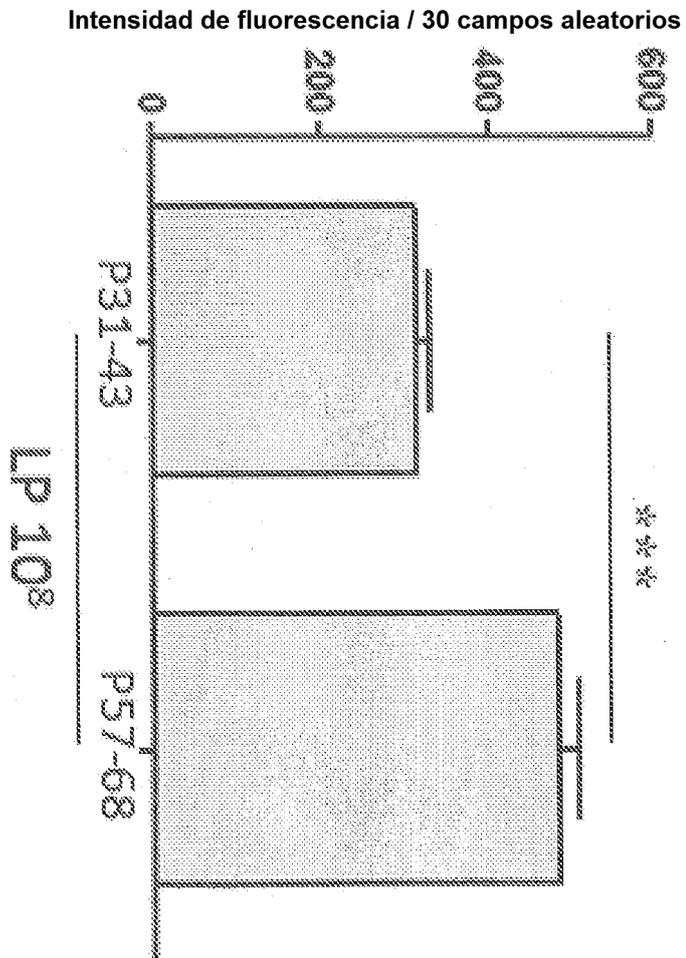


Fig. 18

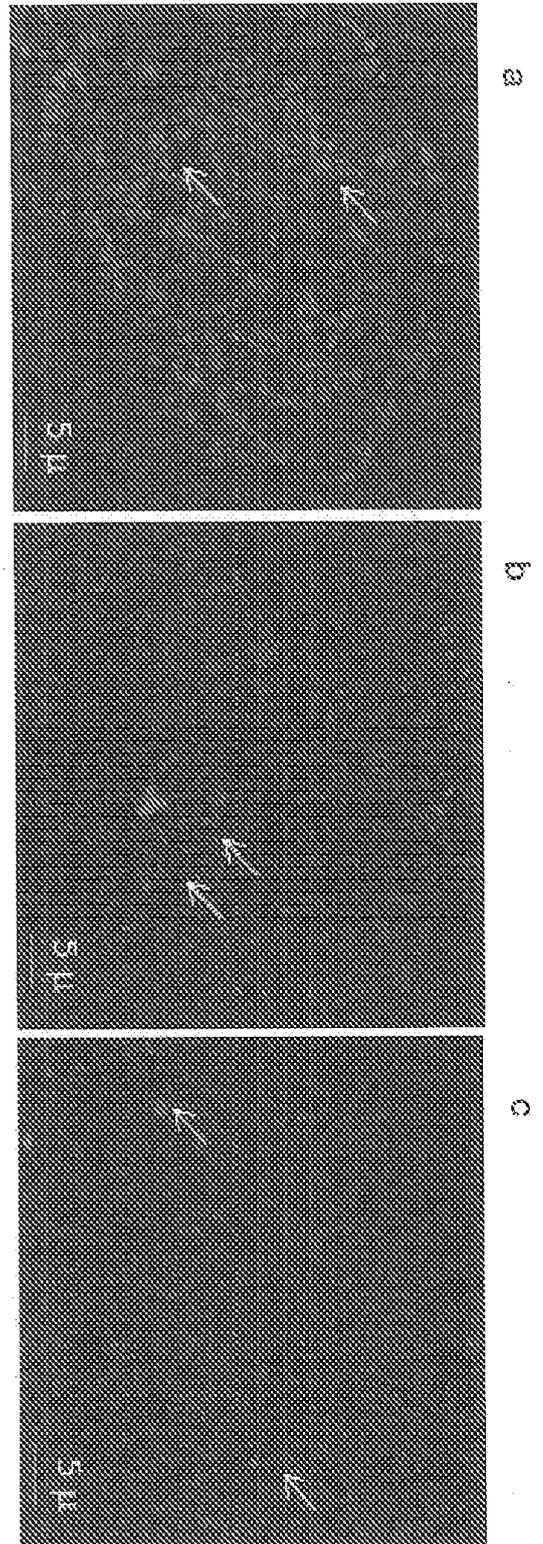


Fig. 19

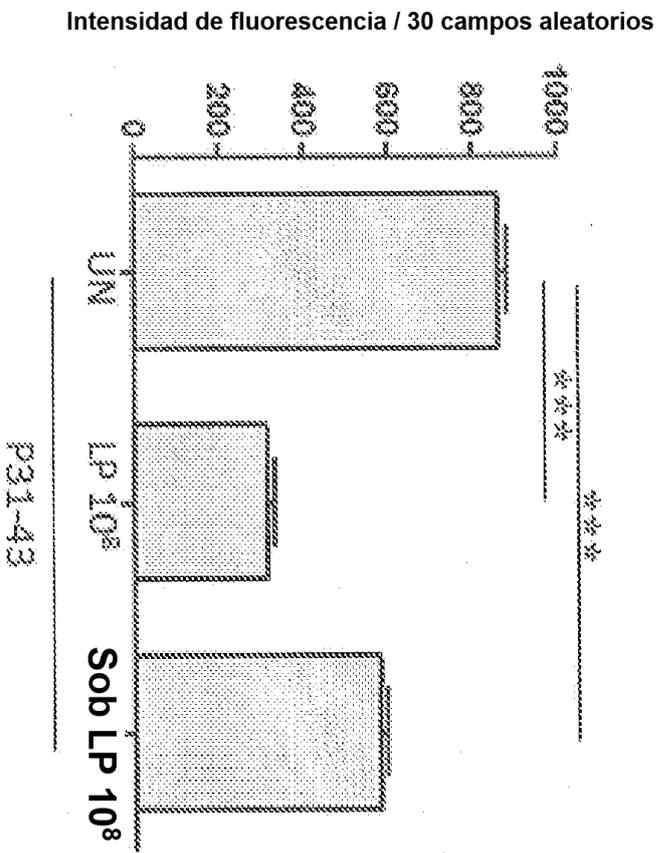


