

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 649**

51 Int. Cl.:

C07K 14/335	(2006.01)	A61K 38/16	(2006.01)
A61K 31/045	(2006.01)	A61P 1/00	(2006.01)
A61K 31/19	(2006.01)	A61P 19/00	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01)	A61P 25/00	(2006.01)
A61K 31/401	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
A61K 31/4172	(2006.01)	A61P 29/02	(2006.01)
A61K 31/708	(2006.01)	A61P 37/00	(2006.01)
A61K 35/747	(2015.01)		
A23L 33/135	(2006.01)		
A23L 33/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2013** **E 21165677 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024** **EP 3901164**

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:
04.04.2025

73 Titular/es:

H.J. HEINZ COMPANY BRANDS LLC (100.00%)
One PPG Place, Suite 3100
Pittsburgh, Pennsylvania 15222, US

72 Inventor/es:

FASANO, FRANCESCA ROMANA y
BUDELLI, ANDREA LUIGI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 3 010 649 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

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a organismos probióticos y a composiciones que comprenden metabolitos producidos por organismos probióticos. Estas composiciones son útiles para el tratamiento de trastornos relacionados con el gluten, por ejemplo, la enfermedad celíaca.

10 **Antecedentes de la invención**

El gluten y los polipéptidos relacionados con el gluten se encuentran en muchos cereales, incluyendo el trigo, el centeno y la cebada. Para las personas con trastornos relacionados con el gluten, tales como la enfermedad celíaca y la sensibilidad al gluten, el consumo de alimentos que contienen gluten puede tener consecuencias graves y duraderas para la salud. La enfermedad celíaca es un trastorno autoinmune del intestino delgado que se desencadena por el consumo de gluten en personas genéticamente predispuestas. Determinados fragmentos de gluten ("gliadinas") estimulan una respuesta inmunitaria que daña permanentemente el intestino delgado e impide la absorción de nutrientes. La enfermedad celíaca puede presentarse con un amplio espectro de síntomas. Los más comunes incluyen diarrea crónica, distensión abdominal, pérdida de peso y retraso del desarrollo (en niños). La enfermedad celíaca también puede estar asociada con anemia por deficiencia de hierro, osteoporosis, baja estatura, artritis, infertilidad, neuropatía periférica e insuficiencia hepática. Los pacientes con enfermedad celíaca también tienen un riesgo incrementado de padecer determinados tipos de cáncer, tales como carcinomas del intestino delgado y linfoma no Hodgkin. Se estima que la incidencia de la enfermedad celíaca en las poblaciones de ascendencia europea es de entre el 0,5 y el 1,5 %. La incidencia está aumentando tanto en los EE.UU. y en Europa como en Asia, en parte debido a la adopción de patrones alimentarios occidentales. La enfermedad celíaca se diagnostica típicamente en la infancia o la niñez, aunque el número de diagnósticos realizados en la edad adulta también está aumentando. Actualmente no existe cura para la enfermedad celíaca y el tratamiento estándar es una restricción de por vida a una dieta libre de gluten.

La sensibilidad al gluten está menos caracterizada que la enfermedad celíaca. Se presenta con muchos de los mismos síntomas, pero no incluye el daño al intestino delgado. El diagnóstico tiende a realizarse sobre la base de criterios de exclusión y la mejoría de los síntomas una vez que el paciente comienza una dieta sin gluten.

La adherencia a una dieta libre de gluten requiere evitar estrictamente los productos derivados del trigo, el centeno y la cebada. Esto puede resultar complicado debido a la información a menudo insuficiente en las etiquetas sobre el contenido de gluten de los alimentos; la posibilidad de contaminación durante el procesamiento y la preparación de los alimentos, especialmente en el caso de los alimentos preparados fuera del hogar; la carga financiera de los productos libres de gluten y la fuerza de voluntad necesaria para una estricta adherencia. El cumplimiento también puede verse afectado por el acceso a la educación y el asesoramiento, el apoyo familiar y social y por factores psicológicos. Además, la estricta adherencia a una dieta libre de gluten puede dar lugar a deficiencias de micronutrientes. Deficiencias de este tipo, en particular de las vitaminas B (vitamina B6, vitamina B12 y ácido fólico) y de determinados oligoelementos, p. ej., hierro, zinc y cobre, pueden dar lugar a problemas de salud potencialmente importantes, particularmente en los niños. Existe una necesidad continua de agentes terapéuticos para el tratamiento de los trastornos relacionados con el gluten.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una composición para uso en la reducción de un síntoma de toxicidad del péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten, comprendiendo la composición un producto alimenticio fermentado, en donde el producto alimenticio es un producto lácteo o un producto de cereales, en donde el producto alimenticio fermentado ha sido fermentado por la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso de Depósito Internacional LMG P-24778, y el producto alimenticio fermentado reduce un síntoma de toxicidad del péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten al proporcionar una barrera incrementada a la translocación de un péptido de gliadina a través de una mucosa intestinal del sujeto.

En una realización de la composición para uso de acuerdo con la invención, se prevé que cualquier célula de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CBA L74 presente en la composición puede estar muerta o haberse vuelto incapaz de división celular. El producto alimenticio es un producto lácteo o un producto de cereales. El producto lácteo puede ser leche o un producto a base de leche. Se prevé que el producto de cereales puede ser arroz, trigo, avena, cebada, maíz, centeno, sorgo, mijo o triticale. En una realización, la composición para uso de acuerdo con la invención puede comprender, además, un soporte fisiológicamente aceptable. El soporte fisiológicamente aceptable puede ser un soporte farmacéutico. En una realización, la composición reduce la entrada celular de un péptido de gliadina. En una realización, el péptido de gliadina puede ser un péptido de α -gliadina. En una realización preferida, el péptido de α -gliadina puede tener una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste en LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 1); QLQPFPPQQLPY (SEQ ID NO: 2); LGQQQPFPPQQPYQPQPF (SEQ ID NO: 3); y LQLQPFPPQQLPYQPQQLPYQPQQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4). Se prevé que el trastorno relacionado con el gluten puede ser enfermedad celíaca o sensibilidad al gluten. En una realización de la composición para uso de acuerdo con la invención, el síntoma de toxicidad del péptido de gliadina puede comprender inflamación, una reacción autoinmune, un síntoma gastrointestinal, pérdida de peso, anemia, osteoporosis, artritis, infertilidad, neuropatía periférica o insuficiencia hepática.

También se proporcionan kits que comprenden una cantidad medida de una composición de acuerdo con la invención para uso en la reducción de un síntoma de toxicidad del péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten y uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en material de envasado, un prospecto que comprende instrucciones de uso, un fluido estéril, una jeringa y un recipiente estéril. En una realización del kit de la invención, la composición puede comprender, además, un soporte farmacéutico.

Breve Descripción De Los Dibujos

Estas y otras características y ventajas de la presente invención se describirán más completamente o se harán evidentes mediante la siguiente descripción detallada de la realización preferida de la invención, que se debe considerar junto con los dibujos adjuntos en los que los números iguales se refieren a partes iguales y en los que, además:

La Fig. 1 es un análisis del efecto de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células Caco2.

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.

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.

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.

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.

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.

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 dextrano 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.

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.

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.

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.

Las Figs. 18a, 18b, y 18c son un análisis del efecto 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.

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 *Lactobacillus 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.

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.

Las Figs. 22a y 22b son un análisis del efecto 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 del sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de EGF-Alexa 488 en células Caco2.

Las Figs. 24a, 24b y 24c son un análisis del efecto de eliminación 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 ha sido eliminado.

La Fig. 25 es un gráfico que representa los resultados de un análisis del efecto del tratamiento y luego de la eliminación del sobrenadante de *L. paracasei*, cepa CBA L74, sobre la entrada de P31-43^{liss} en células de Caco2.

Las Figs. 26a, 26b, 26c y 26d son un análisis del efecto del tratamiento térmico de 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 sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74. La Fig. 26c muestra células Caco2 tratadas con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que habían hervido. La Fig. 26d muestra células Caco2 tratadas con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que había sido calentado a 80 °C.

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 de Caco2.

Descripción Detallada De La Realización Preferida

Esta presente descripción de realizaciones preferidas pretende ser leída en relación con los dibujos adjuntos, que se deben considerar parte de la descripción escrita completa de esta invención. Las figuras de los dibujos no están necesariamente a escala y determinadas características de la invención pueden mostrarse exageradas en escala o en forma algo esquemática en beneficio de la claridad y la concisión. En la descripción, expresiones y términos relativos, tales como "horizontal", "vertical", "arriba", "abajo", "parte superior" y "parte inferior", así como derivados de los mismos (p. ej., "horizontalmente", "hacia abajo", "hacia arriba", etc.) deben interpretarse como que se refieren a la orientación tal como se describe entonces o como se muestra en la figura del dibujo en discusión. Estos términos y expresiones relativos son para conveniencia de la descripción y normalmente no pretenden requerir una orientación particular. Términos y expresiones que incluyen "hacia adentro" frente a "hacia afuera", "longitudinal" frente a "lateral" y similares deben interpretarse en relación entre sí o en relación con un eje de elongación, o un eje o centro de rotación, según corresponda. Términos relativos a uniones, acoplamientos y similares, tales como "conectado" e "interconectado", se refieren a una relación en la que las estructuras están aseguradas o unidas entre sí, ya sea directa o indirectamente, a través de estructuras intermedias, así como uniones o relaciones tanto móviles como rígidas, a menos que se describa expresamente lo contrario. La expresión "conectado operativamente" es una unión, acoplamiento o conexión que permite que las estructuras pertinentes funcionen de acuerdo con lo previsto en virtud de esa relación.

Cuando se ilustra una sola máquina, el término "máquina" también debe considerarse que incluye cualquier conjunto de máquinas que ejecuten de forma individual o conjunta un conjunto (o múltiples conjuntos) de instrucciones para realizar una o más de las metodologías comentadas en esta memoria. En las reivindicaciones, las cláusulas de medios-más-función, si se utilizan, pretenden cubrir las estructuras descritas, sugeridas o que se hacen evidentes mediante la descripción escrita o los dibujos para realizar la función mencionada, incluyendo no solo los equivalentes estructurales, sino también estructuras equivalentes.

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 determinados componentes del 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 α -gliadina en las células epiteliales intestinales humanas cultivadas. Además, la reducción en la entrada de péptidos también se observó en alimentos que habían sido fermentados por *L. paracasei* CBA L74. El efecto sobre la entrada de péptidos se observó incluso cuando los sobrenadantes de cultivo se trataron con calor. Por consiguiente, la invención presenta composiciones que pueden mitigar los efectos tóxicos de los péptidos de gliadina.

Las composiciones de la divulgación pueden incluir células de *Lactobacillus paracasei*, cepa CBA L74, metabolitos producidos por *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.

Lactobacillus paracasei, cepa CBA L74 fue aislada por los inventores y depositada bajo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento de Patentes el 9 de septiembre de 2008 en las Colecciones Coordinadas Belgas de Microorganismos (BCCM), Laboratorium voor Microbiologie (LMG), Ghent, Bélgica. El Número de Acceso otorgado por la Autoridad Internacional de Depósito es LMG P-24778. Para facilitar la lectura, no repetiremos la frase "Número de Acceso LMG P-24778" en cada ocasión. Debe entenderse que cuando nos referimos a *L. paracasei*, cepa CBA L74, nos referimos a la cepa depositada que tiene el Número de Acceso LMG P-24778.

Si bien los inventores creen que comprenden determinados eventos que ocurren tras la administración de composiciones que comprenden o que se elaboran por fermentación con *L. paracasei* CBA-L74 las composiciones de la presente invención no se limitan a aquellas que funcionan afectando a cualquier mecanismo celular en particular. La hipótesis de trabajo de los inventores es que las composiciones que comprenden *L. paracasei* CBA L74, sobrenadante de cultivos o fermentos de *L. paracasei* CBA L74 y metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 pueden proporcionar una mayor barrera a la translocación de gluten y polipéptidos relacionados con el gluten a través de la mucosa intestinal y, por lo tanto, moderar los efectos del gluten y los péptidos relacionados con el gluten en individuos que tienen un trastorno relacionado con el gluten, por ejemplo, enfermedad celíaca 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 a través de diferentes vías endocitóticas, p. ej., 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 tanto de dextrano, que se sabe que penetra en las células a través de macropinocitosis, como del factor de crecimiento epidérmico (EGF), que penetra en las células a través de endocitosis mediada por receptor. Los efectos beneficiosos de las composiciones descritas en esta memoria pueden derivar, por ejemplo, de metabolitos producidos durante la

fermentación, por ejemplo, ácidos orgánicos, tales como ácido láctico, ácido butírico o ácido acético. Alternativa o adicionalmente, los fragmentos de la pared celular bacteriana y otros componentes bacterianos subcelulares, tales como proteínas, hidratos de carbono, fragmentos de ácidos nucleicos y lípidos, pueden ejercer efectos sobre la respuesta celular al gluten y a los polipéptidos relacionados con el gluten.

Por consiguiente, la divulgación presenta composiciones que se pueden utilizar para proteger las células de los efectos potencialmente tóxicos del gluten y los péptidos relacionados con el gluten. Las composiciones pueden incluir medios en los que se ha cultivado *L. paracasei* CBA L74 o productos alimenticios, en donde los productos alimenticios son productos lácteos o productos de cereales, que han sido fermentados por *L. paracasei* CBA L74. En algunas realizaciones, los medios o productos alimenticios se pueden tratar, p. ej., mediante métodos físico-químicos tales como centrifugación, para eliminar todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74 que habían sido cultivadas en los medios o productos alimenticios. En algunas realizaciones, las composiciones pueden incluir *L. paracasei* CBA L74 aislado y un soporte fisiológico. El soporte puede ser un producto alimenticio, pero la invención no es tan limitante y en algunas realizaciones el soporte puede ser un soporte farmacológico.

También se proporcionan métodos para preparar y utilizar las composiciones. Los métodos de la invención incluyen métodos para producir composiciones que comprenden *L. paracasei* CBA L74, métodos para fermentar productos alimenticios, en donde los productos alimenticios son productos lácteos o productos de cereales, con *L. paracasei* CBA L74.

Composiciones

***L. paracasei* CBA L74**

Las composiciones de la invención pueden incluir el organismo probiótico, *L. paracasei* CBA L74. La Organización Mundial de la Salud ha definido a los probióticos como: "Microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped". En algunas realizaciones, el *L. paracasei* CBA L74 puede someterse a tratamientos que lo vuelven no replicante, por ejemplo, exposición al 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 dividirse. Un *L. paracasei* CBA L74 no replicante puede ser una célula intacta o una célula que ha sufrido 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, de los cuales se han extraído todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74. Métodos para separar células de los medios de crecimiento son bien conocidos en la técnica y pueden basarse en métodos físicos, por ejemplo, centrifugación para producir un sedimento celular y un sobrenadante de cultivo, filtración, ultrafiltración, filtración de flujo tangencial, filtración de flujo normal u ósmosis inversa. Alternativamente o además, el método de separación puede basarse en ligandos y puede incluir, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a *L. paracasei* CBA L74. El anticuerpo puede estar acoplado a un soporte sólido tal como una perla magnética.

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 estar codificado por uno o más genes o puede generarse por la actividad enzimática de uno o más productos génicos. Los metabolitos incluyen, por ejemplo, moléculas pequeñas, p. ej., aminoácidos, nucleósidos, nucleótidos, así como estructuras poliméricas más grandes, tales como polipéptidos, hidratos de carbono, ácidos nucleicos, proteoglicanos y lípidos. El metabolito puede ser un metabolito primario, p. ej., un metabolito directamente implicado en la función celular normal, o un metabolito secundario, p. ej., un metabolito que típicamente no se requiere para funciones celulares fundamentales. Un metabolito también puede incluir cualquier intermedio metabólico generado durante la síntesis de un metabolito primario o secundario. Los intermedios pueden incluir, pero no se limitan a intermedios de la vía de Embden-Meyerhof, la vía de la pentosa fosfato (pentosa-P), la vía de Entner- Doudoroff, el ciclo del citrato y la biosíntesis de aminoácidos.