Fig. 20

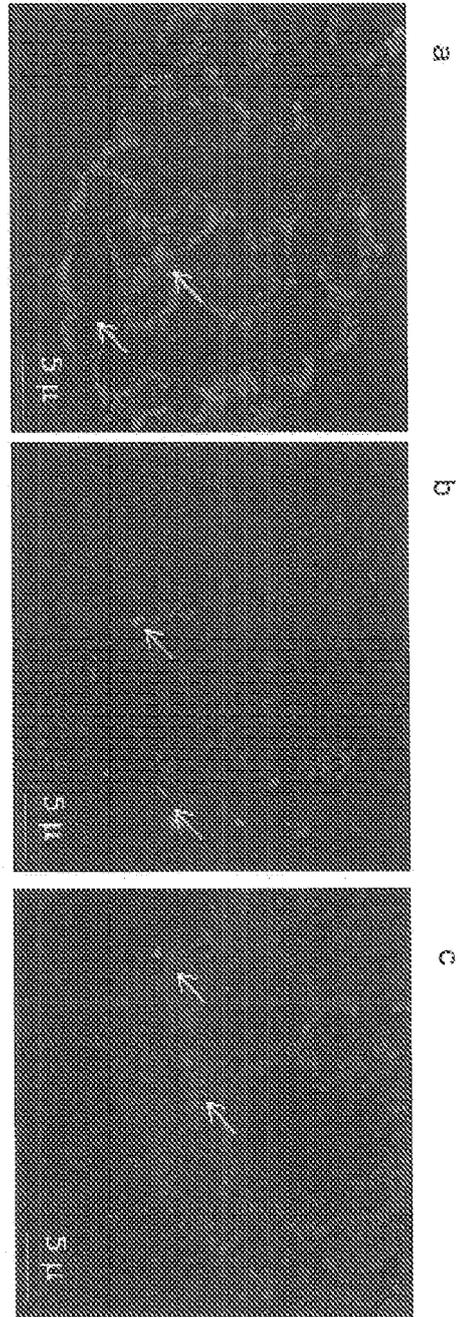


Fig. 21

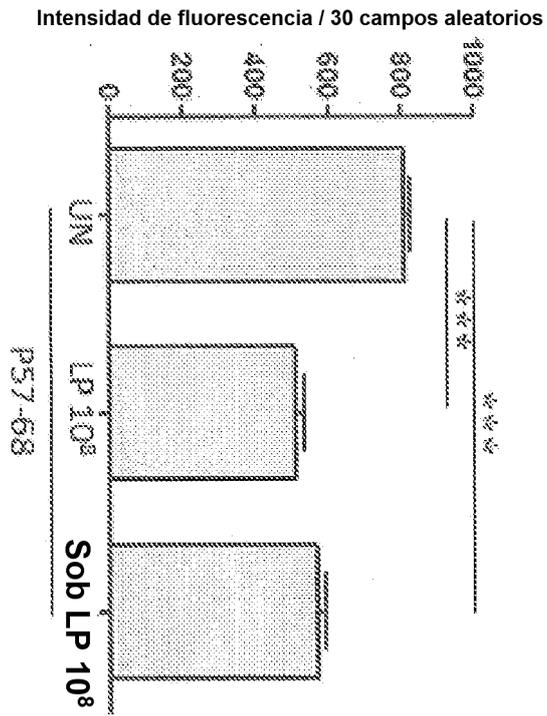


Fig. 22