Metabolitos primarios ejemplares incluyen, sin limitación, alcoholes, p. ej., etanol, metanol, butanol; aminoácidos, p. ej., lisina, arginina, ornitina, histidina, citrulina, isoleucina, alanina, valina, leucina, glicina, treonina, serina, pralina, fenilalanina, tirosina, triptófano, cisteína, cistina, metionina, ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina y asparagina; nucleótidos, p. ej., ácido 5' guanílico; antioxidantes, p. ej., ácido isosorbico; ácidos orgánicos, p. ej., ácido acético, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fórmico; vitaminas, p. ej., vitamina B12; azúcares, ácidos grasos, p. ej., ácidos grasos de cadena corta; poliaminas; péptidos, p. ej., bacteriocinas tal como un lantibiótico, p. ej., nisina, o un no lantibiótico, p. ej., enterocina, plantaricina W, plantaricina S.

Un metabolito también puede ser un metabolito secundario. Metabolitos secundarios son típicamente aquellos que no se requieren para las funciones celulares fundamentales. Metabolitos secundarios pueden variar ampliamente; metabolitos secundarios ejemplares incluyen antibióticos, hormonas, flavonoides, terpenoides,

alcaloides, fenilpropanoides, derivados de fenilo, derivados de hexanol, cumarinas, estilbenos, cianohidrinias, glucosinolatos, esteroides y saponinas.

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

El metabolito de *L. paracasei* CBA L74 puede estar contenido en medios, fermentos o sobrenadantes de cultivo. En algunas realizaciones, el metabolito puede ser aislado parcial o sustancialmente de los medios, fermentos o sobrenadantes de cultivo. Por lo tanto, el metabolito funcional, *es decir*, un metabolito que reduce la entrada celular de un péptido de gliadina, puede incluir o excluir cualquiera de los metabolitos arriba descritos. Métodos de aislamiento de metabolitos variarán de acuerdo con la estructura y la química del metabolito particular. Un metabolito aislado parcial o sustancialmente conservará la actividad funcional, *es decir*, la capacidad de reducir la entrada celular de péptidos de gliadina, de los medios, fermentos o sobrenadantes de cultivo. Por lo tanto, si un sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 puede reducir la entrada de péptidos de gliadina en las células, se espera que un metabolito aislado parcialmente o sustancialmente del sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 también reduzca la entrada de péptidos de gliadina en las células. Se pueden utilizar métodos conocidos en la técnica estándar para aislar y caracterizar metabolitos de *L. paracasei* CBA L74. Métodos ejemplares incluyen, por ejemplo, análisis de estabilidad, p. ej., estabilidad al calor, pH y/o actividad enzimática; análisis cromatográfico, p. ej., cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases, cromatografía de 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, conserva su actividad funcional, es decir, la capacidad de prevenir la entrada celular de péptidos de gliadina, después de la exposición a temperaturas fuera del intervalo fisiológico normal, p. ej., 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 esta memoria reducen la absorción celular de gluten y polipéptidos relacionados con el gluten. El gluten y los polipéptidos relacionados con el gluten son las principales proteínas de almacenamiento de los granos de cereales dietéticos. 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 gluten y proteínas relacionadas con el gluten. Además de sus propiedades nutricionales, el gluten desempeña un papel clave en la determinación de la calidad única de horneado del trigo al conferir capacidad de absorción de agua, cohesión, viscosidad y elasticidad a la masa. En realidad, el gluten es un complejo de dos fracciones de polipéptidos que se han clasificado en función de su solubilidad en alcoholes acuosos: las gliadinas solubles y las gluteninas insolubles. Ambas fracciones consisten en numerosos componentes proteicos relacionados que se caracterizan por un alto contenido de glutamina y pralina.

Las gliadinas son proteínas monoméricas con pesos moleculares (PM) de alrededor de 28.000-55.000 y puntos isoelectrónicos de aproximadamente pH 3,0-4,0. Existen cuatro clases de polipéptidos de gliadina: α -gliadina, β -gliadina, γ -gliadina y ω -gliadina. Se pueden encontrar secuencias de aminoácidos ejemplares para α -gliadina 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).

La glutenina es una proteína multimérica de mayor tamaño cuyo PM oscila entre aproximadamente 100.000 y más de 10.000.000, con un PM medio de aproximadamente 3.000.000. Los puntos isoelectrónicos de la glutenina oscilan entre aproximadamente 6,5-7,0. Tras la reducción de los enlaces disulfuro, las subunidades de glutenina resultantes muestran una solubilidad en alcoholes acuosos similar a la de las gliadinas. De acuerdo con la estructura primaria, las subunidades de glutenina se han dividido en subunidades de alto peso molecular (HMW) (PM = 67.000-88.000) y subunidades de bajo peso molecular (LMW) (PM = 32.000-35.000). Las gliadinas, gluteninas, hordeínas y secalinas tienen un alto contenido de prolina y glutamina. El alto contenido de pralina hace que estas proteínas sean resistentes a la digestión proteolítica completa por parte de las enzimas gástricas, pancreáticas y del borde en cepillo del intestino humano, ya que esas enzimas son deficientes en la actividad de prolil endopeptidasa. Esto puede dar lugar a la acumulación de fragmentos de péptidos relativamente grandes (tantos como 50 aminoácidos de longitud) con un alto contenido de pralina y glutamina en el intestino delgado.

Las secuencias de aminoácidos específicas para gliadina pueden variar, pero todas contienen epítomos de células T que desencadenan respuestas inmunitarias implicadas en la patogénesis de la enfermedad celíaca. Estas respuestas de células T específicas del gluten en el intestino delgado desempeñan un papel importante en la producción de la respuesta inflamatoria que, en última instancia, da como resultado la atrofia característica de las vellosidades intestinales y la hiperplasia de las criptas. Los péptidos de gluten nativos específicos pueden unirse a HLA-DQ2/8, los tipos de HLA más fuertemente asociados con la enfermedad celíaca. Esta unión de HLA induce

respuestas de células T CD4 de la lámina propia, que a su vez dañan la mucosa del intestino delgado. El daño tisular inicia la secreción de la enzima cicatrizante transglutaminasa tisular (tTG). Sin embargo, la tTG también desamida los péptidos del gluten. La desamidación convierte los residuos de glutamina neutrales en residuos de ácido glutámico con carga negativa. Estos péptidos desamidados tienen una afinidad de unión significativamente mayor para HLA-DQ2/8 con relación a los péptidos que no han sido desamidados. Este proceso conduce a una presentación antigénica potenciada de la gliadina. La unión de los péptidos desamidados activa aún más las células T auxiliares (Th1) CD4+ 1 específicas del gluten en la lámina propia, lo que a su vez aumenta la linfocitosis intraepitelial, la hiperplasia de las criptas, la producción de citoquinas que conducen a la atrofia de las vellosidades y la expansión de las células B que producen anticuerpos contra la gliadina y la tTG.

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

Los péptidos de gliadina P31-43 y P31-49 generalmente no son reconocidos por las células T. Estos péptidos inducen una respuesta inmune innata en la mucosa celíaca. El péptido P31-43 retrasa la maduración de las vesículas endocíticas y, en consecuencia, reduce la degradación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y prolonga la activación del EGFR. Se ha demostrado que la activación prolongada del EGFR induce una mayor proliferación celular y modificaciones de la actina tanto en los enterocitos de las criptas celíacas como en las líneas celulares cultivadas. Al ingresar en los enterocitos intestinales o en la línea celular intestinal humana, Caco2, P31-43 interactúa con las vesículas endocíticas tempranas, reduce su motilidad y retrasa su maduración a endosomas tardíos.

En el proceso de la enfermedad celíaca intervienen diferentes péptidos del gluten. Existen dos grupos de péptidos biológicamente activos que se derivan de la 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 enfermedad celíaca. La actividad de los péptidos que contienen serina está relacionada con la presencia de motivos PSQQ y QQQP. Los péptidos que contienen tirosina, p. ej., QQPY y/o QPYP, están asociados con la actividad inmunológica.

Los péptidos de gliadina pueden variar ampliamente en cuanto a la secuencia. Un polipéptido que tiene una secuencia que es idéntica a una parte de una secuencia de gliadina y que funciona (p. ej., para uno o más de los fines descritos en esta memoria) es un péptido de gliadina. Una gliadina de longitud completa incluye una secuencia de péptido de gliadina y uno o más de los péptidos descritos en esta memoria pueden encontrarse parcial o totalmente dentro de la secuencia de gliadina. Un péptido que tiene una secuencia que difiere en cierta medida limitada de una secuencia que se encuentra en una gliadina que se produce de forma natural y que conserva la capacidad de funcionar (p. ej., conserva suficiente actividad para conferir toxicidad al péptido de gliadina) es una variante biológicamente activa de un péptido de gliadina. Los autores de la invención tienden a utilizar los términos "gliadina" para referirse a proteínas de gliadina de longitud completa, que se producen de forma natural, y tienden a utilizar los términos "polipéptido" y "péptido" cuando se refieren a fragmentos de las mismas (es decir, a fragmentos de gliadina) y variantes biológicamente activas de las mismas. Debido a que los polipéptidos o péptidos pueden tener una secuencia idéntica a una secuencia que se encuentra en la gliadina, los polipéptidos o péptidos se derivan de fragmentos de gliadina.

Si bien las secuencias de los presentes polipéptidos pueden variar, polipéptidos útiles pueden incluir fragmentos de SEQ ID NOs: 7-10. Los polipéptidos pueden incluir o consistir en una secuencia de aminoácidos de una gliadina que se expresa de forma natural en una célula vegetal. Una variante biológicamente activa puede incluir, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que difiere de un fragmento de tipo salvaje de una gliadina en virtud de que contiene una o más sustituciones de aminoácidos conservativas. En algunas realizaciones, al menos el 50 % de los residuos de aminoácidos de la variante son idénticos a los residuos del fragmento de tipo salvaje correspondiente de una gliadina. Variantes biológicamente activas también pueden incluir secuencias de aminoácidos que difieren de un fragmento de tipo salvaje de una gliadina en virtud de sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos no conservativas.

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

Los polipéptidos que son variantes biológicamente activas de agliadina se pueden caracterizar en términos del grado en 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 un 60 % idéntica a los residuos correspondientes en una gliadina de tipo salvaje. Por ejemplo, una variante biológicamente activa de un polipéptido de gliadina puede tener una secuencia de aminoácidos con al menos o aproximadamente 60 % de identidad de secuencia (p. ej., al menos o aproximadamente 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia) con una gliadina (p. ej., con la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 7-10 o con otro polipéptido como se describe en esta memoria (p. ej., un polipéptido representado, por ejemplo, por SEQ ID NOs:1-6) o con un homólogo u ortólogo del mismo).

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

Péptidos de α -gliadina ejemplares que juegan un papel en la enfermedad celíaca incluyen P31-43, LGQQQFPFPQPY, (SEQ ID NO: 1); P31-49 LGQQQFPFPQYPQPQPF (SEQ ID NO: 3); P44-55; PQQPFPSQLP (SEQ ID NO: 5); P57-68 QLQFPQPQLPY (SEQ ID NO: 2); P56-88, LQLQFPQPQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4); y P63-76 QPQLPYQPQLPY (SEQ ID NO.: 6).

Productos alimenticios

Las composiciones de la invención pueden incluir un soporte fisiológicamente aceptable. El soporte fisiológico puede ser un producto alimenticio o un soporte farmacéutico. Los autores de la invención utilizan las expresiones "fisiológicamente aceptable" (o "farmacológicamente aceptable") para referirse a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal o un ser humano, según corresponda. Por lo tanto, las composiciones de la invención incluyen productos alimenticios fermentados por el organismo probiótico, *L. paracasei* CBA L74. El producto alimenticio puede incluir células de *L. paracasei* CBA L74, ya sean vivas o no replicantes. En algunas realizaciones, el producto alimenticio puede procesarse para eliminar todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74. Se puede utilizar cualquier producto alimenticio, en donde el producto alimenticio sea un producto lácteo o un producto de cereales, susceptible de fermentación por *L. paracasei* CBA L74.

El producto alimenticio puede ser un producto lácteo, por ejemplo, leche o un producto a base de leche. Fuentes de leche ejemplares incluyen, sin limitación, ganado vacuno, ovejas, cabras, yaks, búfalos de agua, caballos, burros, renos y camellos. Independientemente de la fuente, la leche o los productos lácteos pueden estar en cualquier forma adecuada para la fermentación por *L. paracasei* CBA L74. Por ejemplo, la leche puede ser leche entera o leche que ha sido procesada para eliminar parte o la totalidad de la grasa de la mantequilla, p. ej., leche al 2 %, leche al 1 % o leche desnatada. Alternativamente o además, la leche puede pasteurizarse previamente y/o homogeneizarse, secarse y reconstituirse, condensarse o evaporarse. También se pueden utilizar fracciones de productos lácteos que incluyen caseína, proteína de suero o lactosa. En algunas realizaciones, el producto lácteo puede ser de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 % de leche desnatada en polvo reconstituida, por ejemplo, aproximadamente 2 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 % de leche desnatada en polvo reconstituida. Antes de la fermentación, el producto lácteo se puede combinar con uno o más de los siguientes: a) un hidrato de carbono (p. ej., un disacárido tal como dextrosa o un almidón; b) un lípido; c) una vitamina y d) un mineral. Por ejemplo, la leche desnatada en polvo se puede combinar con dextrosa hasta aproximadamente 2 %, p. ej., 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 cereales, por ejemplo, arroz, avena, maíz, sorgo o mijo. En algunas realizaciones, el producto de cereales puede ser trigo, cebada, centeno o triticale. El producto de cereales puede ser un grano entero o puede molerse para formar una harina. El producto alimenticio puede ser un solo tipo de cereal o una mezcla de dos o más tipos de cereales, p. ej., harina de avena más harina de arroz. Los productos de cereales pueden ser de una calidad y tipo adecuados para el consumo humano o pueden ser productos adecuados para el consumo por parte de animales domésticos. Generalmente, el producto de cereales se hidrata antes de la fermentación. La concentración de los cereales puede variar, pero intervalos útiles incluyen de aproximadamente el 5 % hasta aproximadamente el 50 % peso/volumen, por ejemplo, aproximadamente el 8 %

peso/volumen, aproximadamente el 10 % peso/volumen, aproximadamente el 12 % peso/volumen, aproximadamente el 15 % peso/volumen, aproximadamente el 18 % peso/volumen, aproximadamente el 20 % peso/volumen, aproximadamente el 22 % peso/volumen, aproximadamente el 25 % peso/volumen, aproximadamente el 30 % peso/volumen, aproximadamente el 35 % peso/volumen, aproximadamente el 40 % peso/volumen, aproximadamente el 45 % peso/volumen o aproximadamente el 50 % peso/volumen. Concentraciones ejemplares incluyen el 15 % peso/volumen de arroz o una mezcla de 18,5 % peso/volumen de harina de avena más 5 % peso/volumen de harina de cebada malteada. El pH de los cereales hidratados se puede ajustar utilizando cualquier ácido adecuado para el consumo. El ácido puede ser, por ejemplo, un ácido orgánico. Ácidos orgánicos útiles incluyen ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido adipico, ácido málico y ácido tartárico. Se puede utilizar cualquier combinación de dos o más ácidos. En algunas realizaciones, el pH se puede ajustar a aproximadamente 4,0 utilizando ácido cítrico.

Independientemente del tipo de producto alimenticio que se utilice, el producto se combina con *L. paracasei* CBA L74 y se incuba a una temperatura y durante un tiempo suficientes para que se produzca la fermentación. Se puede utilizar cualquier método de fermentación estándar conocido en la técnica. Las condiciones de fermentación específicas variarán de acuerdo con muchos factores, incluyendo, por ejemplo, el tipo de producto alimenticio, la concentración del producto alimenticio, la instrumentación que se utilice, el volumen de la muestra, la concentración inicial del inóculo de *L. paracasei* CBA L74, la presencia, si la hubiera, de un co-inóculo, las propiedades organolépticas del alimento fermentado y el uso pretendido del alimento fermentado.

Tanto el instrumental como el sustrato (es decir, el producto alimenticio que se ha de fermentar) se esterilizan antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74 con el fin de disminuir o eliminar el nivel de bacterias viables y/u hongos y/o virus infecciosos. El instrumental se puede esterilizar utilizando métodos estándares o de acuerdo con 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 con vapor de agua y presión, p. ej., mediante autoclave, ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento (p. ej., tinalización), exposición a altas presiones (p. ej., pascalización), ultrafiltración o radiación (p. ej., exposición a rayos gamma, rayos X, rayos e y/o ultravioleta (longitud de onda de 10 nm a 320 nm, p. ej., 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). Se pueden retirar partes alícuotas del sustrato después del tratamiento y sembrarlas en medios adecuados para confirmar la ausencia de contaminantes bacterianos y/o fúngicos. Si el sustrato se ha esterilizado mediante exposición a altas temperaturas, se debe enfriar a al menos 37 °C antes de la inoculación con *L. paracasei* CBA L74.

El sustrato se puede inocular con *L. paracasei* CBA L74 de acuerdo con métodos estándares, por ejemplo, a partir de un cultivo líquido de reciente aportación o un cultivo liofilizado que ha sido resuspendido en un medio acuoso durante un corto tiempo antes de la inoculación. En general, *L. paracasei* CBA L74 se añade en concentraciones de aproximadamente $0,5 \times 10^6$ a aproximadamente 1×10^6 ufc/ml de sustrato, p. ej., 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 agitarse lo suficiente para producir una distribución relativamente uniforme de bacterias y sustrato, pero no excesivamente, ya que *L. paracasei* CBA L74 es una bacteria anaerobia. Por ejemplo, un cultivo de cinco litros puede agitarse a aproximadamente 150 rpm. La temperatura de fermentación es generalmente de 37 °C. Diversos parámetros, por ejemplo, el pH, la presión parcial de O₂, la velocidad del agitador, la temperatura, la mezcladura de gases, el nivel de espuma y la concentración de sustrato se pueden monitorizar durante la fermentación y ajustar en consecuencia. El crecimiento de *L. paracasei* CBA L74 se puede monitorizar utilizando métodos microbiológicos estándares. La fermentación se lleva a cabo hasta que la concentración de *L. paracasei* CBA L74 esté entre aproximadamente 10^8 /ml y aproximadamente 10^9 /ml. Dependiendo del sustrato y otras condiciones, esta concentración puede alcanzarse entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 horas después de la inoculación, p. ej., aproximadamente 12 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas.

Se pueden analizar muestras del sustrato antes, durante y después de la fermentación para garantizar la calidad utilizando métodos microbiológicos estándares. Algunos métodos ejemplares incluyen, pero no se limitan al crecimiento en agar Rogosa para *L. paracasei* CBA L74, el crecimiento en agar de recuento en placa (PCA, por sus siglas en inglés) para aerobios totales, el crecimiento en agar McConkay para coliformes y el crecimiento en agar clostridial reforzado (RCM, por sus siglas en inglés) para clostridios. Además de los recuentos de colonias, se pueden observar las morfologías de las colonias y compararlas 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. Co-inóculos útiles para la fermentación de productos lácteos incluyen, por ejemplo, sin limitación, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus delbrueckii*, subsp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, o *Leuconostoc mesenteroides*. En general, la concentración del co-inóculo será menor que la de *L. paracasei* CBA L74, por ejemplo, aproximadamente 1×10^4 /ml $\times 10^5$ /ml. La concentración final de *S. thermophilus* puede variar de aproximadamente $0,5 \times 10^8$ /ml a aproximadamente $2,5 \times 10^8$ /ml.

Una vez que se han alcanzado las concentraciones adecuadas de *L. paracasei* CBA L74, el alimento fermentado puede procesarse adicionalmente para su uso. En algunas realizaciones, el alimento fermentado puede fraccionarse para eliminar todas o sustancialmente todas las células de *L. paracasei* CBA L74. En algunas realizaciones, el pH del alimento fermentado puede ajustarse, por ejemplo, de aproximadamente 3,0 a cerca de la neutralidad, p. ej., 6,5, con la adición de NaOH o KOH. En algunas realizaciones, el alimento fermentado puede secarse. El producto alimenticio fermentado puede secarse mediante cualquier método conocido en la técnica que dé como resultado la retención de las propiedades inmunomoduladoras del alimento fermentado. Métodos de secado ejemplares incluyen secado por pulverización, secado por congelación, p. ej., 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 hacer que *L. paracasei* CBA L74 no se replique.

Los alimentos fermentados secos se pueden hidratar antes de su uso. Dependiendo de la cantidad de líquido utilizado en la hidratación, los productos alimenticios fermentados pueden contener el equivalente a 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. La *L. paracasei* CBA L74 seca no forma colonias, por lo que se entiende que esta cantidad se calcula en función del 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 10^7 a aproximadamente 10^{12} ufc/g, p. ej., aproximadamente 5×10^7 ufc/g, aproximadamente 1×10^8 ufc/g, aproximadamente 5×10^8 ufc/g, aproximadamente 1×10^9 ufc/g, aproximadamente 5×10^9 ufc/g, aproximadamente 1×10^{10} ufc/g, aproximadamente 5×10^{10} ufc/g, aproximadamente 1×10^{11} ufc/g, aproximadamente 5×10^{11} ufc/g de peso seco.

Dos o más productos alimenticios fermentados preparados por los métodos de la invención pueden combinarse antes de la administración. Por ejemplo, los productos lácteos fermentados pueden combinarse con productos de cereales fermentados. Alternativamente, el producto alimenticio fermentado puede combinarse con otros productos alimenticios, por ejemplo, productos alimenticios no fermentados o productos alimenticios fermentados utilizando otras cepas bacterianas. Se puede utilizar cualquier combinación siempre que se conserven los efectos sobre los péptidos de gliadina del alimento fermentado. Productos alimenticios ejemplares incluyen, sin limitación, productos lácteos, p. ej., leche, yogur, cuajada, queso y productos a base de queso, leches fermentadas, productos fermentados a base de leche, polvos a base de leche, fórmulas infantiles, alimentos infantiles colados a base de leche, helado, gelato, pudines, sopas, salsas, purés o aderezos, fórmulas nutricionales para ancianos; productos de cereales, p. ej., papilla, alimentos infantiles colados a base de cereales, avena, harina, sémola, polenta, pasta, galletas, galletas saladas o barritas energéticas.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones descritas en esta memoria pueden combinarse con un soporte farmacéuticamente aceptable. La expresión "soporte farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en esta memoria, incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos, isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, excipientes, aglutinantes, lubricantes, geles, tensioactivos y similares que pueden utilizarse como medios para una sustancia farmacéuticamente aceptable.

Por lo tanto, la divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 descritos en esta memoria, en combinación con uno o más soportes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, *L. paracasei* CBA L74 se puede esterilizar utilizando técnicas de esterilización convencionales antes o después de que se combine con el soporte farmacéuticamente aceptable. Al preparar las composiciones de la invención, *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, se mezclan típicamente con un excipiente, se diluyen con un excipiente o se encierran dentro de un soporte de este tipo en forma de, por ejemplo, una cápsula, un comprimido, sobre, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido (p. ej., solución salina normal), que actúa como un vehículo, soporte o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un medio sólido o líquido), ungüentos, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Como se conoce en la técnica, el tipo de diluyente puede variar dependiendo de la vía de administración pretendida. Las composiciones resultantes pueden incluir agentes adicionales, tales como conservantes. El excipiente o soporte se selecciona en función del modo y la vía de administración. Soportes farmacéuticos adecuados, así como las necesidades farmacéuticas para su uso en formulaciones farmacéuticas, se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (E.W. Martin), un texto de referencia muy conocido en este campo, y en la USP/NF (United States Pharmacopeia and the National Formulary). Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes

conservantes tales como metil- y propilhidroxi -benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente, empleando procedimientos conocidos en la técnica.

Composiciones farmacéuticamente aceptables para uso en los presentes métodos, incluyendo aquellas en las que *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, están atrapados en un coloide para administración oral, se pueden preparar de acuerdo con técnicas estándares. *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, se pueden secar y compactar moliendo o pulverizando y se pueden insertar en una cápsula para administración oral. En algunas realizaciones, *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, se pueden combinar con uno o más excipientes, por ejemplo, un desintegrante, una carga, un deslizante o un conservante. Cápsulas adecuadas incluyen tanto cápsulas de cubierta dura como cápsulas de cubierta blanda. Se puede utilizar cualquier coloide basado en lípidos o en polímeros para formar la cápsula. Polímeros ejemplares útiles para preparaciones coloidales incluyen gelatina, polisacáridos vegetales o sus derivados, tales como carragenanos y formas modificadas de almidón y celulosa, p. ej., hipromelosa. Opcionalmente, se pueden añadir otros ingredientes a la solución de agente gelificante, por ejemplo, plastificantes tales como glicerol y/o sorbitol para disminuir la dureza de la cápsula, agentes colorantes, conservantes, desintegrantes, lubricantes y tratamiento de superficie. En algunas realizaciones, la cápsula no incluye gelatina. En otras realizaciones, la cápsula no incluye polisacáridos vegetales o sus derivados.

Independientemente de su fuente original o de la manera en que se obtengan, *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, se pueden formular de acuerdo con su uso. Estas composiciones se pueden preparar de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica, y se pueden administrar por una diversidad de vías, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser oral o tópica (incluyendo la administración oftálmica y en las membranas mucosas, incluyendo la administración intranasal, vaginal y rectal). En algunas realizaciones, la administración puede ser pulmonar (p. ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica) u ocular. Métodos para la administración ocular pueden incluir la administración tópica (gotas para los ojos), inyección subconjuntival, periocular o intravítrea o introducción mediante catéter con balón o inserciones oftálmicas colocadas quirúrgicamente en el saco conjuntival. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, p. ej., administración intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en forma de una dosis única en bolo, o puede ser, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión continua. Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos, polvos y similares. Pueden ser necesarios o deseables los soportes farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares.

Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 2000 mg de *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, por dosis diaria. En algunas realizaciones, las composiciones pueden contener el equivalente a 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. La expresión "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada una de las unidades 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 ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo se dispersa típicamente de manera uniforme por toda la composición, de modo que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente efectivas tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide luego en formas de dosificación unitarias del tipo arriba descrito que contienen, por ejemplo, de 0,005 mg a aproximadamente 1000 mg de *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74, de la presente invención.

Las composiciones se pueden formular en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada una de las dosificaciones, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,2 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,3 mg a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 0,4 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1 mg; de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,5 mg

a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 10 mg; de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo.

Los comprimidos o píldoras pueden estar recubiertos o mezclados de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o la píldora pueden comprender una dosificación interna y un componente de dosificación externa, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Se puede utilizar una diversidad de materiales para capas o recubrimientos entéricos de este tipo, incluyendo materiales de este tipo un cierto número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que se pueden incorporar las composiciones para administración por vía oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas 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 un cierto número de factores, entre los que se incluyen la dosificación, las características químicas (p. ej., la hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, *L. paracasei* CBA L74 o uno o más metabolitos producidos por *L. paracasei* CBA L74 de la invención se pueden proporcionar en una cápsula que contiene de aproximadamente 0,005 mg/gramo a aproximadamente 1000 mg para administración oral.

Usos médicos

Trastornos relacionados con el gluten

Las composiciones descritas en esta memoria son útiles en general y de diversas maneras para el tratamiento de trastornos relacionados con el gluten. Los sujetos para los que un tratamiento de este tipo es beneficioso incluyen los que experimentan o corren el riesgo de sufrir efectos tóxicos tras la ingestión de gluten y polipéptidos relacionados con el gluten. Efectos tóxicos de este tipo pueden abarcar un amplio espectro de síntomas que incluyen, pero no se limitan a inflamación, reacciones autoinmunes, síntomas gastrointestinales, tales como diarrea, esteatorrea, distensión abdominal, pérdida de peso, anemia, osteoporosis, artritis, infertilidad, neuropatía periférica, insuficiencia hepática y depresión. La toxicidad del péptido de gliadina puede proceder de mecanismos citotóxicos o inmunológicos o de una combinación de mecanismos citotóxicos e inmunológicos. Un síntoma de toxicidad del péptido de gliadina puede incluir inflamación, reacciones autoinmunes, 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 la enfermedad celíaca, incluyendo los diversos subtipos, p. ej., la enfermedad celíaca clásica, la enfermedad celíaca atípica, la enfermedad celíaca latente y la enfermedad celíaca silenciosa, la dermatitis herpetiforme, la ataxia por gluten y la sensibilidad al gluten.

Los subtipos de enfermedad celíaca incluyen la enfermedad celíaca clásica, la enfermedad celíaca atípica, la enfermedad celíaca latente y la enfermedad celíaca asintomática. Los síntomas clásicos asociados con la enfermedad celíaca son diarrea, distensión abdominal y retraso del crecimiento. Estos síntomas se observan con mayor frecuencia en niños entre 6 y 24 meses de edad. La enfermedad celíaca atípica se caracteriza por síntomas gastrointestinales más leves. Se asocia con manifestaciones extra-intestinales, tales como anemia ferropénica, osteoporosis, baja estatura, artritis, infertilidad, neuropatía periférica, hipertransaminasemia y, en algunos casos, insuficiencia hepática en el momento del diagnóstico. La enfermedad celíaca latente se aplica a pacientes que son portadores de HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8, con o sin serología positiva, y que aún no han desarrollado atrofia de las vellosidades, pero pueden tener inflamación leve o activación inmunitaria. Los pacientes de este subconjunto pueden ser asintomáticos o pueden tener manifestaciones extra-intestinales. La enfermedad celíaca asintomática se caracteriza por serología positiva y atrofia de las vellosidades en un paciente por lo demás asintomático. Tras seguir una dieta sin gluten, algunos pacientes asintomáticos notarán una mejoría en diferentes aspectos físicos y psicológicos de su vida, tales como una mejoría del apetito, una reducción de la fatiga o menos anomalías del comportamiento. Independientemente del subtipo, muchos casos de enfermedad celíaca no se diagnostican, lo que expone a los pacientes al riesgo de complicaciones a largo plazo, por ejemplo, infertilidad y neoplasias malignas, p. ej., linfoma y carcinoma intestinal.

La presentación de la enfermedad celíaca puede variar ampliamente. La enfermedad celíaca se presenta típicamente en niños como una enfermedad de retraso del crecimiento asociada con síntomas clásicos de

malabsorción: predominantemente pérdida de peso, esteatorrea y deficiencias múltiples, aunque pueden estar presentes otros síntomas extra-intestinales, por ejemplo, retraso del desarrollo de la altura axial y retraso de la menarquia en las niñas.

- 5 La prevalencia de la enfermedad celíaca aumenta en condiciones de riesgo, tales como antecedentes familiares de enfermedad celíaca, enfermedades autoinmunes, deficiencia de IgA, algunos síndromes genéticos (síndrome de Down, síndrome de Turner y síndromes de William) y, especialmente, diabetes tipo 1 y tiroiditis.