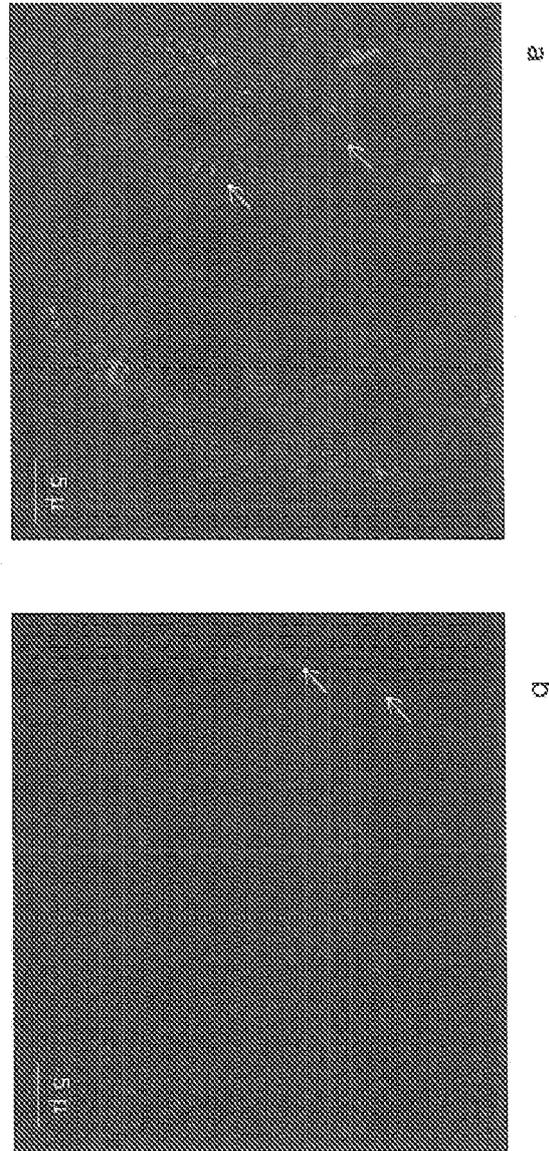


Fig. 23

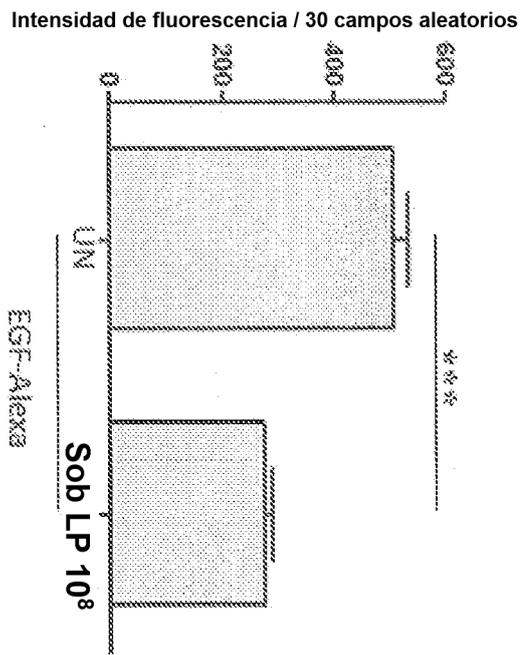


Fig. 24

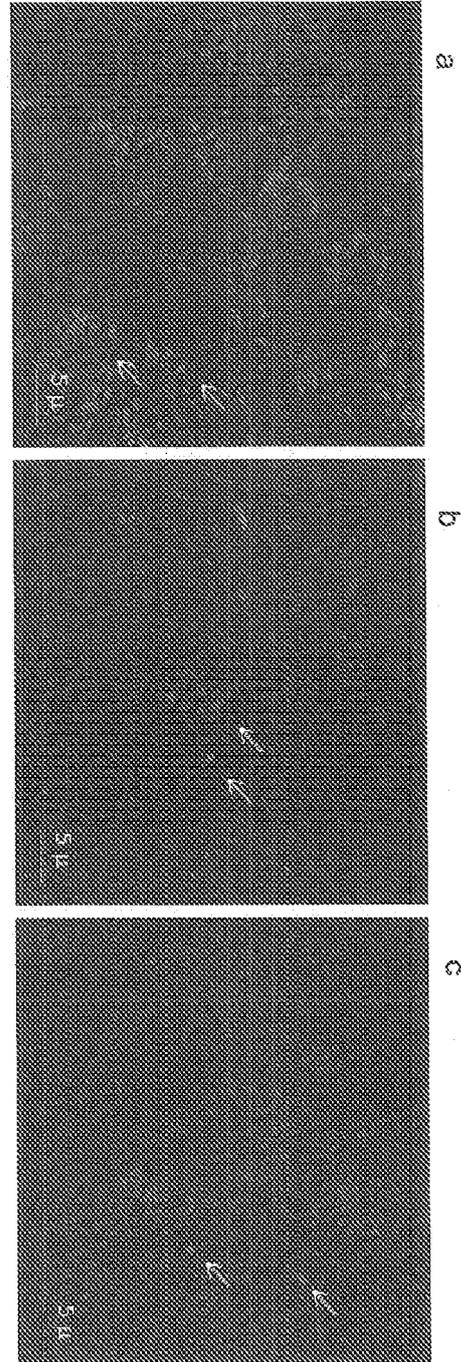