10 La predisposición genética desempeña un papel importante en la enfermedad celíaca. La enfermedad celíaca está fuertemente asociada con genes específicos del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II, HLA-DQ2 y HLA-DQ8, ubicados en el cromosoma 6p21. La mayoría de los pacientes con enfermedad celíaca (aproximadamente el 95 %) expresan genes que codifican la proteína HLA-DQ2 de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). Los pacientes restantes son habitualmente HLA-DQ8-positivos. El haplotipo HLA-DQ2 es común y lo portan aproximadamente el 30 % de los individuos caucásicos, lo que implica que la presencia de HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 es necesaria para el desarrollo de la enfermedad, pero no suficiente por sí sola, ya que su efecto de riesgo estimado es solo del 36 % al 53 %. Los genes no HLA también contribuyen a la predisposición a la enfermedad celíaca.

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

30 La dermatitis herpetiforme es una manifestación cutánea de la enfermedad celíaca que se presenta con una erupción ampollosa y depósitos cutáneos patognomónicos de IgA. Los síntomas predominantes son picazón y ardor intensos. La erupción tiene una distribución simétrica característica. Los codos y los antebrazos superiores se ven afectados en más del 90 % de los pacientes. Otros sitios comúnmente afectados son las nalgas, las rodillas, los hombros, el sacro, la cara, el cuero cabelludo, el cuello y el tronco. La atrofia vellosa de tipo celíaco en la mucosa del intestino delgado superior se encuentra en el 65 % al 75 % de los pacientes con dermatitis herpetiforme. Incluso en pacientes con biopsias aparentemente normales, los cambios sutiles en la mucosa, tales como un aumento del número de linfocitos intraepiteliales, indican sensibilización al gluten. Los pacientes con dermatitis herpetiforme pueden mostrar la misma variedad de manifestaciones, trastornos asociados y complicaciones que los pacientes con enfermedad celíaca (enfermedades autoinmunes, anemia ferropénica, osteoporosis y neoplasias malignas). Los pacientes con dermatitis herpetiforme generalmente siguen una dieta sin gluten porque la erupción de la dermatitis herpetiforme es sensible al gluten.

40 La ataxia por gluten se ha definido como una ataxia esporádica idiopática con marcadores serológicos positivos para la sensibilización al gluten. Al igual que la enfermedad celíaca, es una enfermedad autoinmune caracterizada por daño al cerebelo que resulta en ataxia. Los pacientes con ataxia por gluten tienen típicamente títulos altos de anticuerpos anti-gliadina. Se ha encontrado un depósito generalizado de anticuerpos transglutaminasa alrededor de los vasos cerebrales en pacientes con ataxia por gluten. La ataxia por gluten se presenta habitualmente con ataxia cerebelosa pura o, raramente, ataxia en combinación con mioclonía, temblor palatino o mioclonía opsoclono. La ataxia por gluten tiene habitualmente un inicio insidioso con una edad media de inicio 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 se someten típicamente a una dieta estricta libre de gluten con un seguimiento regular.

50 La sensibilidad al gluten, a la que también se alude como sensibilidad al gluten no celíaca o intolerancia al gluten, se caracteriza generalmente como un trastorno funcional, morfológico e inmunológico que carece de todas las características de la enfermedad celíaca, pero que, no obstante, responde a la exclusión del gluten. La sensibilidad al gluten es distinta de la enfermedad celíaca y no va acompañada de autoanticuerpos anti-tTG ni de otras comorbilidades autoinmunes. El intestino delgado de los pacientes con sensibilidad al gluten es típicamente normal. Los síntomas de la sensibilidad al gluten pueden parecerse a los asociados con la enfermedad celíaca, pero con una prevalencia de síntomas extra-intestinales, 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. Por lo general, el diagnóstico se basa en criterios de exclusión; una dieta de eliminación de alimentos que contienen gluten, seguida de una provocación abierta se utiliza con mayor frecuencia para evaluar si la salud mejora con la eliminación o reducción del gluten de la dieta del paciente.

Composiciones para uso en métodos de tratamiento

Un sujeto es tratado de manera eficaz siempre que se produzca un resultado clínicamente beneficioso. Esto puede significar, por ejemplo, una resolución completa de los síntomas asociados con un trastorno relacionado con el gluten, una disminución en la gravedad de los síntomas asociados con un trastorno relacionado con el gluten o una ralentización de la progresión de los síntomas asociados con un trastorno relacionado con el gluten. Estos métodos pueden incluir, además, las etapas de a) identificar a un sujeto (p. ej., 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 o uno o más metabolitos de *L. paracasei* CBA L74 descritos en esta memoria tal como cualquier producto alimenticio fermentado, en donde el producto alimenticio es un producto lácteo o un producto de cereales, o una composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 en un soporte fisiológicamente aceptable. Una cantidad de una composición de este tipo proporcionada al sujeto que dé como resultado una resolución completa de los síntomas asociados con un trastorno relacionado con el gluten, una disminución en la gravedad de los síntomas asociados con un trastorno relacionado con el gluten o una ralentización de la progresión de los síntomas asociados con 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 dosificación y la programación, así como para predecir el resultado.

Las composiciones para uso descritas en esta memoria pueden administrarse a una amplia gama de especies, p. ej., seres humanos, primates no humanos (p. ej., monos), caballos, cerdos, vacas u otros animales de granja, perros, gatos u otros mamíferos que se tienen como mascotas, ratas, ratones u otros animales de laboratorio. Las composiciones descritas en esta memoria son útiles en composiciones y regímenes terapéuticos o para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de afecciones como las descritas en esta memoria (p. ej., un trastorno relacionado con el gluten).

Las composiciones descritas en esta memoria se pueden administrar por vía oral como parte de la dieta diaria habitual de un sujeto. Las composiciones alimenticias se pueden administrar como apoyo nutricional tanto a niños como a adultos. Cuando se formulan como productos farmacéuticos, las composiciones se pueden administrar a cualquier parte del cuerpo del huésped para su posterior administración a una célula diana. Una composición se puede administrar, sin limitación, al cerebro, al líquido cefalorraquídeo, a las articulaciones, a la mucosa nasal, a la sangre, a los pulmones, a los intestinos, a los tejidos musculares, a la piel o a la cavidad peritoneal de un mamífero. En términos de 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 a lo largo del tiempo. En un ejemplo adicional, una preparación en aerosol de una composición se puede administrar a un huésped por inhalación.

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 condición del sujeto, p. ej., inmadurez del sistema inmunológico o un trastorno gastrointestinal, el tamaño, el peso, la superficie, la edad y el sexo del sujeto, otros fármacos que se administren y el criterio de los médicos que lo atiendan. Dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,01-1000 mg/kg. Algunos intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, la dosis puede ser, por ejemplo, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kg o 100 mg/kg. Es probable que la dosis dependa de variables tales como el tipo y el grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente en particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración.

Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo in vitro o de modelos animales. Por ejemplo, puede ser útil el análisis de los efectos sobre la entrada celular de péptidos de gliadina en ensayos basados en células. Las composiciones también se pueden analizar para determinar sus efectos sobre las respuestas de anticuerpos, la producción de citoquinas y las respuestas de las células T.

Se pueden esperar amplias variaciones en la dosificaciones necesarias a la vista del espectro de síntomas asociados con los trastornos relacionados con el gluten, la diversidad de dianas celulares y las diferentes eficiencias de las diversas vías de administración. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar utilizando rutinas empíricas estándares para la optimización, como se entiende bien en la técnica. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (p. ej., 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 (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficiencia de la administración.

La duración del tratamiento con cualquier composición proporcionada en esta memoria puede ser cualquier duración, desde tan solo un día hasta tan larga como la vida del huésped (p. ej., muchos años). Por ejemplo, una composición se puede administrar una vez a la semana (por ejemplo, durante 4 semanas a muchos meses o años); una vez al mes (por ejemplo, de tres a doce meses o durante muchos años); o una vez al año durante un período de 5 años, diez años o más. También se observa que la frecuencia del tratamiento puede ser variable. Por ejemplo,

las presentes composiciones se pueden administrar una vez (o dos veces, tres veces, etc.) al día, semanalmente, mensualmente o anualmente.

Se puede utilizar cualquier método conocido por los expertos en la técnica para determinar si se induce una respuesta particular. Se pueden utilizar métodos clínicos que puedan evaluar el grado de un estado patológico particular para determinar si se induce una respuesta. Por ejemplo, se puede controlar a un sujeto para determinar el alivio sintomático, p. ej., el alivio de la diarrea, el dolor abdominal, los calambres, la distensión abdominal y la capacidad para tolerar una exposición al gluten. Como alternativa, o además, se pueden utilizar marcadores séricos, técnicas de formación de imágenes, p. ej., ecografía, rayos X y métodos endoscópicos.

Las composiciones también pueden administrarse junto con otras modalidades terapéuticas. Estas modalidades terapéuticas variarán de acuerdo con el trastorno particular, pero pueden incluir, por ejemplo, remedios dietéticos, tales como una dieta libre de gluten. En algunas realizaciones, los remedios dietéticos pueden incluir la introducción de productos de trigo de cepas que han sido modificadas genéticamente mediante cría selectiva o tecnologías recombinantes para expresar formas de gliadina que tienen números reducidos de epítomos de células T tóxicas. 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 flora intestinal que confieren beneficios para la salud al huésped. Prebióticos ejemplares 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 (a la que también se alude como glutenasa) que degrada el gluten fijando como objetivo los péptidos ricos en pralina que de otro modo resistirían las proteasas naturales del cuerpo y que contienen péptidos altamente inmunogénicos. Endopeptidasas ejemplares incluyen prolil endopeptidasas y ALV003, una combinación de una endoproteasa de cisteína derivada de semillas de cebada en germinación y una prolil endopeptidasa de *Sphingomonas capsulata*.

Otros agentes terapéuticos incluyen inhibidores de la permeabilidad intestinal aumentada típica de la enfermedad celíaca, por ejemplo, AT-1001 (larazotida), un inhibidor octapeptídico de la permeabilidad paracelular que inhibe el reordenamiento del citoesqueleto de las células epiteliales intestinales inducida por gliadina, el desmontaje de las uniones estrechas y el incremento pico de F-actina. Otros agentes terapéuticos incluyen inhibidores de tTG, moduladores del sistema inmunológico 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, siempre que exista una superposición en el período de tiempo durante el cual los agentes ejercen su efecto terapéutico. Se contempla la administración simultánea o secuencial, así como la administración en días o semanas diferentes.

Artículos de fabricación

Las composiciones descritas en esta memoria también se pueden reunir en kits, junto con las instrucciones de uso. Por ejemplo, los kits pueden incluir cantidades medidas de una composición que incluye uno o más productos alimenticios, en donde los productos alimenticios son productos lácteos o productos de cereales, fermentados con *L. paracasei* CBA L74. Las instrucciones de uso se pueden transmitir por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, se pueden imprimir en un prospecto en uno o más idiomas o proporcionarse de forma audible o visual (p. ej., en un disco compacto). Los materiales de envasado pueden incluir materiales de envasado, por ejemplo, viales, paquetes, recipientes. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir cantidades medidas de una composición que comprende *L. paracasei* CBA L74 en un soporte fisiológicamente aceptable junto con materiales de envasado e instrucciones de uso en cualquiera de los formatos arriba descritos. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir cantidades medidas de una composición que comprende uno o más metabolitos de *L. paracasei* CBA L74. En algunas realizaciones, las composiciones pueden excluir células de *L. paracasei* CBA L74, es decir, los metabolitos pueden separarse parcial o sustancialmente de las células de *L. paracasei* CBA L74. Los componentes del kit pueden ser adecuados para su uso inmediato. Sin embargo, la invención abarca kits que incluyen formulaciones concentradas y/o materiales que pueden requerir dilución antes de su uso.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Péptidos: α-gliadina P31-P43 (SEQ ID NO: 1); y P57-68 (SEQ ID NO: 2) fueron sintetizados in vitro y unidos al fluorocromo, lisamina, por Inbios, Nápoles, Italia. Los análisis cromatográficos indicaron que los péptidos tenían una pureza del 99 %.

Ensayo de entrada del péptido Caco2: Se incubaron durante 15 minutos cultivos de células Caco2, una línea celular de carcinoma epitelial de colon humano, con los péptidos marcados. Los péptidos marcados se eliminaron mediante lavados repetidos y las células se examinaron con un microscopio confocal. El análisis morfológico

mostró que después de 15 minutos de incubación, los péptidos marcados habían penetrado en las células y se habían localizado en vesículas endocíticas, que aparecieron como pequeñas manchas de color. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un paquete de software dedicado que evaluó la intensidad de fluorescencia de múltiples campos microscópicos.

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

Cultivo de *L. paracasei* CBA L74: *L. paracasei* CBA L74 (número de acceso de depósito internacional LMG P-24778) se aisló 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. La concentración bacteriana se midió espectrofotométricamente en un espectrofotómetro Beckman DU-7, a una longitud de onda de 600

nm. La lectura de la densidad óptica (DO) se utilizó para calcular la concentración bacteriana de la siguiente manera: $DO\ 2 = 1,5 \times 10^9$ ufc/ml. Las diferentes concentraciones bacterianas utilizadas para los experimentos se obtuvieron diluyendo el cultivo bacteriano en medio de reciente aportación sin antibiótico. Para los experimentos que utilizaron solo sobrenadante, 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 tamaño de poro de 0,2 micras.

Péptidos de gliadina y EGF-Alexa-488: Los péptidos sintéticos (Inbios, pureza del 95 %, análisis MALDI-toff como se esperaba) se obtuvieron mediante filtración Ultrasart-D20 (Sartorius AG, Goettingen, Alemania). El péptido P31-43 tenía la secuencia de aminoácidos: LGQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 1). El péptido P57-68 tenía la secuencia de aminoácidos: LQPFQPQLPY (SEQ ID NO: 1). Los péptidos se conjugaron con lisamina, un fluorocromo rojo excitado por láser HeNe1 (543 nm) con emisión de banda larga de 610 nm. EGF-Alexa-488 se obtuvo de Molecular Probes, San Giuliano Milanese, Italia.

Ensayo de fluorescencia: Los autores de la invención probaron el efecto de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de péptidos de gliadina o EGF-Alexa en células Caco-2. Células Caco2 se cultivaron en cubreobjetos de vidrio estériles, se transfirieron a placas de 24 pocillos y se trataron con diferentes concentraciones de *L. paracasei* CBA L74, en un intervalo de 10^4 a 10^8 ufc/ml. Para los experimentos que utilizan sobrenadante libre de células, las células Caco2 se trataron con *L. paracasei* CBA L74, sobrenadante recogido de cultivos de *L. paracasei* CBA L74 que habían alcanzado una densidad de 10^8 ufc/ml. El sobrenadante se utilizó nuevo o después de la exposición al calor. En algunos experimentos, el sobrenadante se calentó a 80 °C durante 15 minutos. En otros experimentos, el sobrenadante se hirvió durante 5 minutos. Células Caco2 se trataron con las diferentes preparaciones bacterianas en una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C durante 30 minutos y luego se incubaron con los péptidos de gliadina P31-43-lisamina (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 utilizaron 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 una atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, el medio se eliminó mediante tres lavados con PBS 1X (Gibco). Los cubreobjetos se fijaron brevemente (5 minutos) con paraformaldehído al 3 % (Sigma-Aldrich) a temperatura ambiente, luego se montaron y se observaron mediante microscopio confocal (LSM 510 Zeiss). Las imágenes se generaron y analizaron con el software AIS Zeiss para evaluar la intensidad de la 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 vesículas de endocitosis que aparecen como pequeños puntos coloreados en rojo (péptidos) o verde (EGF).

Análisis estadístico: El análisis estadístico y los gráficos se obtuvieron de GraphPad Prism. Se calcularon las desviaciones medias y estándar. Éstas se evaluaron mediante el test t de Student. Los resultados con valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

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

L. paracasei CBA L74 vivo redujo la entrada tanto de P31-43 como de P57-68 en las células Caco2. Las imágenes de fluorescencia confocal se muestran en la Figura 1. Las células de control (paneles de la izquierda) que se incubaron con P31-43 marcado con lisamina en ausencia de *L. paracasei* CBA L74, mostraron patrones distintivos de fluorescencia que correspondían a vesículas endocíticas que contenían P31-43 (flechas blancas). En cambio, la fluorescencia se redujo en las células que se incubaron con P31-43 marcado con lisamina en presencia de *L. paracasei* CBA L74 (paneles de la derecha).

El análisis cuantitativo indicó que el efecto de *L. paracasei* CBA L74 en la entrada de P31-43 dependía de la dosis y era estadísticamente significativo. La Figura 2 muestra los resultados de cinco experimentos independientes en muestras duplicadas. La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos aleatorios en cada una de las

muestras. Como se muestra en la Figura 2, el tratamiento de células Caco2 con 10^4 , 10^6 y 10^8 *L. paracasei* CBA L74, resultó en una disminución estadísticamente significativa, dependiente de la dosis, en la entrada de P31-43.

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 utilizó 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, resultó en una disminución estadísticamente significativa, dependiente de la dosis, en la entrada de P57-68.

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

ADN de *L. paracasei* CBA L74 se extrajo y se purificó mediante métodos estándares. 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 a la de 10^8 células no bloqueó la entrada del péptido.

Ejemplo 4: Efecto del sobrenadante del cultivo de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada del péptido α -gliadina

Sobrenadante del cultivo de *L. paracasei* CBA L74 se recogió por centrifugación y el sobrenadante del cultivo se filtró para eliminar las bacterias vivas y los desechos celulares. El sobrenadante del equivalente a 10^8 células se aplicó a células Caco2 en presencia del péptido P31-43. Las células Caco2 de control se trataron 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 para 30 campos aleatorios en cada una de las muestras.

Como se muestra en el gráfico de barras de la Figura 5a, el tratamiento de células Caco2 con células vivas de *L. paracasei* CBA L74 resultó nuevamente en una disminución estadísticamente significativa en la entrada del péptido P31-43. El tratamiento de células Caco2 con sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 resultó en una disminución de una magnitud similar. Las imágenes confocales de 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.

Los resultados de un experimento similar en el que se sustituyó P57-68 por P31-43 se muestran en la Figura 6. El tratamiento de células Caco2 con células vivas de *L. paracasei* CBA L74 resultó nuevamente en 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 resultó en una disminución de una magnitud similar. Las imágenes confocales de 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 del cultivo de *L. paracasei* CBA L74 tratado térmicamente sobre la entrada del péptido α -gliadina

Sobrenadante del cultivo de *L. paracasei* CBA L74 se recogió de acuerdo con el método del Ejemplo 4 y luego se calentó durante 30 minutos a 37° u 80°C durante 30 minutos. Luego, los sobrenadantes calentados se enfriaron 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 tratadas con sobrenadante, 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 habían sido tratadas con sobrenadante calentado (" 80°C "). La intensidad de fluorescencia se calculó para 30 campos aleatorios en cada una de las muestras. Como se muestra en la Figura 7, el sobrenadante calentado a 80°C mantuvo la capacidad del sobrenadante no calentado para bloquear la entrada del péptido P31-43 en las células Caco2. Las imágenes confocales de este experimento se muestran en el panel de la derecha de la Figura 7. Estas imágenes muestran claramente que el sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 tratado térmicamente redujo la entrada del péptido P31-43 en la misma medida que lo hizo el sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 no tratado térmicamente. En conjunto, estos datos sugirieron que el efecto del sobrenadante de cultivo de *L. paracasei* CBA L74 no resultaba de la actividad enzimática.

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

Se preparó arroz fermentado con *L. paracasei* CBA L74. Arroz fermentado, sobrenadante del arroz fermentado o sobrenadante tratado térmicamente del arroz fermentado se aplicó a células Caco2 en presencia del péptido P31-43 y la entrada del péptido se monitorizó de acuerdo con el método del Ejemplo 2. Como se muestra en la Figura 8, los tres tratamientos - arroz fermentado, sobrenadante del arroz fermentado o sobrenadante tratado térmicamente del arroz fermentado - redujeron la entrada del péptido en relación con las células Caco2 sin tratar. 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 de la derecha). Se observó un efecto similar, estadísticamente significativo, en presencia de avena fermentada (barras de la izquierda).

Ejemplo 7: Efecto de arroz fermentado y de avena fermentada con *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de dextrano Texas Red en células Caco2

Se prepararon arroz fermentado y avena fermentada con *L. paracasei* CBA L74. Como se muestra en la Figura 10, la incubación de células Caco2 con arroz fermentado o avena fermentada resultó en una reducción estadísticamente significativa en la entrada celular de dextrano Texas Red con relación a las células que habían sido tratadas con arroz o avena no fermentados, respectivamente. Dado que el dextrano es absorbido generalmente por las células a través de la macropinocitosis, estos datos sugirieron que metabolitos de *L. paracasei* CBA L74 pueden bloquear la vía macropinocítica.

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

Sobrenadante del cultivo de *L. paracasei* CBA L74 se recogió de acuerdo con el método del Ejemplo 4 y se aplicó a células Caco2 en presencia de EGF conjugado con Alexa Fluor® (Invitrogen). Como se muestra en el gráfico de barras de la Figura 11, el tratamiento de células Caco2 con sobrenadante del cultivo de *L. paracasei* CBA L74 resultó en una disminución estadísticamente significativa en la entrada de EGF. Imágenes confocales de este experimento se muestran en la Figura 12. Dado que la captación de EGF requiere la unión a un receptor específico, p. ej., a un receptor de EGF, estos datos sugirieron que metabolitos de *L. paracasei* CBA L74 pueden bloquear la vía endocítica mediada por datrina.

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

Células Caco2 se trataron 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. Vesículas de endocitosis que contenían 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 resultó en una reducción dependiente de la dosis en la entrada tanto de P31-43 como de P57-68 en células Caco-2. Como se muestra en las Figuras 13b, 13c y 13d, para P31-43, el tratamiento con 10⁴, 10⁶ y 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultó en una reducción de la intensidad de fluorescencia con relación a la observada en las 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 una de las muestras. Los datos de la Figura 14 fueron representativos de cinco experimentos independientes. El gráfico de barras de la Figura 14 compara la intensidad de fluorescencia de las células de control no tratadas ("UN") con la de células que estuvieron expuestas a P31-43^{liss} en presencia de 10⁴, 10⁶ o 10⁸ ufc/ml de células *L. paracasei* CBA L74. El tratamiento con *L. paracasei* CBA L74 resultó en una disminución estadísticamente significativa en la intensidad de fluorescencia del 50 %, 70 % y 75 %, respectivamente, para 10⁴, 10⁶ o 10⁸ 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 10⁴, 10⁶ y 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultó en una reducción de la intensidad de fluorescencia con relación a la observada en las 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 una de las muestras. Los datos de la Figura 16 fueron representativos de cinco experimentos independientes. El gráfico de barras de la Figura 16 compara la intensidad de fluorescencia de las células de control no tratadas ("UN") con la de células que estuvieron expuestas a P57-68^{liss} en presencia de 10⁴, 10⁶ o 10⁸ ufc/ml de células *L. paracasei* CBA L74. El tratamiento con *L. paracasei* CBA L74 resultó en una disminución estadísticamente significativa en la intensidad de fluorescencia del 25 %, 25 % y 50 %, respectivamente, para 10⁴, 10⁶ o 10⁸ 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 10⁴, 10⁶ y 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 resultó en una reducción de la intensidad de fluorescencia del 25 %, 25 % y 50 %, respectivamente, con relación a las células de control no tratadas (** = p < 0,001).

Como se muestra en la Figura 17, el tratamiento con 10⁸ ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 redujo la intensidad de fluorescencia en un 75 % para P31-43 y en un 50 % para P57-68. Estos datos sugirieron que *L. paracasei* CBA L74 puede ser más eficiente en la reducción de la entrada de P41-43 que en la reducción de la entrada de P57-68, posiblemente reflejando diferentes vías endocíticas.

Ejemplo 10: Efecto dependiente de la concentración de sobrenadante de *L. paracasei* CBA 174 sobre la entrada de P31-43 y P57-68 en células Caco2

Células Caco2 se trataron con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 o ADN de *L. paracasei* CBA L74 como se describe en el Ejemplo 1. Las células Caco2 se incubaron durante 30 minutos en sobrenadante o ADN del equivalente a 10^8 ufc/ml. Como se muestra en las Figuras 18b y 18c, el tratamiento con células de *L. paracasei* CBA L74 o con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultó en una reducción en la intensidad de fluorescencia en las células expuestas a P31-43^{liss} con relación a la observada en las 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 una de las muestras. Los datos de la Figura 19 fueron representativos de cinco experimentos independientes. El gráfico de barras de la Figura 19 compara la intensidad de fluorescencia de las células de control no tratadas ("UN") con la de las células que estuvieron expuestas 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 ("Sup 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 las células Caco2, calculada como reducción de la intensidad de fluorescencia, en aproximadamente un 25 % con relación a las células de control no tratadas (***) = $p < 0,001$).

Como se muestra en las Figuras 20b y 20c, el tratamiento con células de *L. paracasei* CBA L74 o con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74, respectivamente, resultó en una reducción en la intensidad de fluorescencia en las células expuestas a P57-68^{liss} con relación a la observada en las 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 fueron expuestas 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 ("Sup 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 las células Caco2, calculada como reducción de la intensidad de fluorescencia, en aproximadamente un 40 % con relación a las células de control no tratadas (***) = $p < 0,001$).

En cambio, 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. En conjunto, estos datos sugirieron que el metabolito responsable de reducir la entrada de péptidos podría secretarse en el sobrenadante del cultivo bacteriano.

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

Células Caco2 se trataron con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 de un cultivo de 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 seguida de incubación con EGF-Alexa 488 durante 30 minutos como se describe en el Ejemplo 1. Como se muestra en las Figuras 22b, el tratamiento con sobrenadante de *L. paracasei* CBA-L74 resultó en una reducción en la intensidad de fluorescencia en las células expuestas a EGF-Alexa-488 con relación a la observada en las 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 una de las muestras. Los datos de 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 las células que fueron expuestas a EGF-Alexa 488 en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sup 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 reducción de la intensidad de fluorescencia, en aproximadamente un 50 % con relación a las células de control no tratadas. La entrada de EGF-Alexa 488 pareció estar bloqueada en la membrana celular (***) = $p < 0,001$).

Ejemplo 12: Efecto del sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 sobre la entrada de P31-43 en células Caco2 después de la eliminación del sobrenadante

Células Caco2 se incubaron con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 de un cultivo de 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74 durante 30 minutos como se describe en el Ejemplo 1. A continuación, se eliminó el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 y se reemplazó por DMEM. Se añadió P31-43^{liss} y se monitorizó la entrada de péptidos como se describe en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 24c, la entrada de P31-43^{liss} se redujo significativamente, con relación a las células de control no tratadas (Figura 24a) incluso después de que se hubiera eliminado el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 y se hubiera reemplazado por DMEM. La Fig. 24b muestra células Caco2 que habían sido tratadas con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que no había sido eliminado. El gráfico de barras de la Figura 25 compara la intensidad de fluorescencia de las células de control no tratadas ("UN"); células que fueron expuestas a P31-43^{liss} en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sup LP 10^8 ") y células que fueron expuestas a P31-43^{liss} después de la eliminación del sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("MEM") (***) = $p < 0,001$).

Ejemplo 13: Efecto del sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 tratado térmicamente sobre la entrada del P31-43 en células Caco2

Células Caco2 se incubaron con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 (de un cultivo de 10^8 ufc/ml de *L. paracasei* CBA L74) que había tratado con calor hirviéndolas durante 5 minutos o incubándolas a 80 °C durante 15 minutos. La entrada de P31-43^{liss} se ensayó como se describe en el Ejemplo 1. Como se muestra en la Figura 26d, la entrada de P31-43^{liss} se redujo, con relación 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. En cambio, la entrada de P31-43^{liss} no se redujo significativamente (Figura 26c), con relación 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 una célula Caco2 que había sido tratada con sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que no había sido tratado con calor. El gráfico de barras de la Figura 27 compara la intensidad de fluorescencia de las células de control no tratadas ("UN"); células que fueron expuestas a P31-43^{liss} en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 ("Sup LP 10⁸") que no había sido tratado térmicamente; células que fueron expuestas a P31-43^{liss} en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que había sido hervido ("95°-100 °C"); y células que fueron expuestas a P31-43^{liss} en presencia de sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 que había sido calentado a 80 °C ("70°- 80 °C"). En conjunto, estos datos sugirieron que el efector biológico en el sobrenadante de *L. paracasei* CBA L74 puede no ser una enzima, ya que la actividad enzimática es destruida típicamente por temperaturas de 80 °C (***) = $p < 0,001$).

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en la reducción de un síntoma de toxicidad del péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten, comprendiendo la composición un producto alimenticio fermentado, en donde el producto alimenticio es un producto lácteo o un producto de cereales, en donde el producto alimenticio fermentado ha sido fermentado por la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CBA L74, Número de Acceso de Depósito Internacional LMG P-24778, y el producto alimenticio fermentado reduce un síntoma de toxicidad del péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten al proporcionar una barrera incrementada a la translocación de un péptido de gliadina a través de una mucosa intestinal del sujeto.
2. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cualquier célula de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CBA L74 presente en la composición está muerta o se vuelto incapaz de división celular.
3. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el producto lácteo es leche o un producto a base de leche.
4. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el producto de cereales es arroz, trigo, avena, cebada, maíz, centeno, sorgo, mijo o triticale.
5. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende, además, un soporte fisiológicamente aceptable.
6. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el soporte fisiológicamente aceptable es un soporte farmacéutico.
7. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la composición reduce la entrada celular de un péptido de gliadina.
8. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el péptido de gliadina es un péptido de α -gliadina.
9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el péptido de α -gliadina tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LGQQQPFPPQQPY (SEQ ID NO: 1); QLQPFPPQQLPY (SEQ ID NO: 2); LGQQQPFPPQQPYQPQPF (SEQ ID NO: 3); y LQLQPFPPQQLPYQPQQLPYQPQQLPYQPQPF (SEQ ID NO: 4).
10. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el trastorno relacionado con el gluten es la enfermedad celíaca o la sensibilidad al gluten.
11. La composición para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el síntoma de toxicidad del péptido de gliadina comprende inflamación, una reacción autoinmune, un síntoma gastrointestinal, pérdida de peso, anemia, osteoporosis, artritis, infertilidad, neuropatía periférica o insuficiencia hepática.
12. Un kit que comprende una cantidad medida de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para uso en la reducción de un síntoma de toxicidad del péptido de gliadina en un sujeto que tiene un trastorno relacionado con el gluten y uno o más elementos seleccionados del grupo que consiste en material de envasado, un prospecto que comprende instrucciones de uso, un fluido estéril, una jeringa y un recipiente estéril.
13. El kit de la reivindicación 12, en donde la composición comprende, además, un soporte farmacéutico.