Fig. 25

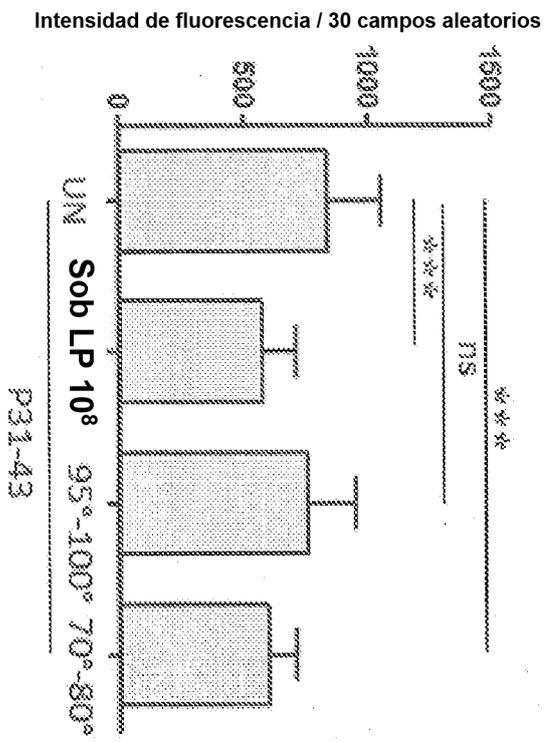


Fig. 26

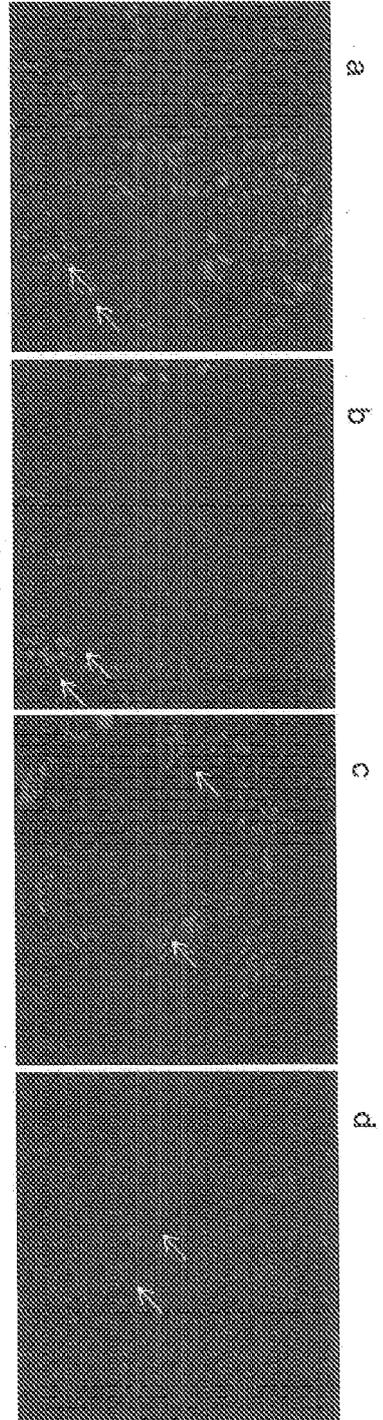


Fig. 27