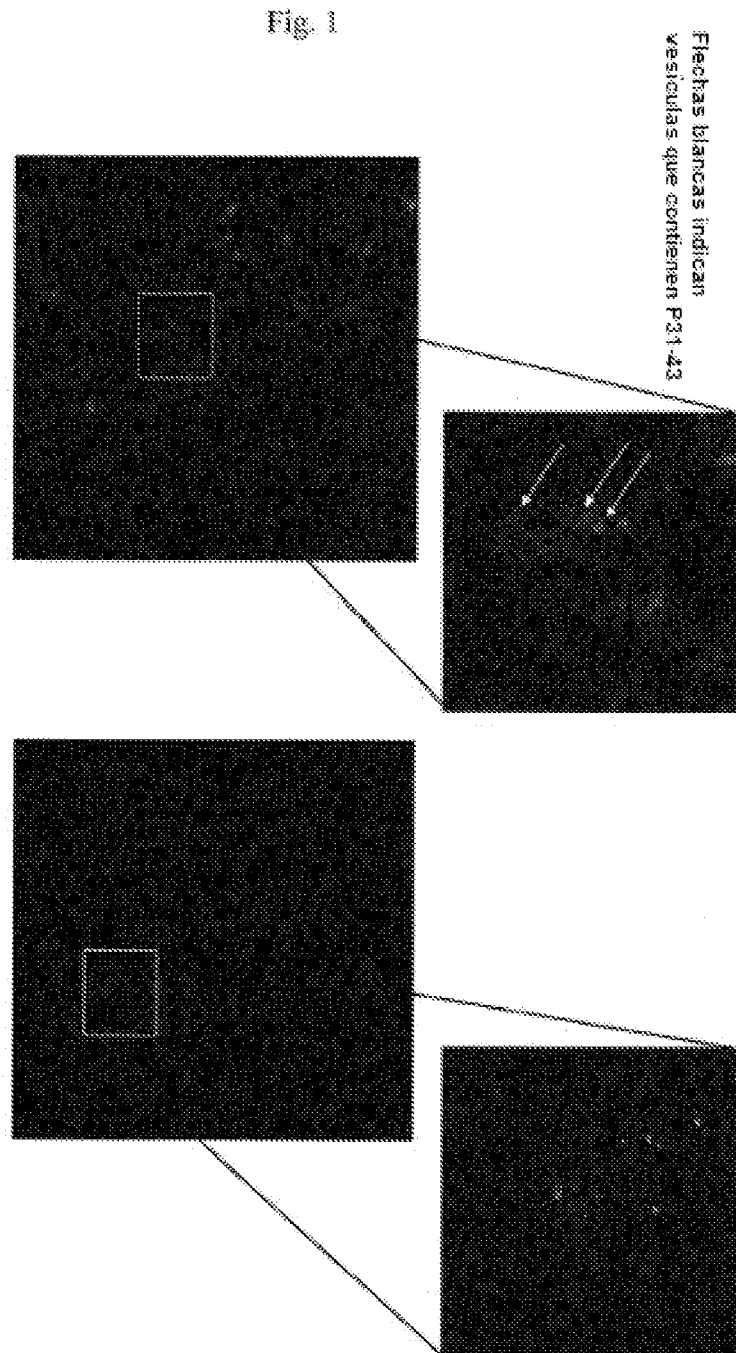


Fig. 2

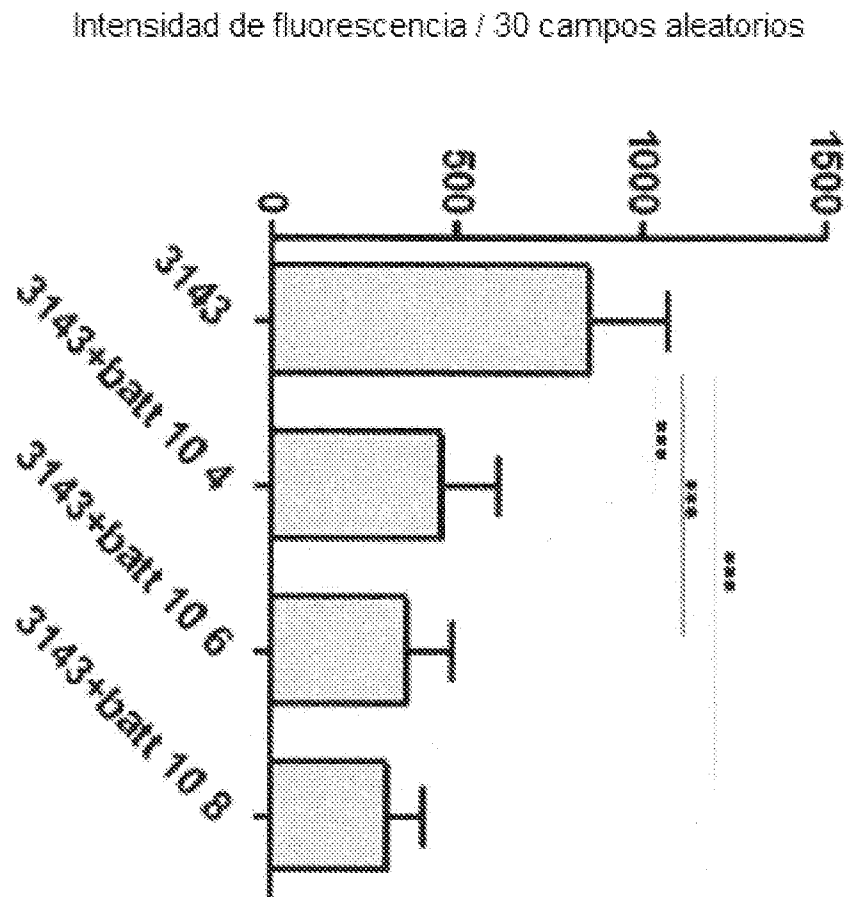


Fig. 3

Intensidad de fluorescencia / 30 campos aleatorios

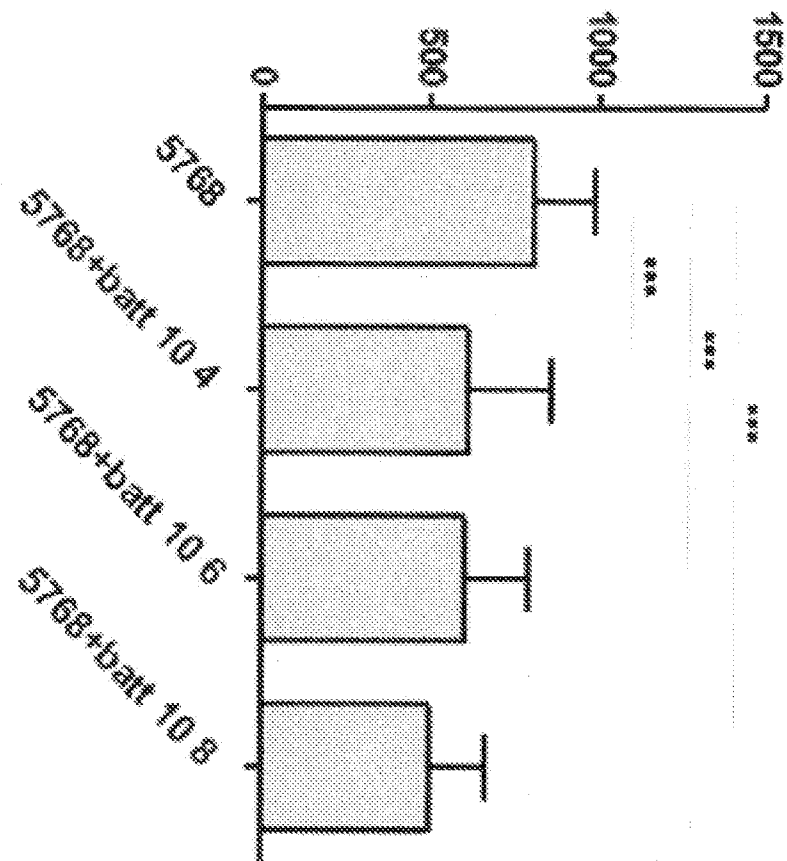
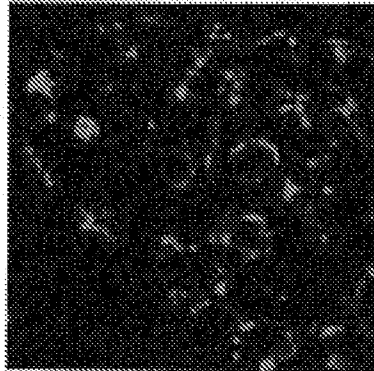


Fig. 4

No tratadas



ADN de Bacterias 10^8

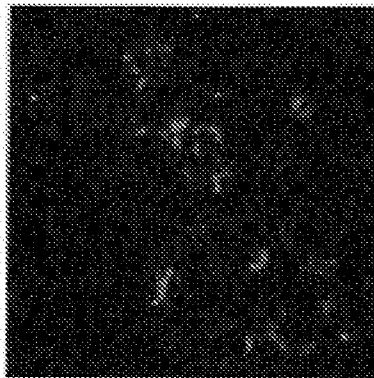


Fig. 5a

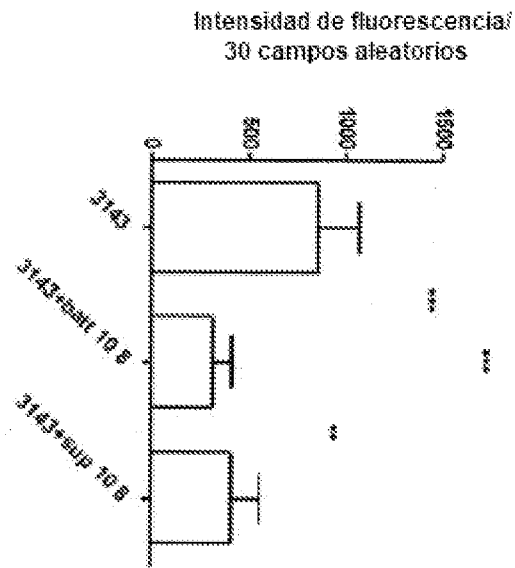


Fig. 5b

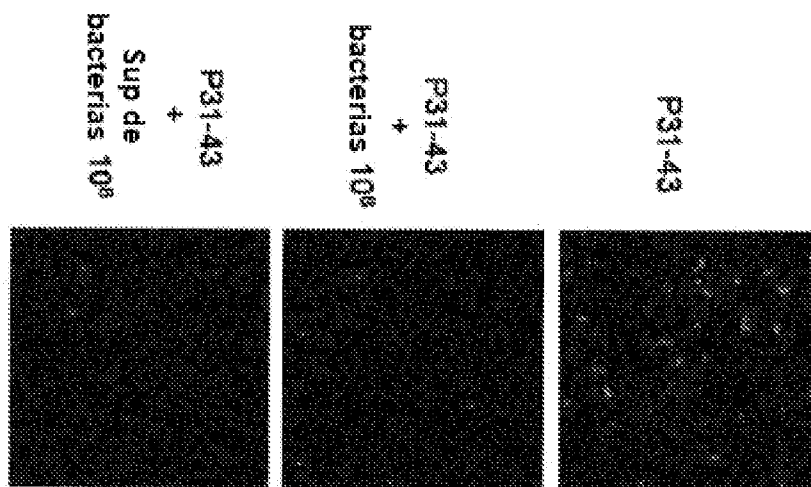


Fig. 6a

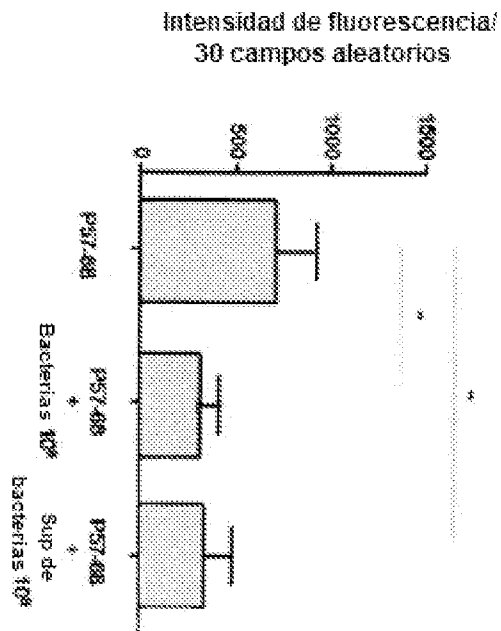


Fig. 6b

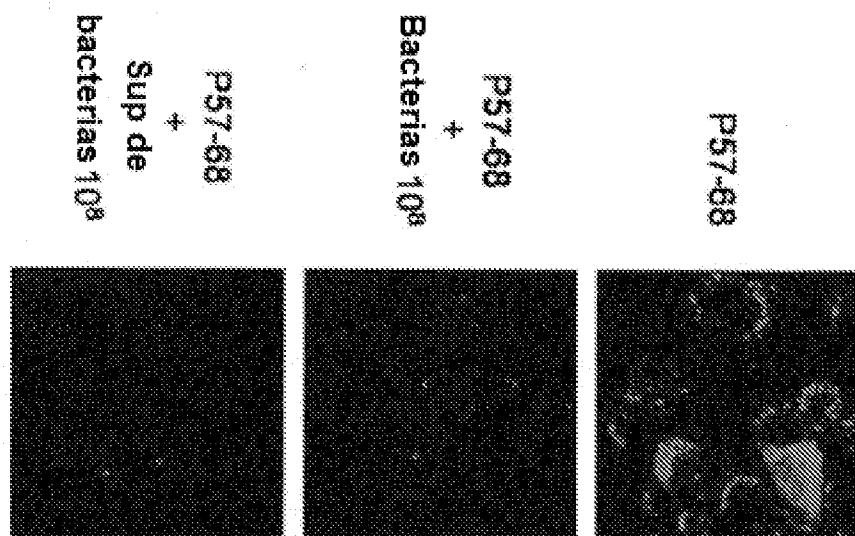


Fig. 7a

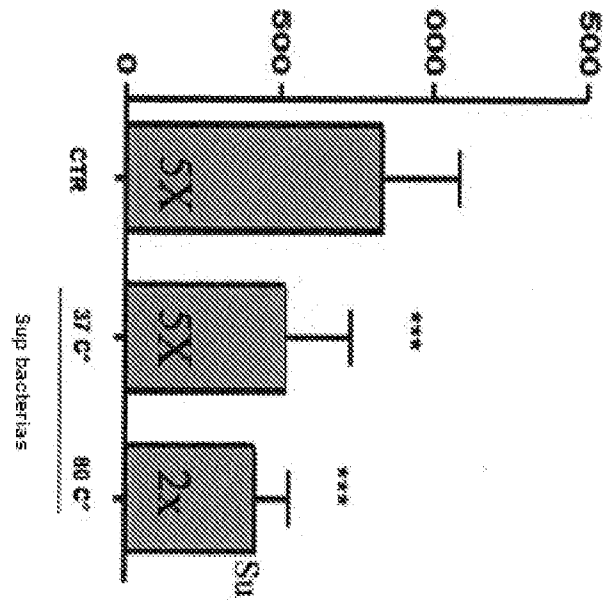


Fig. 7b

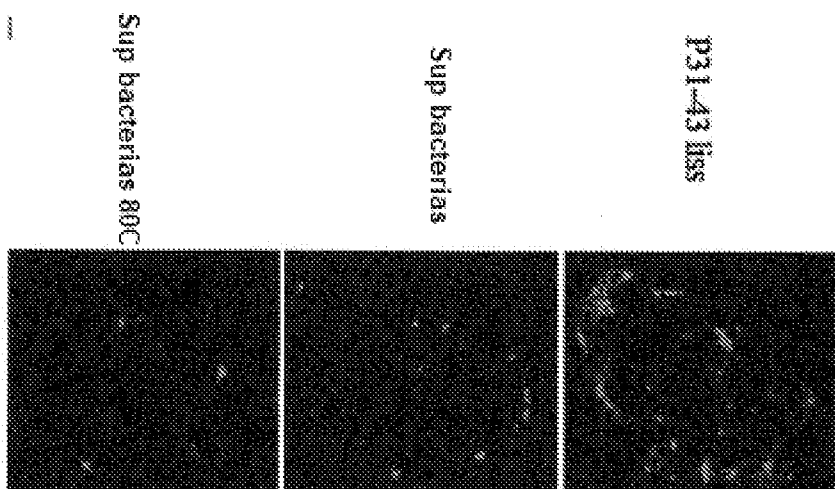


Fig. 8

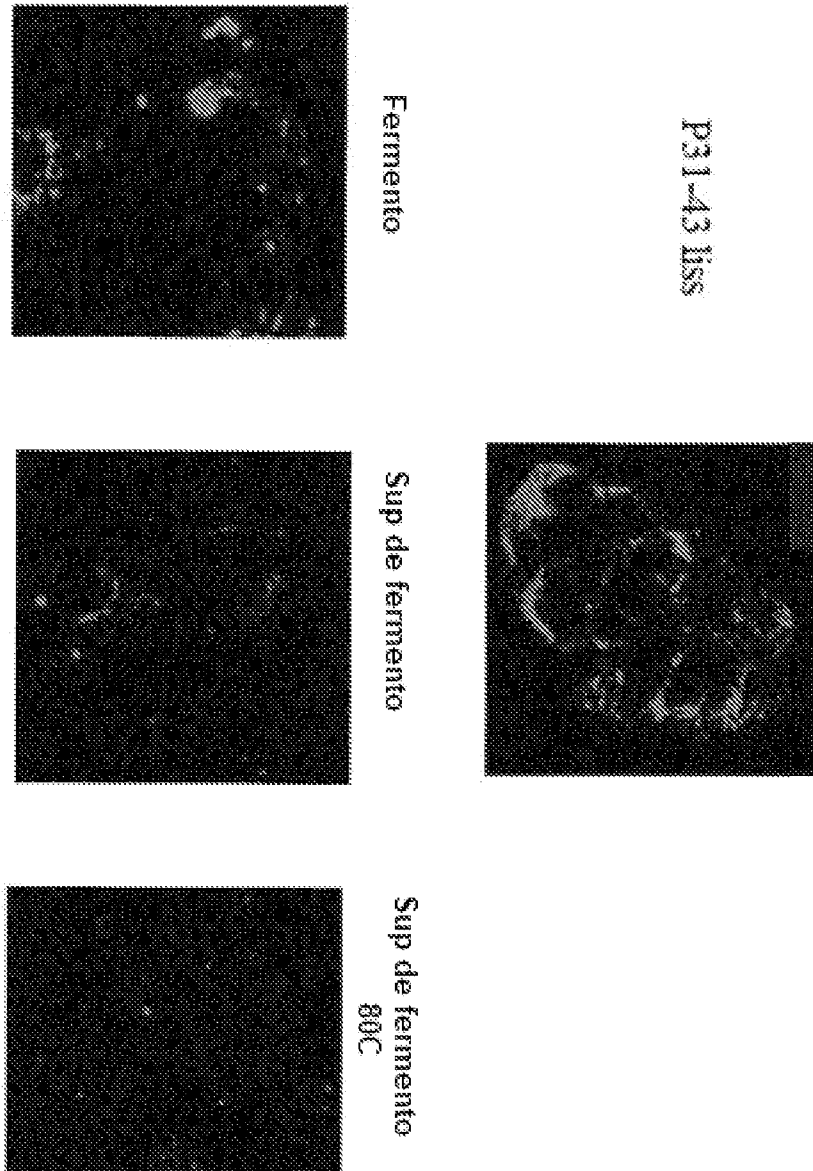


Fig. 9

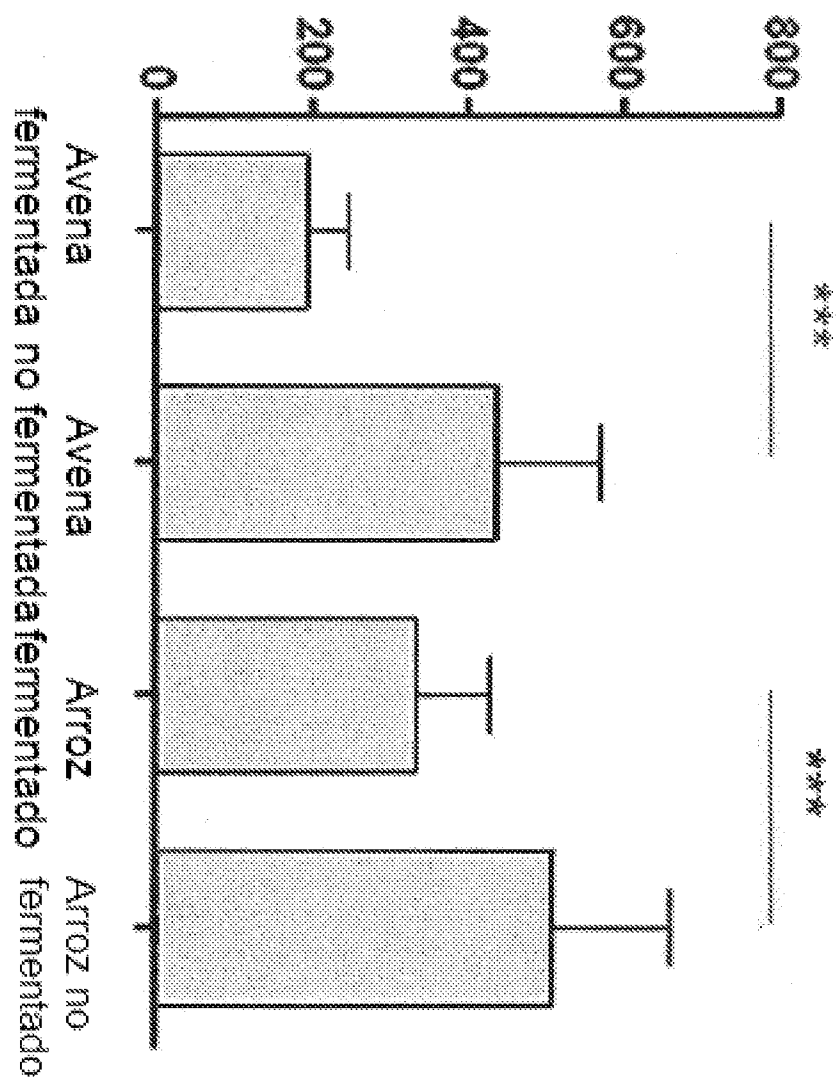


Fig. 10

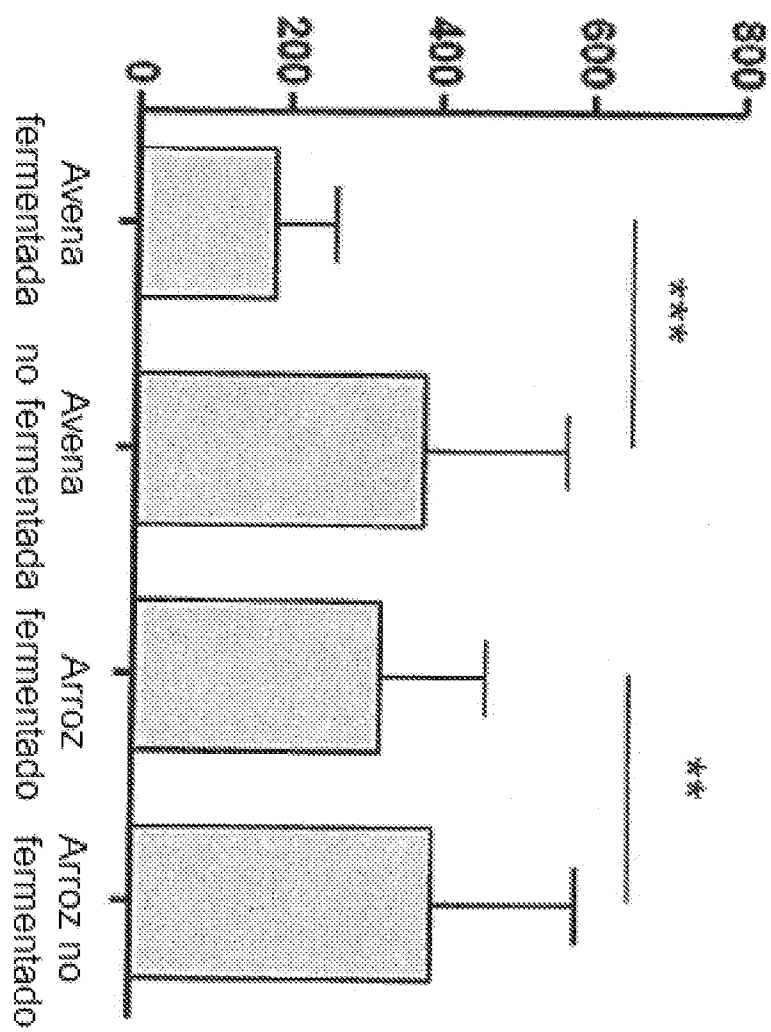


Fig. 11

Intensidad de fluorescencia / 30 campos aleatorios

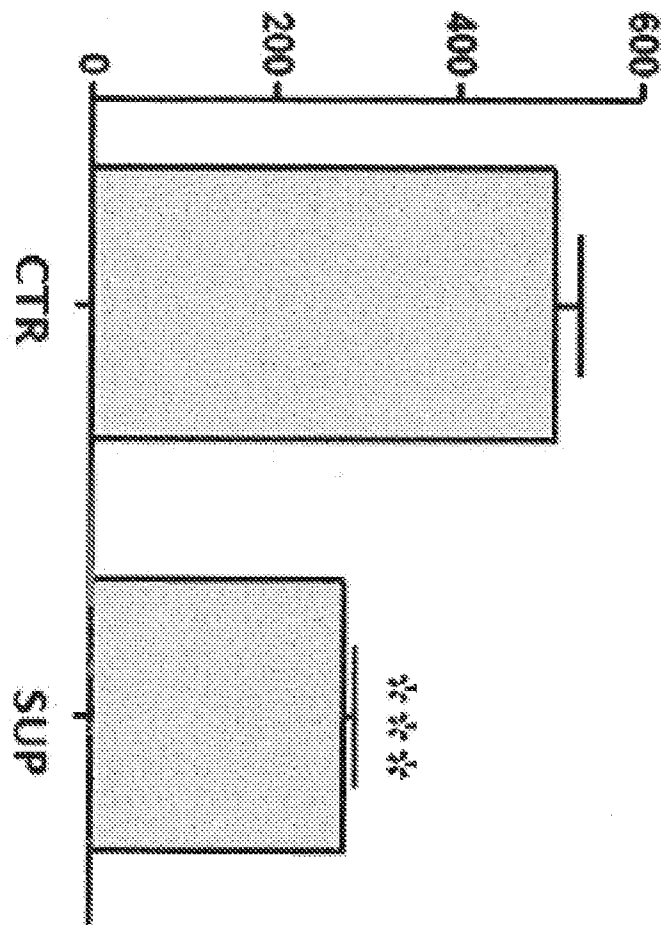


Fig. 12

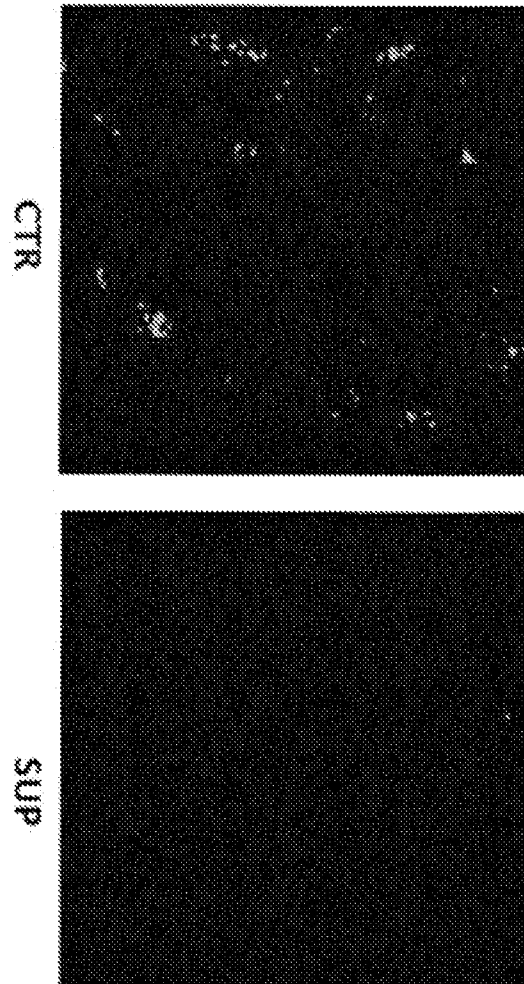


Fig. 13

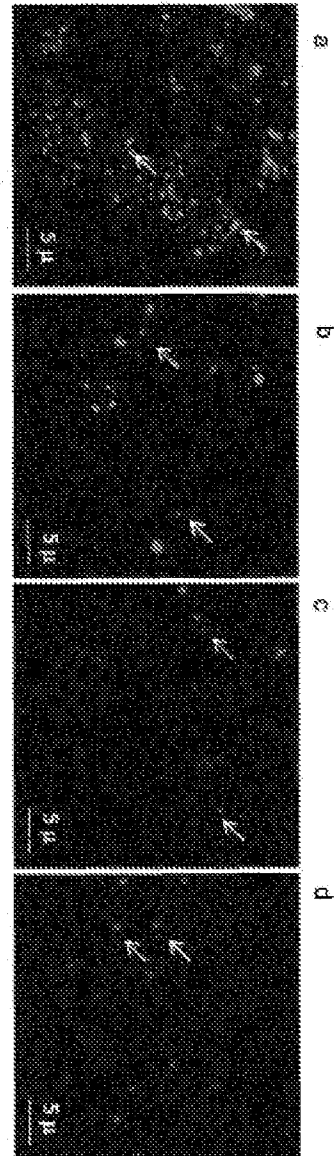


Fig. 14

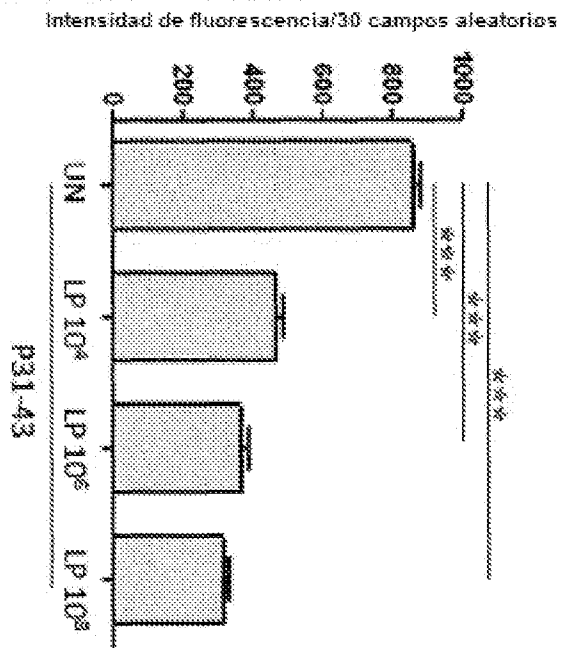


Fig. 15

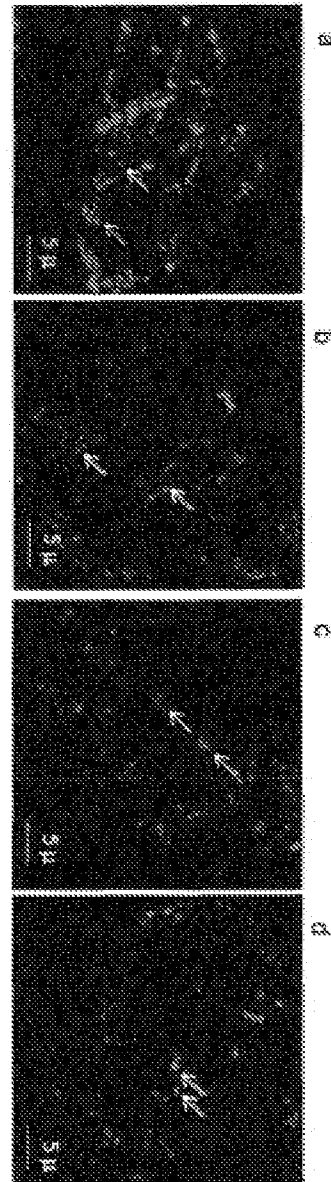


Fig. 16

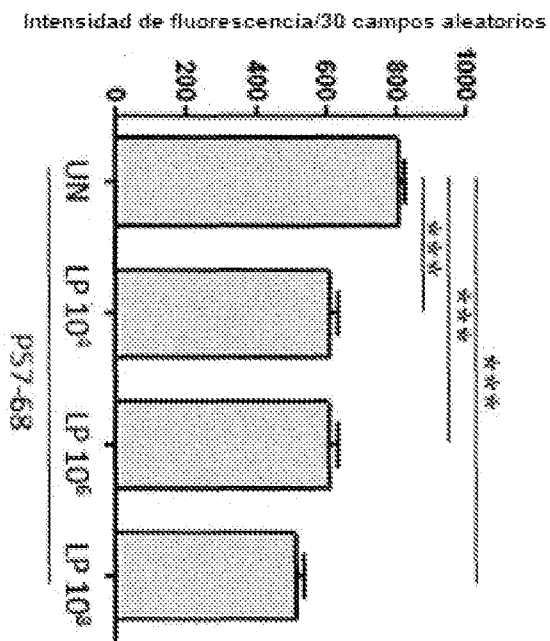


Fig. 17

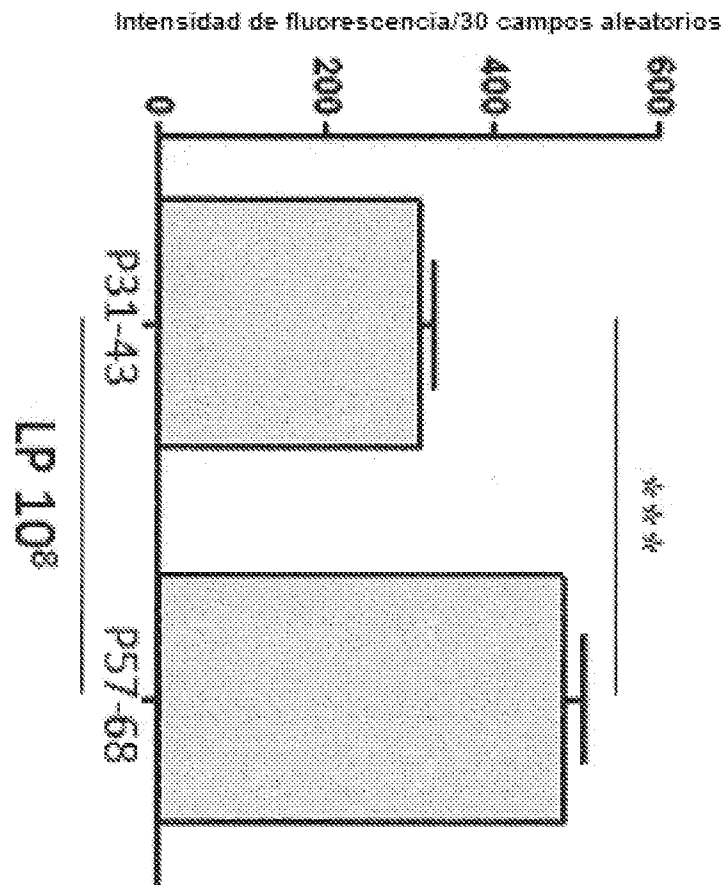


Fig. 18

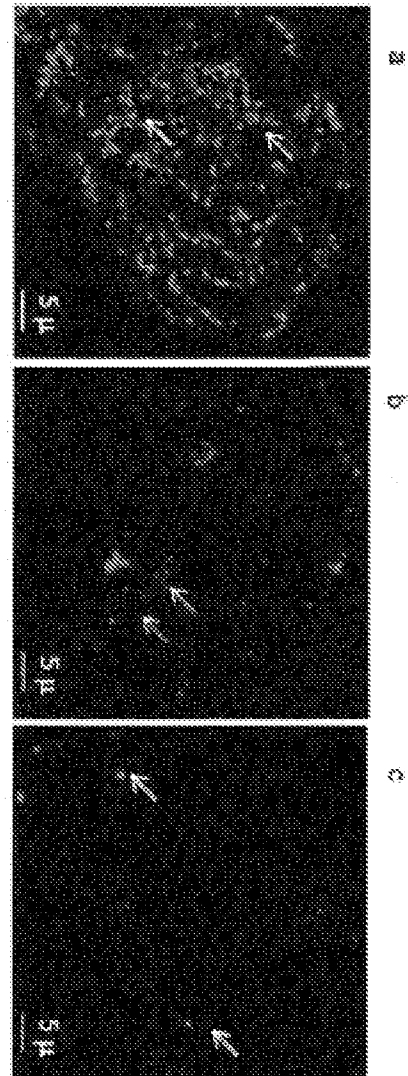


Fig. 19

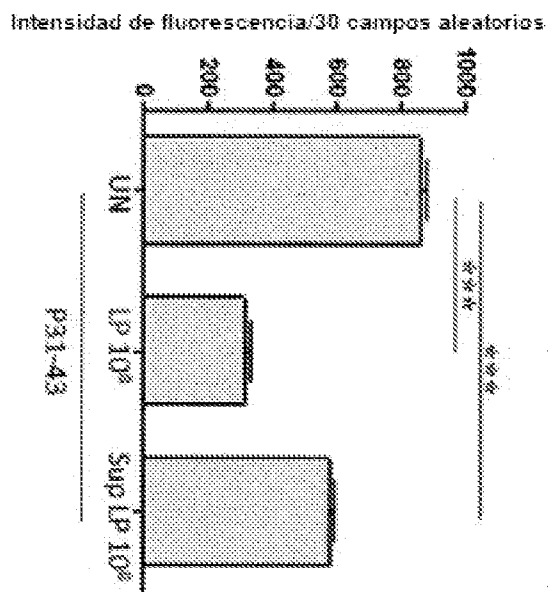


Fig. 20

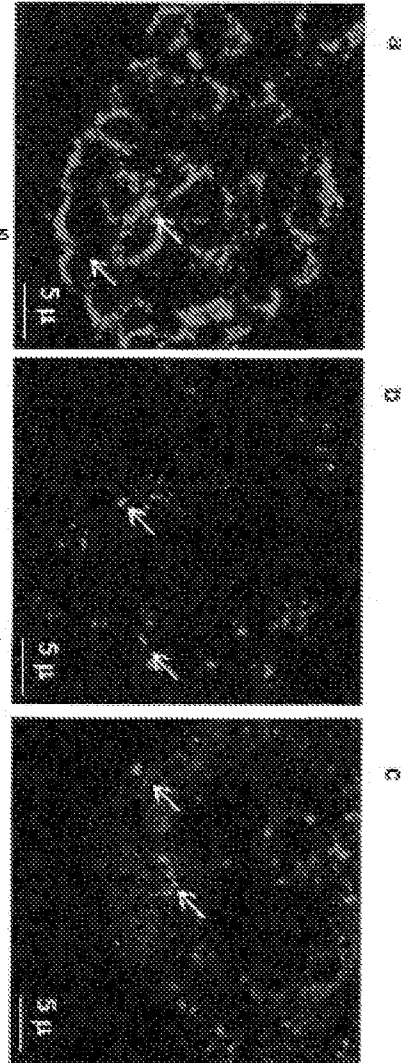


Fig. 21

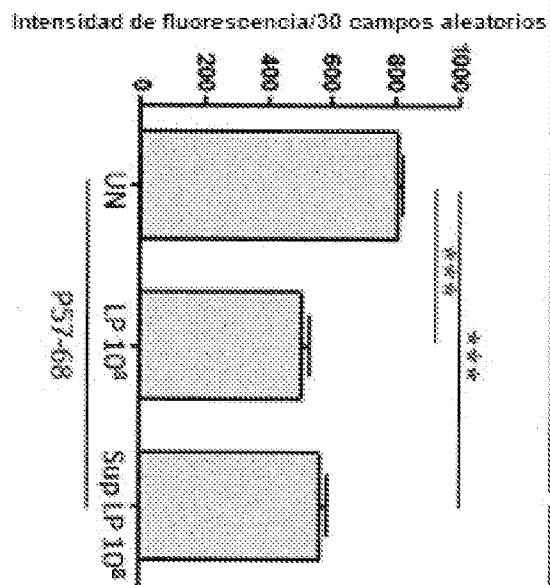


Fig. 22

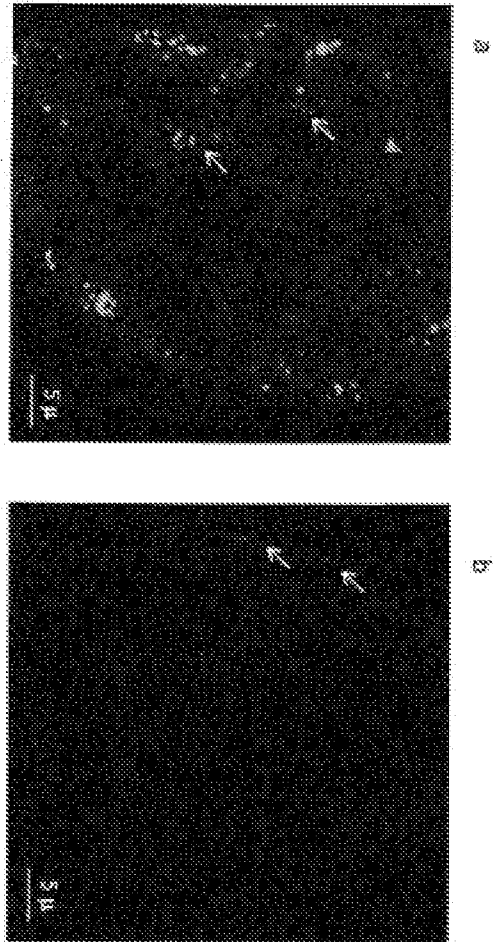


Fig. 23

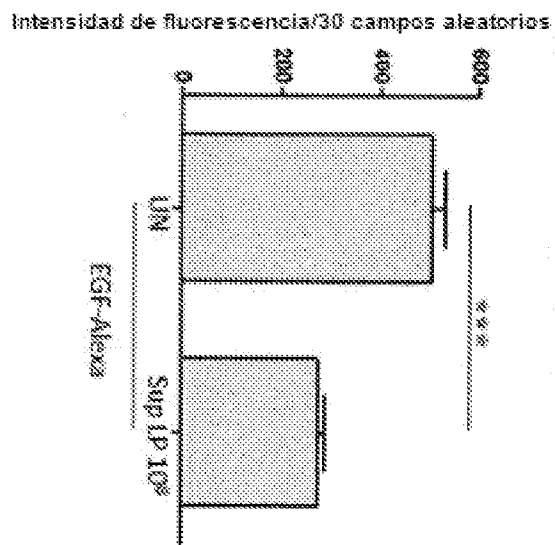


Fig. 24

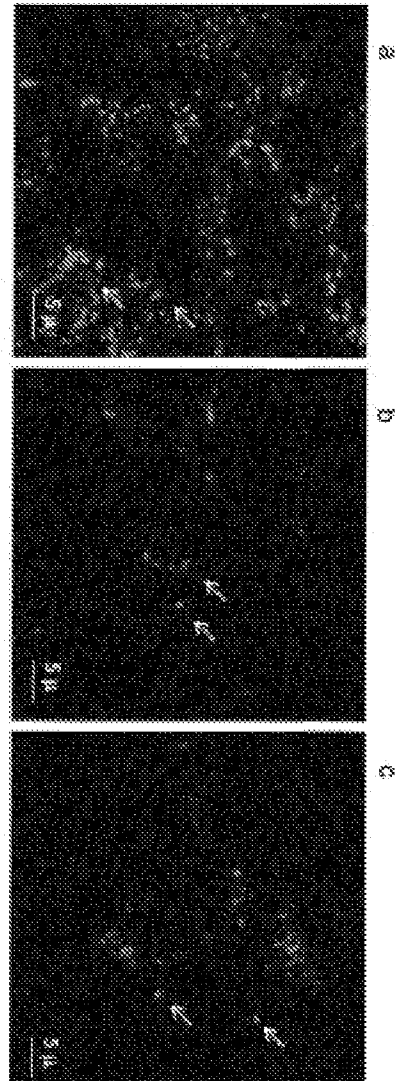


Fig. 25

Intensidad de fluorescencia/30 campos aleatorios

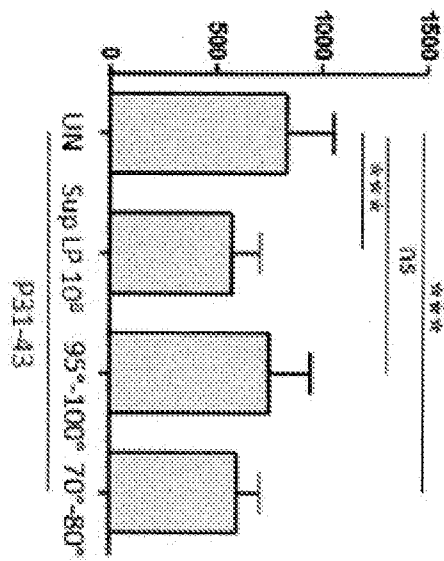


Fig. 26

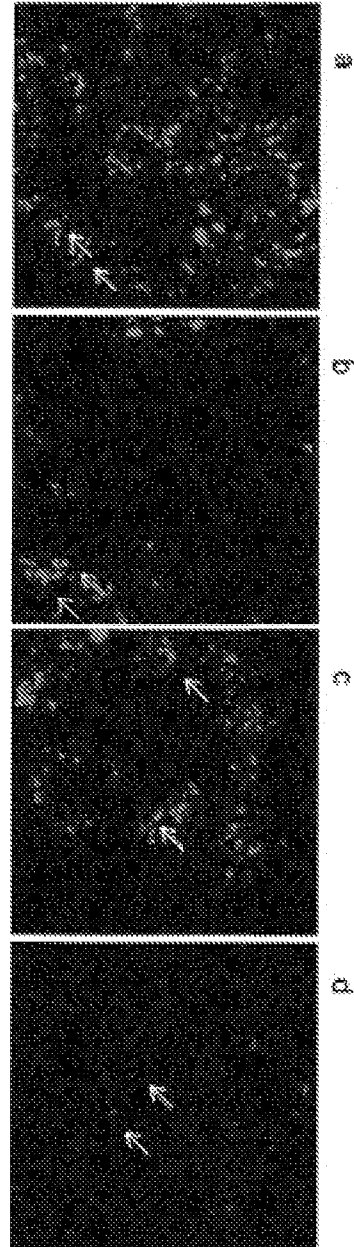


Fig. 27

